

PAULO LUIZ DA SILVA

**RESPOSTA FITOQUÍMICA DE SOJA AO ATAQUE DE *Anticarsia gemmatalis* E DESENVOLVIMENTO DO INSETO ALIMENTADADO COM CULTIVARES RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2015**

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

T

S586r  
2015  
Silva, Paulo Luiz da, 1978-  
Resposta fitoquímica de soja ao ataque de *Anticarsia  
gemmaalis* e desenvolvimento do inseto alimentado com  
cultivares resistentes e susceptíveis / Paulo Luiz da Silva. –  
Viçosa, MG, 2015.  
xiv, 68f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Referências bibliográficas: f.54-68.

1. Soja - Melhoramento genético. 2. Soja - Doenças e pragas. 3. Flavonóides. 4. Proteases - Inibidores. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola. II. Título.

CDD 22. ed. 633.34

PAULO LUIZ DA SILVA

**RESPOSTA FITOQUÍMICA DE SOJA AO ATAQUE DE *Anticarsia gemmatalis* E DESENVOLVIMENTO DO INSETO ALIMENTADO COM CULTIVARES RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS**

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

APROVADA: 27 de fevereiro de 2015.

---

Camila Rocha da Silva

---

Glauca Cordeiro

---

Maxmiller Dal-Bianco L. Costa

---

Wellington Garcia Campo

---

Maria Goreti de Almeida Oliveira

Orientadora

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter concedido a experiência de realizar o doutorado e terminar.

Aos meus amigos do laboratório de Enzimologia pela troca de experiência, paciência, companheirismo na execução do trabalho.

A professora Camila Rocha, ao pós-doc Eduardo e Gláucia Cordeiro do Laboratório de Enzimologia pela colaboração com trabalho.

Ao José Carlos, Luiz e Newton por ajudar na condução dos experimentos de campo.

A Letícia Farias pela amizade e expressiva contribuição nas pesquisas com flavonóides.

Ao professor João Paulo e equipe de laboratório pela orientação e apoio.

Ao André Lourenção do IAC - Campinas pela doação das sementes de soja.

A Ana Marques pela amizade, orientações e correções prestadas ao trabalho.

Ao professor Zanuncio e Jenny pela contribuição no trabalho.

Aos funcionários da UFV que contribuíram com a execução das pesquisas.

Ao Eduardo secretário BQI por zelar exemplarmente da parte burocrática dos alunos de pós - graduação.

Aos estagiários do laboratório de Enzimologia que trabalharam sistematicamente na criação de *Anticarsia gemmatalis* e nos experimentos.

A professora Patrícia Aparecida por ter mostrado a luz no fim do túnel que me conduziu ao doutorado e pelos conselhos.

E agradeço a professora Maria Goreti por ter aberto as portas para realização desse doutorado.

Ao povo brasileiro pelo pagamento dos impostos, a Capes, CNPq e INCT – IPP pela contribuição com nosso trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Paulo Luiz da Silva nascido em 16-12-1978 em Campo Grande – MS, filho de José Rodrigues da Silva e Horaci Luiz da Silva. Desta cidade, foi para Mato Grosso onde fez faculdade de Ciências Biológicas no período de 2001-2004, na Universidade do Estado de Mato Grosso - UNEMAT. Após a conclusão do curso, ingressou no mestrado em Entomologia em 2006, na Universidade Federal de Viçosa – UFV. Tempo depois da conclusão do mestrado, foi selecionado em 2011 para cursar o doutorado em Bioquímica Agrícola na Universidade Federal de Viçosa – UFV.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1 - INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 - Cultura da soja.....	4
2.2 - <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	7
2.3 - Flavonóides.....	10
2.4 - Resposta Fitoquímica.....	12
2.4.1 - Resposta fitoquímica por danos biológicos.....	12
2.4.2 - Resposta fitoquímica por dano mecânico.....	14
2.5 - Vias metabólicas de biossíntese de flavonóides.....	15
2.6 - Inibidores de proteases.....	18
2.7 - Efeito de metabólitos secundários na biologia de insetos.....	22
3 – OBJETIVO GERAL.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 - Criação da Lagarta-da-Soja <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	25
4.1.1 - Preparo da dieta artificial.....	26
4.2 - Cultivares de soja e resposta fitoquímica à injúria mecânica.....	27
4.2.1 - Cultivares de soja e resposta fitoquímica à injúria biológica.....	28
4.2.2 - Obtenção do extrato foliar para análise de flavonóides.....	29
4.2.3 - Identificação e quantificação dos flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	30
4.3 - Obtenção do extrato foliar para determinação de inibidores de proteases em folhas de soja.....	31
4.3.1 - Determinação de inibidores de proteases.....	31
4.3.2 - Determinação da concentração de proteína nos extratos.....	33
4.4 - Desenvolvimento de <i>Anticarsia gemmatalis</i> alimentadas com folíolos de sojas resistentes a insetos.....	33
4.5 - Análises Estatísticas.....	33
5 – RESULTADOS.....	35

6 – DISCUSSÃO.....	48
7 – CONCLUSÕES.....	53
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 5 – Cromatogramas das cultivares de soja IAC-PL1, controle (a), com injuria mecânica (b) e injuriada por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (c). Os compostos daidzina (1), (tempo de retenção - TR 11,6 min), rutina (2), (TR 13,7 min) e quercetina (3), (TR 25 min) foram indetificados.....36

Figura 6 – Cromatogramas das cultivares de soja IAC-17, controle (a), com injuria mecânica (b) e injuriada por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (c). Os compostos daidzina (1), (tempo de retenção - TR 11,6 min), rutina (2), (TR 13,7 min) e quercetina (3), (TR 25 min) foram indetificados.....37

Figura 7 – Cromatogramas das cultivares de soja IAC-24, controle (a), com injuria mecânica (b) e injuriada por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (c). Os compostos daidzina (1), (tempo de retenção - TR 11,6 min), rutina (2), (TR 13,7 min) e quercetina (3), (TR 25 min) foram identificados.....38

Figura 8 – Concentração de rutina, daidzina e quercetina na cultivar IAC-17: controle (C), injuriadas mecanicamente (M) e injuriadas por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (B). Entre os tratamentos (Rutina  $F_{2,9} = 1,15$   $P > 0,05$ ; Daidzina  $F_{2,9} = 0,67$   $P > 0,05$ ; Quercetina  $F_{2,9} = 1,73$   $P > 0,05$ ) não houve diferenças significativas pela ANOVA.....40

Figura 9 – Concentração de flavonóides rutina, daidzina e quercetina na cultivar de soja IAC-24: controle (C), injuriadas mecanicamente (M) e injuriadas por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (B). Entre os tratamentos (Rutina  $F_{2,9} = 2,35$   $P > 0,05$ ; Daidzina  $F_{2,9} = 0,81$   $P > 0,05$ ; Quercetina  $F_{2,9} = 0,47$   $P > 0,05$ ) não houve diferenças significativas pela ANOVA.....40

Figura 10 – Concentração de flavonóides rutina, daidzina e quercetina em plantas de soja IAC-PL1: controle (C), injuriadas mecanicamente (M) e injuriadas por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (B). Entre os tratamentos (Rutina  $F_{2,9} = 0,45$   $P > 0,05$ ; Daidzina  $F_{2,9} = 3,54$   $P > 0,05$ ; Quercetina  $F_{2,9} = 0,52$   $P > 0,05$ ) não houve diferenças significativas pela Anova.....41

Figura 11 - Concentração de flavonóides em folíolos de soja injuriadas por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). O círculo fechado indica plantas atacadas pela lagarta e o círculo aberto, controle. Daidzina ( $F_{1,20} = 2,17$   $P > 0,05$ ); Rutina ( $F_{1,20} = 2,43$   $P > 0,05$ ); Quercetina ( $F_{1,20} = 3,63$   $P > 0,05$ ) não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Covariância....42

Figura 12 - Concentração de flavonóides em folíolos de sojas injuriadas por dano mecânico. O círculo fechado indica plantas injuriadas por dano mecânico e o círculo aberto, controle. Daidzina ( $F_{1,20} = 0,008$   $P > 0,05$ ); Rutina ( $F_{1,20} = 0,25$   $P > 0,05$ ); Quercetina ( $F_{1,20} = 0,008$   $P > 0,05$ ) não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Covariância.....43

Figura 13 - Concentração de flavonóides em extrato foliar de cultivares de sojas resistentes a insetos IAC 17 (A) e IAC 24 (B) injuriadas mecanicamente. As médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....44

Figura 14 - Concentrações de flavonóides nas cultivares de soja (IAC-17, 24) resistente e suscetível a insetos (IAC-PL1), injuriadas mecanicamente. As médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....45

Figura 15 – Inibição da tripsina pelo extrato de folhas da cultivar IAC-24 injuriada por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (barras escuras) e controle (barras claras). Os tratamentos sinalizados com asteriscos apresentam diferença estatística pelo teste de ANOVA (Tempo 0 h,  $F_{1,4} = 0,0008$   $P < 0,05$ ; Tempo 12 h,  $F_{1,4} = 23,97$   $P < 0,05$ ; Tempo 24 h,  $F_{1,4} = 11,19$   $P < 0,05$ ; Tempo 36 h,  $F_{1,4} = 341,33$   $P < 0,05$ ).....46

Figura 16 – Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas (Lepidoptera: Noctuidae) com dieta, folíolos de soja susceptível (IAC-PL1) e resistente a insetos (IAC-17 e IAC-24). As médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....47

Figura 17 – Duração da fase larval de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) alimenta com dieta, folíolos de soja susceptível (IAC-PL1) e

resistente a insetos (IAC-17 e IAC-24). As médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).....47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2- Concentração (mg/g) de rutina, daidzina e quercetina nos cultivares de soja injuriadas por <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lepidoptera: Noctuidae) e injuriadas mecanicamente por 24 horas.....	39
---	----

## RESUMO

SILVA, Paulo Luiz da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Resposta fitoquímica de soja ao ataque de *Anticarsia gemmatalis* e desenvolvimento do inseto alimentado com cultivares resistentes e susceptíveis.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

A resposta de plantas à herbivoria inclui a produção de compostos químicos de defesa como os inibidores de protease e metabólitos secundários, incluindo flavonóides, os quais tornam a folha menos aceitável, reduzindo a alimentação e com efeito negativo na fisiologia de insetos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta fitoquímica de cultivares de soja resistentes a insetos após injúrias mecânicas e por *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae); além de avaliar o desenvolvimento da lagartas-da-soja alimentadas com sojas resistentes a insetos. Esses cultivares foram injuriados mecanicamente e biologicamente, e amostras dessas plantas foram analisadas em cromatógrafo para identificação e quantificação dos flavonóides. O desenvolvimento da lagarta, incluindo mortalidade e duração da fase imatura foram determinados e os inibidores de proteases foram analisados em espectrofotômetro. Os flavonóides daidzina, rutina e quercetina foram identificados nos folíolos das cultivares de soja IAC-17, IAC-24, resistentes a insetos, e na IAC-PL1 injuriadas mecanicamente e por *A. gemmatalis*. As cultivares IAC-PL1, IAC-17 e IAC-24 não apresentaram resposta fitoquímica dos flavonóides, após injúria mecânica e por *A. gemmatalis* ( $P > 0,05$ ). Também não houve resposta fitoquímica dos flavonóides rutina, daidzina, quercetina, após injúrias biológicas ou mecânicas avaliados ao longo do tempo ( $P > 0,05$ ). Entre os três flavonóides identificados na soja, a daidzina foi o composto majoritário nas plantas resistentes a insetos IAC-17 e 24 ( $P > 0,05$ ). Comparando esses compostos entre os três cultivares de soja, a concentração de rutina foi maior na soja resistente a inseto IAC-24 em relação à susceptível IAC-PL1 e a IAC-17 resistente ( $P > 0,05$ ). A concentração de daidzina foi maior nas cultivares de soja resistentes em relação a susceptível. A concentração de rutina foi igual entre as três cultivares de soja. A mortalidade de *A. gemmatalis* foi maior em cultivares de soja resistentes a insetos IAC-17 e 24. A maior duração da fase larval de ocorreu em sojas resistentes. Conclui-se que as cultivares de soja, independentemente de injurias mecânicas, produzem

flavonóides como uma defesa constitutiva. O desenvolvimento de *A. gemmatilis* é afetada por cultivares de soja resistentes a insetos como IAC – 17 e 24.

## ABSTRACT

SILVA, Paulo Luiz da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Phytochemical response of soy plant to the *Anticarsia gemmatalis* attack and development of fed insects with resistant and susceptible cultivars.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

The plant herbivory response includes the production of defensive chemical compounds such as protease inhibitors and secondary metabolites including flavonoids, which makes it less acceptable sheet feeding and reducing the negative effect on insect physiology. The objective of this study was to evaluate the phytochemical response of resistant soybean cultivars insect after mechanical injuries and caused by *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae); in addition to evaluate the development of soybean caterpillar fed with soybeans resistant to insects. These cultivars were injured mechanically and biologically, and samples of these plants were analyzed in chromatography in order to identifying and quantifying flavonoids. The development of the caterpillar its mortality and length of the immature stage were determined, and the protease inhibitors were analyzed in a spectrophotometer. The flavonoids daidzin, rutin and quercetin were identified in the leaflets of the IAC-17 and IAC-24 soybean cultivars, insect resistant, and in IAC-PL1 injured mechanically and by *A. gemmatalis*. The IAC-PL1, IAC-17 and IAC-24 didn't show phytochemical response of flavonoids, after injury caused mechanically and by *A. gemmatalis* ( $P > 0.05$ ). Also there was not phytochemical response of flavonoids rutin, daidzin, quercetin after biological or mechanical injuries assessed over time ( $P > 0.05$ ). Among the three flavonoids identified in soybean, daidzin was the major compound in the resistant plants to insects, IAC-17 and 24 ( $P < 0.05$ ). And comparing these compounds between the three soybean cultivars, the concentration of rutin was higher in insect resistant soybeans, IAC-24, compared to susceptible IAC-PL1 and the resistant IAC- 17 ( $P > 0.05$ ). The concentration of daidzin was higher in soybean cultivars resistant against susceptible. The concentration of rutin was equal between the three soybean cultivars. The mortality of *A. gemmatalis*, was higher in soybean cultivars resistant to IAC-17 and 24. The longest duration of larval phase occurred in resistant soybeans. It is concluded that the soybean cultivars, regardless of mechanical injuries, produce flavonoids as a constitutive

defense. The development of *A. gemmatilis* is affected by soybean cultivars resistant to insects, such as IAC – 17 and 24.

## 1 - INTRODUÇÃO GERAL

A cultura da soja está sujeita, durante todo o seu ciclo, ao ataque de diferentes espécies de insetos como *Anticarsia gemmatalis* Hubner (1816) (Lepidoptera: Noctuidae). As plantas de soja apresentam defesas contra o ataque de insetos, como os flavonóides, e podem apresentar resposta fitoquímica ao dano biológico. A resposta fitoquímica caracteriza-se como o aumento de compostos químicos na planta diante do ataque de insetos, sendo, portanto, uma resposta induzida. Esses compostos químicos, ao serem ingeridos pelos insetos, causam danos à sua biologia (Mello & Silva-Filho, 2002; Fugi *et al.*, 2005; Mohanta *et al.*, 2012).

As plantas se defendem do ataque dos insetos pragas de forma direta e indireta. A defesa da planta de forma direta consiste na produção de metabólitos secundários, dentre os quais estão os alcalóides, flavonóides, terpenóides, esteróis, e outros (Kubo & Hanke, 1986). A importância química dessas substâncias é reconhecida desde o início dos anos 50 (Kogan, 1986).

Nas folhas de soja existem uma série de metabólitos secundários e, dentre estes, a rutina tem sido utilizada como modelo nos experimentos para estudar a interação inseto-planta (Stamp & Skrobola, 1993; Hoffmann-Campo *et al.*, 2001; Piubelli *et al.*, 2005; Hoffmann-Campo *et al.*, 2006; Salvador *et al.*, 2010). Ácidos fenólicos presentes nas folhas de sojas (Porter *et al.*, 1986; Piubelli *et al.*, 2003) também podem apresentar efeitos nocivos sobre a biologia dos insetos (Shwetha *et al.*, 2011; Samuel *et al.*, 2014). A presença de apenas rutina ou ela combinada com caseína diminuiu a massa de larvas e pupas de *A. gemmatalis* (Hoffmann-Campo *et al.*, 2001; Hoffmann-Campo *et al.*, 2006; Salvador *et al.*, 2010). Esses compostos químicos também afetaram a duração

larval (Salvador *et al.*, 2010) e causaram mortalidade dessa lagarta (Gazzoni *et al.*, 1997).

Os cultivares de soja resistentes a insetos são utilizados na tentativa de minimizar os danos à planta. Nesse sentido, o cultivar PI 229358, IAC - 17 e IAC - 24 influenciam negativamente a alimentação de *A. gemmatalis* sobre as folhas, alterando o seu desenvolvimento. A soja apresenta antibiose por causar esse efeito nas lagartas (Fugi *et al.*, 2005). Outros cultivares de soja BR 82 – 12547, IAC 74 – 28 32, PI 274454, IAC - 100 também causam efeitos negativos na biologia de *A. gemmatalis* (Oliveira *et al.*, 1993; Hoffmann-Campo *et al.*, 1994). Esse fator de resistência da planta aos insetos pode estar relacionado aos metabólitos secundários presentes nas folhas da soja (Salvador *et al.*, 2010). A concentração desses flavonóides pode aumentar na planta em função da injúria provocada pelo inseto (Piubelli *et al.*, 2003).

A injúria provocada pelo inseto na planta faz com que a mesma responda com seu arsenal químico. Em sementes dos cultivares resistente de soja atacadas por *Nezara viridula* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Pentatomidae), houve um expressivo aumento dos níveis de metabólitos secundários, sendo o cultivar PI 227687 o que apresentou o maior teor de isoflavonas (Piubelli *et al.*, 2003). Além da produção de flavonóides em sementes de soja, esses compostos são produzidos em folhas de *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae) (ginkgo) atacadas por *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae) (Mohanta *et al.*, 2012).

Os trabalhos realizados por Piubelli *et al.* (2003) e Mohanta *et al.* (2012) diagnosticaram a resposta fitoquímica de flavonóides em folhas de *Ginkgo bilobae* e em sementes de soja, mas não avaliaram essa resposta em folíolos

de soja atacadas por *A. gemmatalis*. Diante disso, este trabalho teve como objetivo avaliar a resposta fitoquímica de cultivares de soja injuriadas e seus efeitos em alguns aspectos da biologia de *A. gemmatalis*.

Esse estudo de prospecção fitoquímica é importante para desvendar as defesas químicas envolvidas na relação planta e insetos pragas. O conhecimento dessas defesas químicas da planta pode ser aplicado no melhoramento da soja contra o ataque de insetos, resultando em um impacto positivo para o agricultor e ao meio ambiente.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - Cultura da soja

A soja *Glicine max* (L) (Leguminosae) foi cultivada pela primeira vez no leste da Ásia, ao longo do Rio Amarelo, na China. A evolução da soja começou com o aparecimento de plantas originadas de cruzamentos naturais, entre duas espécies de soja selvagem, que foram aprimoradas geneticamente (Embrapa soja, 2012).

Há mais de cinco mil anos a soja tem sido explorada no oriente, sendo conhecida como uma das plantas mais antigas em relação ao seu cultivo. O ocidente ignorou seu plantio até a segunda década do século XX, quando os Estados Unidos (EUA) iniciou sua exploração comercial (Embrapa soja, 2012). A introdução da soja no Brasil foi realizada em 1882, inicialmente na região Sul (Embrapa soja, 2012). Em 2003 o Brasil tornou-se o segundo produtor mundial da cultura, responsável por 52, das 194 milhões de toneladas produzidas em nível global ou 26,8% da safra mundial (Embrapa soja, 2012). Atualmente o estado do Mato Grosso tem liderado a produção do grão, com aproximadamente 60% da área plantada (Embrapa soja, 2012).

A soja é uma planta herbácea, incluída na classe Dicotyledoneae, ordem Rosales, família Leguminosae, subfamília das Papilionoideae, gênero *Glycine*. De modo geral, os cultivares brasileiros apresentam ciclos entre 100 e 120 dias. A soja tem sido classificada em grupos de maturação precoce, semiprecoce, médio, semitardio e tardio, dependendo da região (Centro de Inteligência da Soja, 2012). Morfologicamente as folhas de soja foram descritas como cotiledonares, folhas primárias ou simples, folhas trifolioladas ou

compostas e perfis simples. Sua coloração, na maioria dos cultivares, varia de verde pálida a verde escura. O caule é ramoso, hispido, com comprimento que varia entre 80 e 150 cm, dependendo da variedade e do tempo de exposição diário à luz (Centro de Inteligência da Soja, 2012). A soja é caracterizada como uma espécie autógama, ou seja, uma planta polinizada por ela mesma e não por outras plantas, mesmo que vizinhas a ela, com flores perfeitas e órgãos masculinos e femininos protegidos dentro da corola. Suas flores podem ser brancas, púrpuras diluídas ou roxas, com diâmetro variando de três a oito milímetros. A floração é de dez até 12 folhas trifolioladas, onde os botões axilares mostram racemos com dois até 35 flores cada (Centro de Inteligência da Soja, 2012).

O sistema radicular é composto por um eixo principal com grande número de raízes secundárias. Suas raízes podem alcançar até 1,80 m de profundidade, entretanto a maioria está a 15 cm. O legume da soja é arqueado, peludo, formado por duas valvas de um carpelo simples, medindo de dois até sete centímetros, contendo uma ou até cinco sementes. A coloração da vagem varia entre amarela-palha, cinza e preta. As sementes são lisas, ovais, globosas ou elípticas (Centro de Inteligência da Soja, 2012).

Os grãos dessa planta têm sido utilizados como fonte de proteína em rações, tanto no Brasil como no mundo, na forma de farelo. O óleo resultante do processamento do farelo é usado também na alimentação animal para elevar o teor energético, melhorar a palatabilidade e para reduzir a presença de pó nas rações, mas este uso é pequeno quando comparado ao volume de farelo. O óleo é utilizado na alimentação humana, no preparo de frituras ou em margarinas. Também se usa, em escala menor, o extrato solúvel e a proteína,

o primeiro no preparo de queijo de soja ou como bebida em substituição ao leite animal e, a segunda em dietas ricas em aminoácidos (Brasil, 2009).

Uma das limitações na produção de soja está relacionada com os insetos-praga, que podem causar injúrias durante todo o seu desenvolvimento (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000). *Agrotis ipsilon* (Hufnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), *Scaptocoris castânea* (Perty) (Hemiptera: Cydnidae), *Atarsocoris brachiariae* (Becker) (Hemiptera: Cydnidae) e *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) podem atacar as plantas logo após a sua emergência. Durante a fase vegetativa, podendo chegar até a floração, *Chrysodeixis (Pseudoplusia) includens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Epinotia aporema* (Walsinhgan) (Lepidoptera: Tortricidae) podem causar injúrias à soja. Na fase reprodutiva, desde a formação das vagens até o desenvolvimento final das sementes, é relatada a presença de *Nezara viridula* (Linnaeus) (Hemiptera: Pentatomidae), *Piezodorus guildini* (Westwood) (Hemiptera: Pentatomidae) e *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae) (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000). A principal praga desfolhadora é a *A. gemmatalis* que atacam as folhas da planta (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000).

## 2.2 - *Anticarsia gemmatalis*

*Anticarsia gemmatalis* Hubner (1816) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma importante praga da soja *Glycine max* (L.) no hemisfério ocidental (Fig 1). A lagarta-da-soja, como é conhecida no Brasil, foi considerada como praga pela primeira vez nos Estados da Flórida e Carolina do Sul (USA) (Ford *et al.*, 1975). Esta lagarta possui preferência por plantas da família Fabaceae.

As mariposas possuem coloração cinza, marrom ou bege. Na maioria das vezes apresentam uma listra transversal escura ao longo das asas. O processo reprodutivo, incluindo o acasalamento e as posturas dos ovos, ocorrem à noite (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000). Os ovos são depositados na parte inferior das folhas, no caule, nos ramos e pecíolo. Em maior concentração nos terços médios e inferior das plantas. Os ovos possuem coloração verde-clara ou acinzentada, dependendo do tempo, e posteriormente podem se tornarem marrom-escuro próximo à eclosão das larvas. A incubação dos ovos é de aproximadamente três dias. Cada fêmea tem a capacidade de colocar até 1000 ovos e cerca de 80% são depositados nos primeiros oito a dez dias após a sua emergência. A longevidade das fêmeas é de, aproximadamente 20 dias (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000). A lagarta apresenta coloração verde, com estrias longitudinais brancas sobre o dorso. Na falta de alimento ou em alta densidade populacional a lagarta assume a coloração escura, mantendo as estrias brancas (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000).

A lagarta-da-soja geralmente apresenta seis instares, onde o primeiro instar apresenta duração média de 2,6 dias; o segundo 2,35; o terceiro 2,3; o quarto 2,15; o quinto 2,25 e o sexto 1,95 dias. A fase larval varia de 12 a 15 dias (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000). O tempo médio dos instares que a lagarta

passa pode variar de acordo com a dieta (Bortoli *et al.*, 2005). Nos dois primeiros instares as lagartas raspam o parênquima foliar e no terceiro elas conseguem perfurar as folhas. O consumo diário de folhas de soja por lagartas de quarto e quinto instares é, em média 2,66 a 2,76 g de folhas (Bortoli *et al.*, 2005). As lagartas podem chegar a consumir de 100 a 150 cm<sup>2</sup> de área foliar e aproximadamente 96% desse consumo ocorre do quarto ao sexto instares larvais (Embrapa, 2006). E algumas plantas estão entre os principais hospedeiros lagarta-da-soja. Quando a lagarta para de se alimentar no último instar larval, entra na fase pré-pupa (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000). A lagarta empupa no solo, numa profundidade de até dois centímetros. A pupa recém-formada tem coloração verde-clara, tornando-se, posteriormente, marrom-escura e brilhante. A fase de pupa dura nove a dez dias, quando emergem as mariposas (Bortoli *et al.*, 2005; Hoffmann-Campo *et al.*, 2000).

No Brasil, a lagarta-da-soja ocorre em todos os locais de cultivo da soja, sendo o desfolhador mais comum da planta. As lagartas atacam as lavouras de soja em novembro e/ou janeiro, dependendo da região do país, podendo causar o completo desfolhamento da planta (Hoffmann-Campo *et al.*, 2000). A lagarta-da-soja tem um espectro amplo de plantas hospedeiras, incluindo plantas cultivadas e silvestres. Essa espécie tem preferência por leguminosas, mas também foi encontrada em algodoeiro, quiabo, trigo, girassol, begônia e arroz (Armstrong *et al.*, 1990; Buschman *et al.*, 1977; Gregory Junior *et al.*, 1991; Panizzi *et al.*, 2004). Foi encontrada alimentando de alfafa, caupi, amendoim, guandu, tremoço-branco, anil-bravo, trevo-branco, erva-de-bicho, magerioba (Ellisor, 1942, Panizzi *et al.*, 2004). Mas dentre as plantas a lagarta-

da-soja causa maior dano em plantas leguminosas como soja, guandu, tremoço-branco (Panizzi *et al.*, 2004)

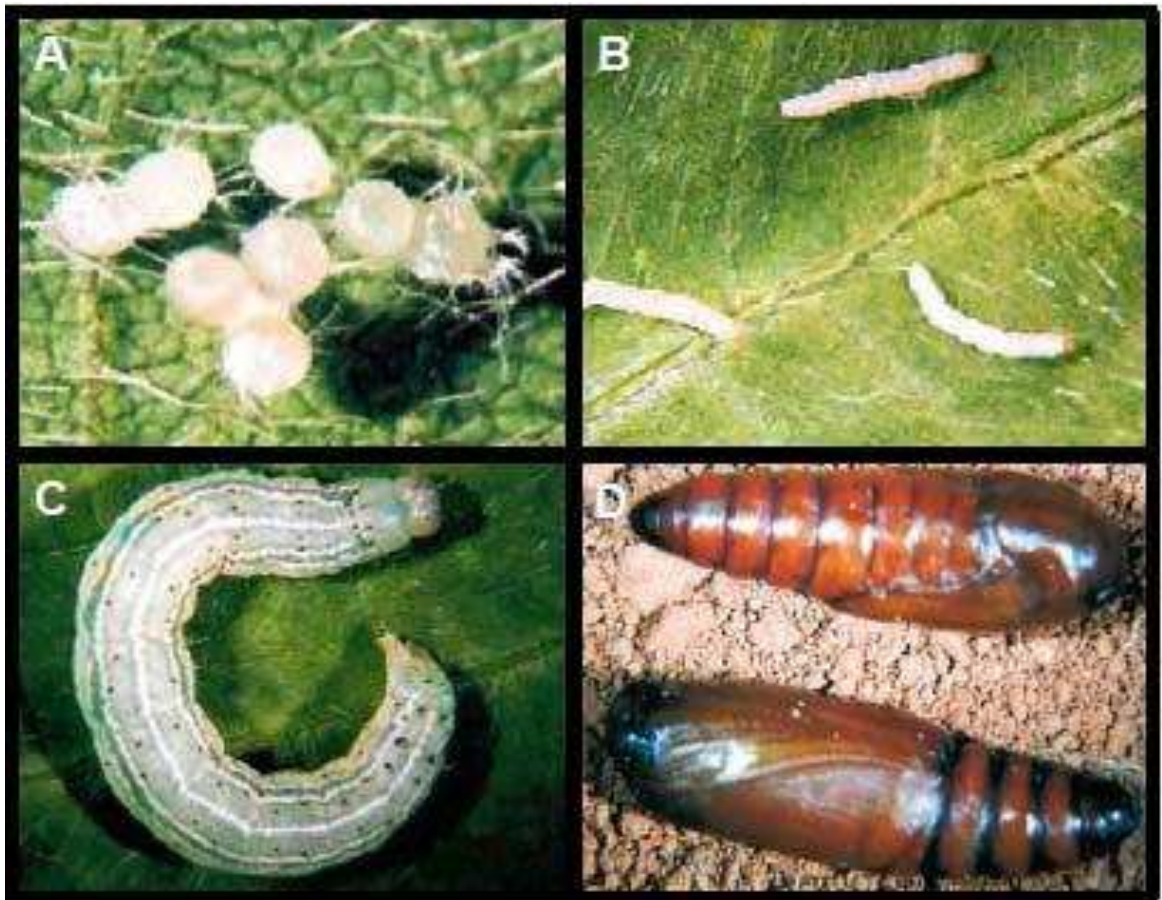


Figura 1. Estágios de desenvolvimento da *A. gemmatilis*. A) Ovos esféricos; B) Lagartas de segundo instar; C) Lagartas de quinto instar; D) Pupas (Fonte: Praça *et al.*, 2006).

### 2.3 - Flavonóides

Flavonóides inclusos nos grupos dos metabólitos secundários são polifenóis compostos por um núcleo de fenilcromona (C6 – C3 – C6) podendo ter alterações nas hidroxilas, incluindo derivados ligados a açúcares (Birt, 2001). As atividades bioquímicas dos flavonóides e de seus metabólitos dependem da estrutura química, que pode variar com substituições como hidrogenação, hidroxilações, metilações, malonilações, sulfatações e glicosilações (Machado, 2006). Os flavonóides ocorrem com ésteres, éteres ou derivados glicosídicos (Middleton *et al.*, 1998). Exceto o grupo das leucoantocianinas, os flavonóides ocorrem em plantas acompanhadas por glicídios, sendo denominado glico-flavonóide ou flavonóide glicosilado, e os isentos de glicídios recebem o nome de aglicona (Machado, 2006). Os flavonóides estão divididos em subgrupos, dentre os quais, estão as flavonas, flavanonas, catequinas e antocianinas (Crozier *et al.*, 2006). Além disso, os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos principais: a) flavonóides, compostos fenólicos e polifenólicos; b) terpenóides/ isoprenóides e c) compostos contendo nitrogênio e enxofre, como alcalóides e glucosinolatos, respectivamente (Crozier *et al.*, 2006).

Mais de 4.000 flavonóides já foram identificados em vegetais (Middleton *et al.*, 1998). Os flavonóides estão entre os mais importantes grupos do reino vegetal (Middleton *et al.*, 1998). Esses compostos são encontrados em frutos, legumes, nozes, sementes, ervas, especiarias, caules e folhas (Acker *et al.*, 1996).

O metabolismo dos flavonóides na planta pode ser alterado pela radiação solar, raios UV, períodos de seca ou chuva, nutrientes, estação do

ano, poluentes. Esses compostos nos períodos de chuva, os mais polares são eliminados da planta por lixiviação (Machado, 2006).

A atividade biológica dos flavonóides foi investigada pela primeira vez em 1936 por Rusznyák e pelo bioquímico húngaro Albert Szent-Gyorgyi, onde diagnosticaram a diminuição e a fragilidade capilar em humanos (Pedriali, 2005). Desempenham uma variedade de funções importantes nas plantas. São atuantes como fitoalexinas (Fawe *et al.*, 1998, McNally *et al.*, 2003), agentes desintoxicantes, (Yamasaki *et al.*, 1997; Michalak *et al.*, 2006), estimulantes para a germinação de esporos (Morandi *et al.*, 1992; Bagga & Straney, 2000), desempenham atividades significativas na germinação das sementes (Shirley, 1998), resistência à seca (Hernandez *et al.*, 2004), atraem polinizadores (Iwashina, 2003), são agentes aleloquímicos (Duke, 2007), responsáveis pela cor, e protegem as plantas de micróbios e insetos (Griesbach, 2005; Nenaah *et al.*, 2012). Esses compostos agem como agentes de defesa contra herbivoria de *A. gemmatilis* (Hoffmann-Campo *et al.*, 2001; Piubelli *et al.*, 2005; Hoffmann-Campo *et al.*, 2006; Salvador *et al.*, 2010).

## **2.4 - Resposta fitoquímica**

As plantas podem apresentar uma resposta fitoquímica induzida por dano mecânico ou biológico. A resposta fitoquímica por dano mecânico consiste em a planta produzir metabolitos secundários diante de um ferimento provocado na folha (Zabaras, 2001; Mello & Silva – Filho, 2002; Banchio *et al.*, 2005; Piesik *et al.*, 2006). Já a resposta biológica inicia-se com uma injúria provocada pelo inseto na folha da planta, fazendo com que a mesma responda com a produção de metabolitos secundários diante do estresse (Piubelli *et al.*, 2003; Mohanta *et al.*, 2012).

### **2.4.1 - Resposta fitoquímica por danos biológicos**

A resposta da planta ao ataque de insetos pode ser constitutiva, onde a planta produz metabólitos secundários em nível basal. Nesse tipo de defesa a planta independe de ataque de insetos para produzir metabólitos secundários. Outra forma de defesa é induzida, onde a planta produz metabólitos secundários mediante o ataque de insetos (Mello & Silva – Filho, 2002). A resposta fitoquímica induzida por dano biológico da soja é ocasionada por injúrias provocadas por insetos e resulta na produção de metabolitos secundários (Piubelli *et al.*, 2003). Essa resposta é direta, onde metabólitos secundários são produzidos para defesa contra herbívoros (Fig 2). Um outro tipo de defesa é a indireta que consiste em a planta defender-se da herbivoria através de parasitoides e predadores, os quais são atraídos para planta atacada por meio de seus compostos químicos voláteis (Arimura *et al.*, 2005).

Os flavonóides podem ser encontrados em determinadas plantas da família Asteraceae, Myrtaceae, Passifloraceae, Polygonaceae, Solanaceae,

(Simmonds, 2001; Souza *et al.*, 2012). Eles desempenham um papel importante na defesa contra microrganismos e insetos (Dixon & Steele, 1999), pois são tóxicos (Harborne & Grayer, 1993). Esses metabólitos secundários estão presentes na soja. A rutina é um flavonóide mais citado (Stamp & Skrobola, 1993; Hoffmann-Campo *et al.*, 2001; Piubelliet *al.*, 2005; Hoffmann-Campo *et al.*, 2006; Salvador *et al.*, 2010). Outros flavonóides também podem ser encontrados na soja como daidizina, genistina, (Piubelli *et al.*, 2003), genisteína, naringenina, quercetina e daidzeína (Porter *et al.*, 1986).

O flavonóide rutina é encontrado em genótipos de soja PI 227687 (Hoffmann-Campo *et al.*, 2001; Piubelliet *al.*, 2005) e tem sido amplamente utilizado nos programas de melhoramento de plantas como fonte de resistência a insetos desfolhadores. Esse composto causa efeitos antibiótico e/ou antinutricionais em muitos insetos mastigadores (Stamp & Skrobola, 1993), incluindo a lagarta-da-soja (Hoffmann-Campo *et al.*, 2006).

A resposta fitoquímica induzida foi evidenciada em sementes de soja atacadas por *N. viridula* Linnaeus (Hemiptera: Pentatomidae), onde houve um expressivo aumento dos níveis dos metabólitos secundários isoflavonas. Nessas condições a cultivar de soja que apresentou maior teor de isoflavonas nas sementes foi a cultivar PI 227687 (Piubelli *et al.*, 2003). Além da produção de flavonóides em sementes de soja, esses compostos são produzidos em folhas de *Ginkgo biloba* atacadas por *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae) (Mohanta *et al.*, 2012).

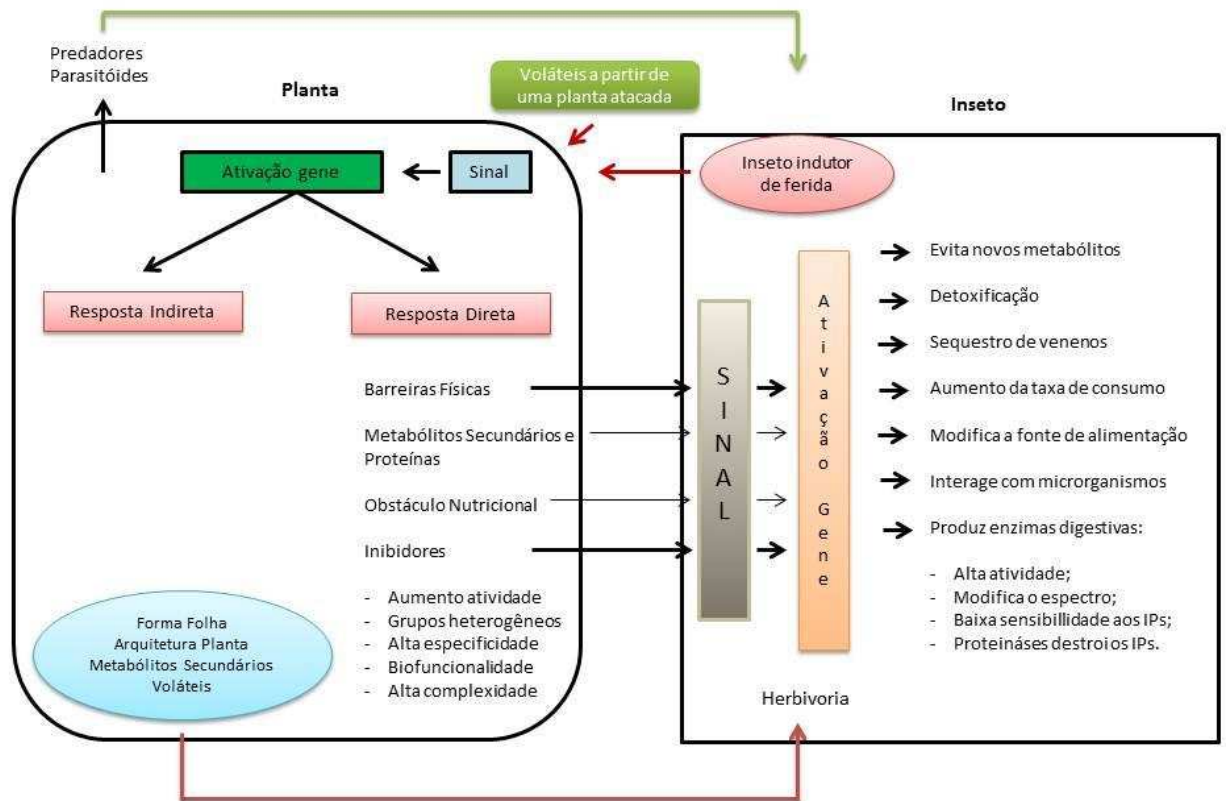


Figura 2 – Modelo adaptado de sistema de interação inseto – planta exemplificando a resposta direta e indireta das plantas ao ataque de insetos. O sistema é dinâmico, sujeito a variação contínua. A fim de reduzir o ataque de insetos, as plantas apresentam diferentes mecanismos de defesas, incluindo defesas químicas, como a produção de proteínas, compostos voláteis que atraem insetos predadores de herbívoros, metabólitos secundários e barreiras físicas, como os tricomas (Mello & Silva – Filho, 2002).

#### 2.4.2 - Resposta fitoquímica por dano mecânico

A resposta fitoquímica induzida também ocorre em plantas injuriadas mecanicamente, por ferimentos ocasionados nas folhas que estimulam a produção de metabólitos secundários. Esse tipo de comportamento da planta à injúria é conhecida como resposta induzida, onde a planta produz compostos químicos em resposta a um ferimento (Zabaras, 2001; Mello & Silva – Filho, 2002; Banchio *et al.*, 2005; Piesik *et al.*, 2006).

Algumas plantas quando injuriadas mecanicamente produzem os voláteis linalol e óxido de linalol, e o aumento da concentração é evidenciado nos diferentes tempos (Piesik *et al.*, 2006). Injúrias mecânicas realizadas em folhas de *Ocimum minimum* Lamiaceae (manjeriço) produz 15 compostos, dentre os compostos produzidos em maior concentração está o linalol, eugenol e sesquiterpenos (Zabaras, 2001). Em folhas de *Minthostachys mollis* Lamiaceae (muña) com esse mesmo tipo de injúria houve produção dos voláteis mentona e pulegona, e após 48 horas de dano nas folhas, esses compostos diminuíram de forma expressiva (Banchio *et al.*, 2005).

## **2.5 - Vias metabólicas de biossíntese de flavonóides**

Existem duas vias de biossíntese de flavonóides: a rota do chiquimato e do acetil-coenzima A. Envolvida nessa rota, o aminoácido fenilalanina é um precursor importante da biossíntese dos flavonóides (Fig 3) (Winkel-Shirley, 2001; Mohanta *et al.*, 2012). Esse sistema é proporcionado pela saliva do inseto que contém elicitores que irão desencadear uma resposta química da planta frente ao ataque. Os elicitores desencadeiam na planta um aumento do fluxo de cálcio na membrana celular na área injuriada, além disso, proteínas serão fosforiladas e ocorrerá a formação de espécies reativas de oxigênio (de Bruxelles e Roberts, 2001), fazendo com que a célula produza sinais que ativaram genes de defesa. O ácido jasmônico também será produzido com esse processo (Ryan, 2000). A partir desse ponto rotas importantes são ativadas como a rota do chiquimato e da coenzima A.

A rota do chiquimato e do acetil-coenzima A estão envolvidas na formação do aminoácido fenilalanina, que é um precursor importante da biossíntese dos flavonóides. A partir da fenilalanina inicia-se a biossíntese de inúmeros flavonóides, dentre os quais destacam as isoflavonas, flavonolol, antocianinas, flavonas, auronas, taninos condensados, flavonas, isoflavonas, chalconas (Winkel-Shirley, 2001; Mohanta *et al.*, 2012). Para isso ocorrer um processo de catálise é necessário.

O primeiro passo da biossíntese dos inúmeros metabólitos segue com o processo de catálise da chalcona sintase (CHS), que utiliza malonil-CoA e 4-coumaroil-CoA como substratos. E a partir desse ponto outras enzimas entraram em ação para ocorrer a formação dos flavonóides. Dentre as enzimas envolvidas nesse processo estão: cinamato-4-hidroxilase (C4H), chalcona isomerase (CHI), chalcona redutase (CHR), chalcona sintase (CHS), 4-coumaroil: CoA-ligase (4CL), di-hidroflavonol-4-redutase (DFR), 7,29-di-hidroxi, 49-methoxyisoflavanol desidratase (CMSD), flavanona 3-hidroxilase (F3H), sintase flavona (FSI e FSII), flavonóide hidroxilase 39 (F39H) ou hidroxilase flavonóide 3959 (F3959H), a isoflavona O-metiltransferase (IOMT), a isoflavona redutase (IFR), a isoflavona 29 - hidroxilase (I29H), a isoflavona sintase (IFS), leucoanthocyanidin dioxigenase (LDOX), redutase leucoanthocyanidin (LCR), O-metiltransferase (OMT), Phe amônia-liase (PAL), rhamnosyl transferase (RT), estilbeno sintase (STS), UDPGflavonoideglucosil transferase redutase (UFGT), e vestitone (VR), (Winkel-Shirley, 2001). Essas enzimas são responsáveis por montar os esqueletos de carbonos durante a formação dos flavonóides (Winkel-Shirley, 2001).

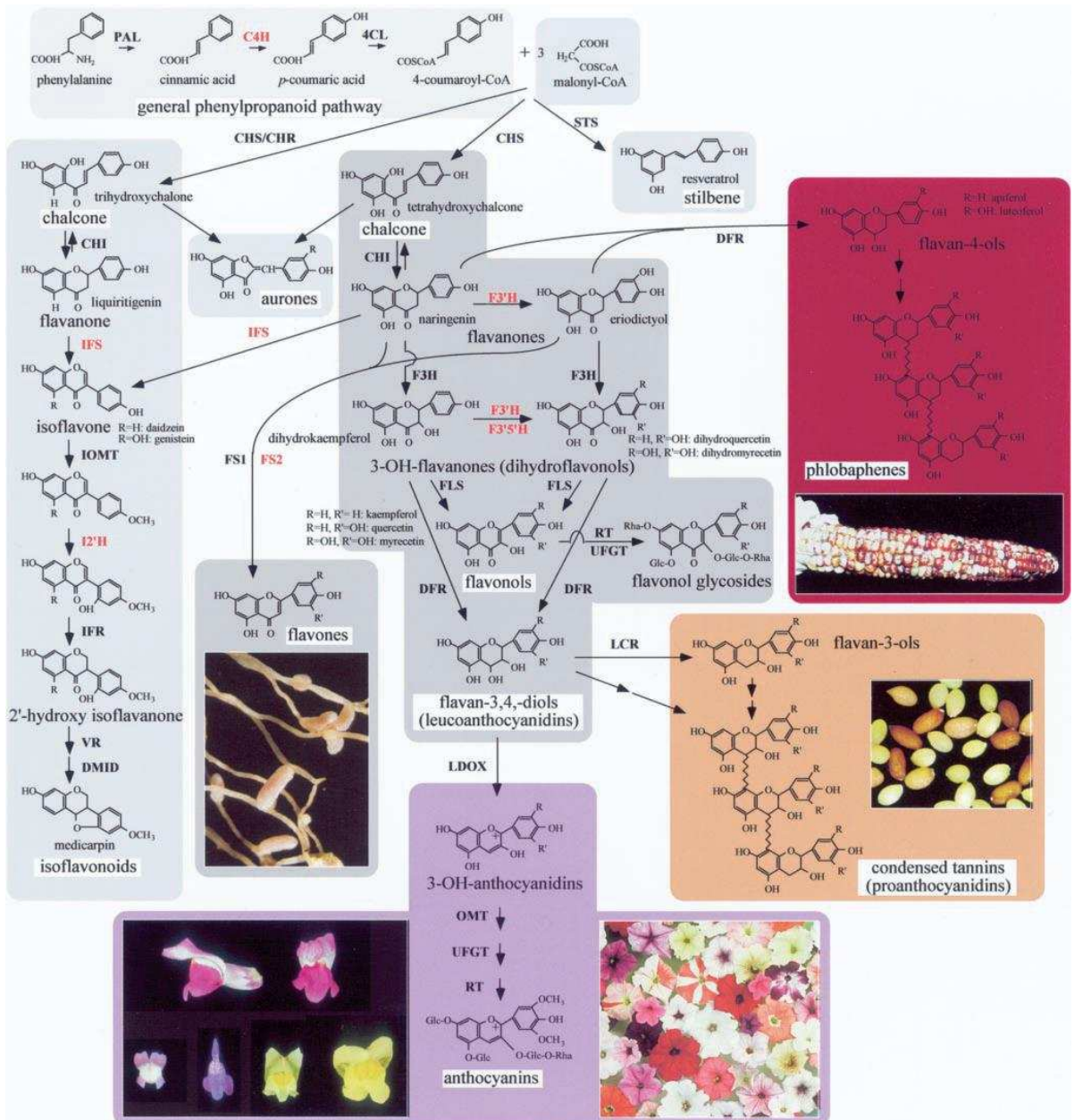


Figura 3 - Biossíntese dos flavonóides. A biossíntese desses compostos inicia com o metabolismo da fenilpropanóide. O primeiro passo da biossíntese dos inúmeros metabólitos segue com o processo de catálise da chalcona sintase (CHS), que utiliza malonil-CoA e 4-coumaroil-CoA como substratos. (Winkel-Shirley, 2001).

## 2.6 - Inibidores de proteases

A função dos inibidores de protease (IPs) foi investigado em 1947, quando Mickel e Standish diagnosticaram que as larvas de insetos não eram capazes de se desenvolverem sobre produtos a base de soja (Haq *et al.*, 2004; Migliolo *et al.*, 2010). Esses compostos são utilizados para aumentar a resistência das plantas a insetos pragas devido a sua robustez (abundância, especificidade, atingir enzimas específicas de insetos, são resistentes a proteólise) (Jongsma & Boulter, 1997; Abdeen *et al.*, 2005). Os IPs são proteínas relativamente pequenas de 29 a 190 resíduos de aminoácidos e podem ser agrupadas em famílias diferentes, tendo por base a similaridade da sequência, similaridade topológica e mecanismo de ligação à enzima (Richardson, 1991). Os IPs são moléculas pequenas, estáveis e fáceis de purificar; sendo encontrados nos órgãos reprodutivos, de reserva e vegetativos das plantas (Whitaker, 1994).

Os níveis mais altos de IPs podem ser encontrados em folhas de plantas jovens ou maduras (Broadway & Missurelli, 1990; Haq *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2005), demonstrando maior investimento em defesa contra inseto da planta em folhas mais nutritivas. Essas proteínas acumulam distante ou no local da injúria em resposta a estresse sofrido pela planta. Os níveis de mRNA dos IPs elevam nas folhas de 3 a 4 horas após a injúria. Os IPs assim que são produzidos são acumulados no vacúolo central das células vegetais, persistindo por até uma semana (Karban e Baldwin, 1997). Os IPs são produzidos por genes ativados pela via do jasmonato.

A ativação dos genes de defesa que codificam inibidores de proteases mostra que um sinal sistêmico é necessário para ativação (Fig 4). O ácido jasmônico é parte integral de um sistema de transdução de sinal intracelular que regula genes de defesa para inibidores de proteases. A planta ao ser ferida por um inseto produz um sinal sistêmico, a sistemina (peptídeo), ou quando a planta é injuriada por patógenos produz uma molécula-sinal, o oligouronídeo (polissacarídeo) (Farmer & Ryan 1992). A sistemina é um homônio-peptídeo e age na via sinalizadora octadecanóide que gera ácido jasmônico, um sinalizador que desencadeia o processo genético de defesa (Bari & Jones, 2009). A sistemina é expressa por genes na planta através de ferimentos por herbívoros ou mecanicamente e transportada para áreas da planta ainda intactas. A sistemina atua sobre a *mitogen activated protein* – MAP – cinase que ativa a fosfolipase e libera ácido linoleico das membranas celulares e aleno óxido-ciclase que gera o intermediário do ácido jasmônico, o ácido 12 – oxo – fitodienólico – OPDA. Esses eventos culminam no aumento da produção de ácido jasmônico o qual irá ativar as vias de defesa da planta contra herbivoria (Picchi *et al.*, 2009; Shivaji *et al.*, 2010).

Os inibidores de proteases são frequentes em sementes de plantas, podendo ter seus níveis elevados em tecidos das plantas por herbivoria (Koiwa *et al.*, 1997; Ryan, 2000; Bruinsma *et al.*, 2007). Os inibidores de serino proteases são os mais comuns em animais, microrganismos e plantas (Gomes *et al.*, 2005). Os IPs aumentam a resistência das plantas a insetos pragas, pois é abundante, estável a proteólise, resistente a variação de pH intestinal, e específico a determinadas enzimas digestivas de insetos (Jongsma & Boulter,

1997; Abdeen *et al.*, 2005). Os IPs encontrados em plantas são classificados em diferentes famílias.

Nessas pode ser encontrado os inibidores Kunitz que inclui SBTI, inibidor de tripsina da soja mais comum em plantas. Esse inibidor pode ser encontrado em Leguminosae, Mimosoideae, Papilionidae, Caealpiniodae (Chougule *et al.*, 2008). Outra família de inibidor é a Bowman–Birk (BBI) encontrado em Leguminosae, Fabaceae, Phaseolaceae, Glycinaceae e Viciae (Xavier-Filho & Campos, 1989). E tais compostos químicos podem atuar contra insetos pragas.

Os IPs apresentam efeitos adversos na fisiologia dos insetos. O berenil causa inibição das proteases do intestino da lagarta-da-soja, causando baixa atividade proteolítica (Paixão *et al.*, 2013). Os inibidores sintéticos do tipo benzamidina e bis-benzamidina também afetam essa lagarta, causando morte e comprometendo o desenvolvimento (Pilon *et al.*, 2006; Moreira, 2007; Pilon *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2011). IPs com toxinas Cry1Ac causaram mortalidade de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) (Lomate *et al.*, 2013). Inibidores de protease Xbpi-1 mataram *Acyrtosiphon pisum* (Hemiptera: Aphididae) (Jin *et al.*, 2014). Os inibidores do tipo scN (inibidor de cisteíno proteases de soja), pepistatina A (inibidor de aspartil proteases) e KI (inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz) ingeridos por *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Chrysomelidae), apresentaram inibição de cisteíno e aspartil proteases, afetando a fisiologia (Amirhusin *et al.*, 2007).

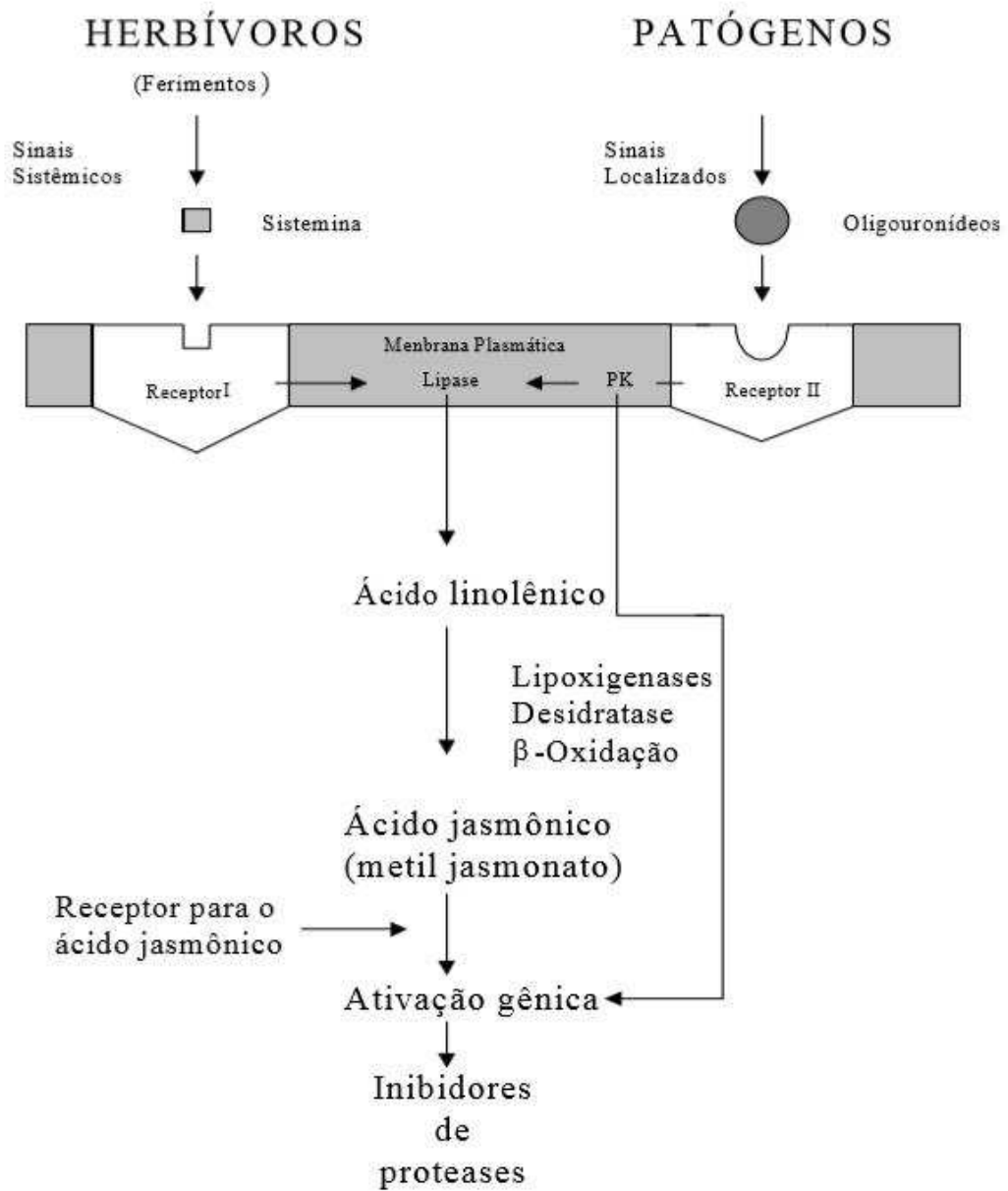


Figura 4 - Modelo proposto para a sinalização que regula a expressão de genes inibidores de proteases induzidas por fermento em folhas de tomate. (Farmer & Ryan, 1992).

## 2.7 - Efeitos de metabólitos secundários na biologia de insetos

A biologia dos insetos é afetada negativamente ao consumirem plantas com flavonóides resistentes a insetos (Anshul *et al.*, 2013; Samuel *et al.*, 2014). Isso afeta diretamente na duração dos estágios de desenvolvimento dos insetos e sua massa, além de causar mortalidade em condições extremas.

A duração dos estágios das ninfas de *Nezara viridula* (Linnaeus, 1778) (Hemiptera: Pentatomidae) aumentou ao serem alimentadas com genótipos de sojas IAC-17, 19 e 24 resistentes a insetos (Souza *et al.* 2012). A longevidade de adultos de *Piezodorus guildinii* (Westwood, 1837) (Hemiptera: Pentatomidae) foi menor que o controle ao ser alimentados com as sojas resistentes a insetos IAC-17, 18, 19 e 24 (Silva *et al.*, 2013). A duração larval de *A. gemmatalis* e de *Trichoplusia ni* (Hubner, 1800) (Lepidoptera: Noctuidae) aumentou por consumir sojas resistentes a insetos (Hoffmann-Campo *et al.* 2001; Piubelli *et al.*, 2005).

A massa corporal de insetos também pode ser afetada por plantas resistentes. A massa de adultos de *P. guildinii* diminuiu ao serem alimentados com sojas resistentes (Silva *et al.*, 2013). A massa das ninfas diminuiu após alimentação com soja IAC-17 (Souza *et al.*, 2012). A massa de pupas de *T. ni* alterou ao serem submetidas a alimentação com soja resistente PI 227687 (Hoffmann-Campo *et al.*, 2001). A massa de *A. gemmatalis* diminuiu após o consumo de sojas resistentes (Piubelli *et al.*, 2005).

A soja resistente também pode causar mortalidade nos insetos. A mortalidade ocorre por se alimentarem de plantas contendo compostos químicos tóxicos (Jayanthi *et al.*, 2012; Gautam *et al.*, 2013). A mortalidade de *N. viridula* foi acetuada após ter consumido IAC-19 e 24 (Souza *et al.*, 2012). A

mortalidade de ninfas de *P. guildinii* foi maior que o controle quando alimentados com cultivares de soja IAC-19 (Silva *et al.*, 2013). A mortalidade de pupas de *T. ni* foi aumentada ao alimentar de soja PI 227687, resistente a insetos (Hoffmann-Campo *et al.*, 2001). A mortalidade de larvas de *A. gemmatalis* foi maior que o controle quando consumiram o cultivar de soja IAC-100, resistente a insetos (Piubelli *et al.*, 2005).

Metabólitos secundários presentes em plantas resistentes são as causas diretas de danos na vida dos insetos. Os metabólitos secundários em dieta apresentam efeitos adversos na biologia dos insetos (Shwetha *et al.*, 2011; Samuel *et al.*, 2014). Rutina isolada ou combinada com caseína diminui a massa de larvas e pupas de *A. gemmatalis* e de *T. ni* (Hoffmann-Campo *et al.*, 2001; Hoffmann-Campo *et al.*, 2006; Salvador *et al.*, 2010). Esses compostos químicos também afetaram a duração larval de *A. gemmatalis* (Salvador *et al.*, 2010). A rutina alongou a duração do tempo de pupas *T. ni* (Hoffmann-Campo *et al.*, 2001). Rutina e quercetina aumentou a duração larval de *A. gemmatalis* (Gazzoni *et al.*, 1997). Esses flavonóides causaram mortalidade de *A. gemmatalis* (Gazzoni *et al.*, 1997). Os flavonóides são responsáveis pela mortalidade de coleópteras pragas de grãos armazenados (Nenaah *et al.*, 2012). A azadiractina é responsável por matar lagartas *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) (Kaur *et al.*, 2014).

### **3 - OBJETIVO GERAL**

Avaliar a resposta fitoquímica induzida em cultivares de soja resistentes e suscetível injuriadas por *A. gemmatalis* e as influências dessas plantas na biologia do inseto.

#### **3.1 - Objetivos Específicos**

- 1) Identificar os flavonóides em folhas de soja atacadas por *A. gemmatalis* utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- 2) Quantificar os flavonóides em folhas de soja atacadas por *A. gemmatalis* utilizando a técnica de CLAE;
- 3) Identificar os flavonóides em folhas de soja injuriadas mecanicamente utilizando a técnica de CLAE;
- 4) Quantificar os flavonóides em folhas de soja injuriadas mecanicamente utilizando a técnica de CLAE;
- 5) Determinar inibidores de proteases em folhas de soja injuriadas por *Anticarsia gemmatalis*;
- 6) Determinar a mortalidade das lagartas-da-soja alimentadas com cultivares de soja;
- 7) Determinar o desenvolvimento de lagartas-da-soja alimentadas com cultivares de soja.

## 4 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada a Agropecuária (BIOAGRO) e no Laboratório de Biodiversidade do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

### 4.1 - Criação da Lagarta-da-Soja *Anticarsia gemmatalis*

Ovos de *A. gemmatalis* foram obtidos do Centro Nacional de Pesquisa da Soja (CNPSo), Londrina, Paraná, e mantidos no Laboratório de Criação de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, a  $26 \pm 2$  °C de temperatura,  $70 \pm 5$  % de umidade relativa do ar. A lagarta-da-soja apresenta ciclo biológico com duração entre três e quatro semanas (Hoffman-Campo *et al.*, 1985) e suas formas adultas foram obtidas de pupas e colocadas em placas de Petri no interior de gaiola telada de dimensões 50 x 50 cm, revestida internamente com folhas de papel sulfite, A4. Após o quarto dia, as mariposas emergiram e foram alimentadas 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 um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de Petri.

A postura de *A. gemmatalis* ocorreu após o terceiro dia, na superfície do papel que reveste internamente a gaiola. Estas folhas de papel foram retiradas e cortadas em tiras de 2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento e colocadas

em copos plásticos de 500 mL com um orifício circular na tampa de aproximadamente 2 cm, onde foi acoplada uma tela de filó. Estes copos foram então transferidos para uma câmara climatizada a 25 °C, com umidade relativa do ar de 60 ± 10% e fotoperíodo de 14 horas mantido por “timers” acoplados a lâmpadas tipo luz-do-dia. No segundo ou terceiro dia após observar a eclosão dos ovos, iniciou-se a alimentação das larvas de *A. gemmatalis* baseada na metodologia de Hoffman-Campo *et al.* (1985), colocando-se um cilindro de dieta artificial em cada copo plástico.

#### 4.1.1 - Preparo da dieta artificial

A dieta artificial foi preparada utilizando diversos ingredientes e sua composição está de acordo a apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição da dieta artificial utilizada no experimento com lagarta-da-soja.

Ingredientes	Composição (g/100 g de mistura)
Feijão mulatinho cozido	4,8
Levedo de cerveja	2,4
Germe de trigo	3,8
Proteína de soja	3,8
Caseína	1,9
Agar-agar	1,34
Ácido ascórbico	0,23
Ácido sórbico	0,11
Solução vitamínica	0,38
Nipagin	0,19
Formol 40%	0,23

Todos os ingredientes, exceto ácido ascórbico, ácido sórbico, nipagin, formol e solução vitamínica, foram processados e misturados, nesta ordem, com o auxílio de um liquidificador industrial. A mistura foi autoclavada por 1 hora a pressão de 1,5 kgf/cm<sup>2</sup>, em seguida foi transferida novamente para o liquidificador, misturada e adicionada de ácido ascórbico (6 g), ácido sórbico (3 g), nipagin (metilparabeno) (5 g), formol 40% (6 mL) e 10 mL de solução vitamínica composta por niacinamida (1 mg), pantotenato de cálcio (1 mg), tiamina (0,25 mg), riboflavina (0,50 mg), piridoxina (0,25 mg), ácido fólico (0,25 mg), biotina (0,02 mg), inositol (20 mg) e água (1L), até formar uma pasta homogênea, que foi transferida ainda quente para recipientes plásticos com tampa. A pasta obtida foi resfriada em câmara germicida acondicionada com luz ultravioleta e conservada a 4 °C.

#### **4.2 - Cultivares de soja e resposta fitoquímica à injúria mecânica**

Sementes das cultivares de soja IAC-PL1 (suscetível a insetos), IAC-17 e IAC-24 (resistente a insetos) foram obtidas do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) de São Paulo, Brasil e cultivadas até o estágio V3, conforme caracterização feita por Fehr & Caviness (1977). As plantas foram cultivadas em vasos de 4 Kg de substrato e mantidos em casa de vegetação sob as condições de temperatura de 25 °C  $\pm$  5 e umidade 70%  $\pm$  10.

Os três cultivares de soja foram submetidos a injúria mecânica utilizando perfurador de papel, onde as plantas permaneceram em casa de vegetação por 24 horas. Para cada cultivar foi mantido um controle. Este tratamento foi realizado com três repetições (vasos), e em cada vaso (três) havia três plantas

de soja. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Após a planta ter atingido o estágio de desenvolvimento V3 (Fehr & Caviness, 1977), foi feita a coleta dos folíolos injuriados e não injuriados (controle) para análise dos flavonóides.

Em seguida, foi preparado novo experimento utilizando-se o cultivar de soja IAC-24, avaliando-o em quatro tempos distintos (0, 6, 12 e 24 horas), para verificação de resposta fitoquímica por dano mecânico (Zabaras & Wyllie 2001). Para cada tempo descrito acima foi feito o controle com plantas não injuriadas. Este experimento foi realizado em esquema fatorial e o delineamento foi inteiramente casualizado, com três repetições e cada repetição consistiu de um vaso contendo três plantas. Após os tempos estabelecidos, a terceira folha trifoliolada da soja foi retirada de cada planta para análise de flavonóides.

As amostras coletadas foram acondicionadas em pacotes de papel alumínio, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C para análise de compostos químicos.

#### **4.2.1 - Cultivares de soja e resposta fitoquímica à injúria biológica**

Para este experimento, os cultivares de sojas IAC-PL1, IAC-17 e IAC-24 foram mantidos em casa de vegetação sob as condições de temperatura de 25 °C  $\pm$  5 e umidade 70%  $\pm$  10. As plantas foram cultivadas em vaso contendo 4 Kg de substrato até o estágio de desenvolvimento V3, conforme caracterização feita por Fehr & Caviness (1977).

Estes três cultivares foram submetidos a injúria por lagartas de *A. gemmatilis* durante 24 horas. Para cada cultivar foi mantido um controle. Este

tratamento foi realizado em três repetições e em cada vaso havia três plantas. Para cada vaso foram colocadas três lagartas, sendo uma por planta. A lagarta foi mantida na folha da planta com auxílio de um saco de organza. Esse trabalho foi executado em delineamento inteiramente casualizado. Após a planta ter atingido o estágio de desenvolvimento V3 (Fehr & Caviness, 1977), foi feita a coleta dos folíolos injuriados e não injuriados (controle) para análise dos flavonóides.

Em seguida, foi preparado um outro experimento utilizando-se o cultivar de soja IAC-24, avaliando-o em 4 tempos distintos (0, 12, 24, 36, 48 horas) (Piubelli *et al.*, 2003; Mohanta *et al.*, 2012), para verificação de resposta fitoquímica por dano biológico causado por *A. gemmatilis*. Para cada tempo descrito acima foi feito o controle com plantas não injuriadas. Este experimento foi realizado em esquema fatorial e o delineamento foi inteiramente casualizado, com três repetições e cada repetição consistiu de um vaso contendo três plantas. Após os tempos estabelecidos, a terceira folha trifoliolada da soja foi coletada, acondicionadas em pacotes de papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer -80 °C para análise de flavonóides e inibidores de proteases.

#### **4.2.2 - Obtenção do extrato foliar para análise de flavonóides**

O extrato foliar dos cultivares de soja foi preparado a 4 °C. As folhas foram pesadas (500 mg), e maceradas em almofariz com pistilo utilizando-se nitrogênio líquido. O pó obtido foi transferido para tubos plásticos de 15 mL com 5,0 mL de metanol 80% e mantidos em banho de ultrassom por 20 min, e

em seguida, centrifugados a 3.000 g por 5 min a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram evaporados em concentrador *speed vacuum* e os extratos secos ressuspensos com 2 mL de metanol absoluto, filtrados com filtro PTFE 0,45 µm e acondicionados em *vials*.

#### **4.2.3 - Identificação e quantificação dos flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)**

Das amostras obtidas anteriormente, retirou-se uma alíquota de 30 µl e injetou-se no cromatógrafo (Shimadzu Prominence - bomba LC - 20 AD, detector SPD - M 20 A, forno CTO - 20 A, programa LabSolutions) com uma coluna de fase reversa para detecção dos metabólitos secundários (C-18, 4,6 x mm diâmetro interno, 150 mm de comprimento, 4,8 µm diâmetro das partículas). Os extratos foram eluídos com gradiente segmentado constituído de solução de ácido acético 2% (A) e acetonitrila (B). A força cromatográfica da fase móvel variou na proporção 0 - 4 min 5 % B; 4 - 15 min 20% B; 15 - 20 min 35% B; 20 - 30 min 90% B; 30 - 40 5% B; sendo utilizada uma temperatura de 40 °C (CTO – 20 A). O fluxo do solvente foi de 0.6 mL/ min e absorção mensurada em 254 nm (DAD).

Os flavonóides foram avaliados quantitativamente por comparação com padrões (Sigma®) desses compostos através de injeções de canferol, daidzeína, daidzina, genisteína, genistina, quercetina e rutina no cromatógrafo. Em caso de diagnóstico positivo para um desses compostos uma curva de calibração foi construída. Curvas de calibração foram realizadas com injeção de concentrações de daidzina (1,2; 2,4; 3,6; 4,8 µg), quercetina (0,8; 1,6; 2,4;

3,2 µg) e rutina (0,8; 1,6; 2,4; 3,2 µg). As curvas de regressão linear foram obtidas, a partir da concentração da área do pico desses compostos, para realização dos cálculos de concentração de flavonóides nas amostras.

#### **4.3 - Obtenção do extrato foliar para determinação de inibidores de proteases em folhas de soja**

O preparo do extrato bruto foi realizado a 4 °C, de acordo com o método descrito por Ohta *et al.* (1986), modificado por Batista *et al.* (2002). As folhas de soja, após terem sido pesadas, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e trituradas em almofariz. O pó obtido foi macerado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, na proporção de 1:3 (p/v) e em seguida centrifugado a 17.200 g por 60 minutos a 4 °C. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para as determinações da concentração de proteína total e avaliação da concentração de inibidor de proteases.

##### **4.3.1 - Determinação de inibidores de proteases**

A presença de inibidores de proteases no extrato bruto foliar foi determinada utilizando-se tripsina bovina. A atividade trípica, na presença de inibidores, consistiu no seguinte procedimento analítico: a) para a análise do teste: 50 µL do extrato; 500 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio, e 50 µL da solução de tripsina  $4,7 \times 10^{-5}$  M foram adicionados em um tubo de ensaio; b) para o controle da enzima foram adicionados, em outro tubo de ensaio, 550 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de

cloreto de cálcio e 50 µL da solução de tripsina  $4,7 \times 10^{-5}$  M. c) para o Branco: 1000 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 500 µL de L-BApNA 1,2 mM. Essa mistura contida em ambos os tubos (teste e controle da enzima, respectivamente) foi incubada por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após transcorrido o tempo de incubação, 500 µL da mistura de incubação, do teste e do controle, foram retirados e adicionados a outro tubo com 500 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20mM de cloreto de cálcio e 500 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM. Todas as amostras foram analisadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 410 nm por 2,5 min.

Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{mg de tripsina inibida/ grama de proteína} = \frac{(A \times B)}{(C \times 1.000 \times P)}$$

A = Absorvância a 410 nm do controle – absorvância a 410 nm da amostra;

B = Diluição da amostra;

P = Concentração em mg/mL de proteínas dos extratos;

C = Fator de tripsina, ou seja, o produto de atuação de 1 µg de tripsina ativa sobre o substrato D, L-BApNA dá uma leitura de absorvância de 0,019 em 410 nm (Kakade *et al.*, 1974).

#### **4.3.2 - Determinação da concentração de proteína nos extratos**

A concentração de proteína dos extratos enzimáticos de *A. gemmatalis* foi obtida segundo o método descrito por Bradford (1976), utilizando como padrão uma solução 0,2 mg/mL de (BSA).

#### **4.4 - Desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com folíolos de sojas resistentes a insetos**

As mariposas utilizadas neste experimento foram obtidas da criação descrita no item 3.1. Estas mariposas ovopositaram em folhas de papel A4 e após a eclosão dos ovos as larvas foram alimentadas com folíolos de soja sem resistência a insetos durante o primeiro instar. A seguir, essas larvas foram alimentadas com dieta artificial, soja suscetível a insetos, IAC- PL1, e dois cultivares de soja resistentes a insetos, IAC – 17 e IAC – 24. Para cada tratamento utilizou-se 20 lagartas, e estas foram distribuídas em cinco recipientes plásticos de 100 mL, colocaram-se quatro lagartas por recipiente, totalizando cinco repetições. O delineamento utilizado para esses tratamentos foi inteiramente casualizado. E ao longo do tempo foi avaliada a mortalidade e a duração da fase larval das lagartas-da-soja.

#### **4.5 - Análises Estatísticas**

Os experimentos foram analisados no programa estatístico R, considerando 5% de erro. Os dados foram analisados quanto a normalidade

com o teste de Shapiro test, e homogeneidade das variâncias no programa Sigmaplot 12.5. Após essas verificações foi aplicada a ANOVA, seguida de teste de Tukey. Os dados que não seguiram a normalidade ou tiveram heterodasticidade nas variâncias foram ajustados com glm utilizando-se quasipoisson.

## 5 – RESULTADOS

### 5.1 - Identificação de flavonóides em cultivares de soja.

As cultivares de soja suscetível (IAC-PL1) e resistente (IAC-17 e 24) a insetos injuriadas mecanicamente (Figura 1) e por *A. gemmatalis* (Figura 2 e 3) apresentaram três picos, sendo identificados os compostos daidzina, quercetina e rutina.

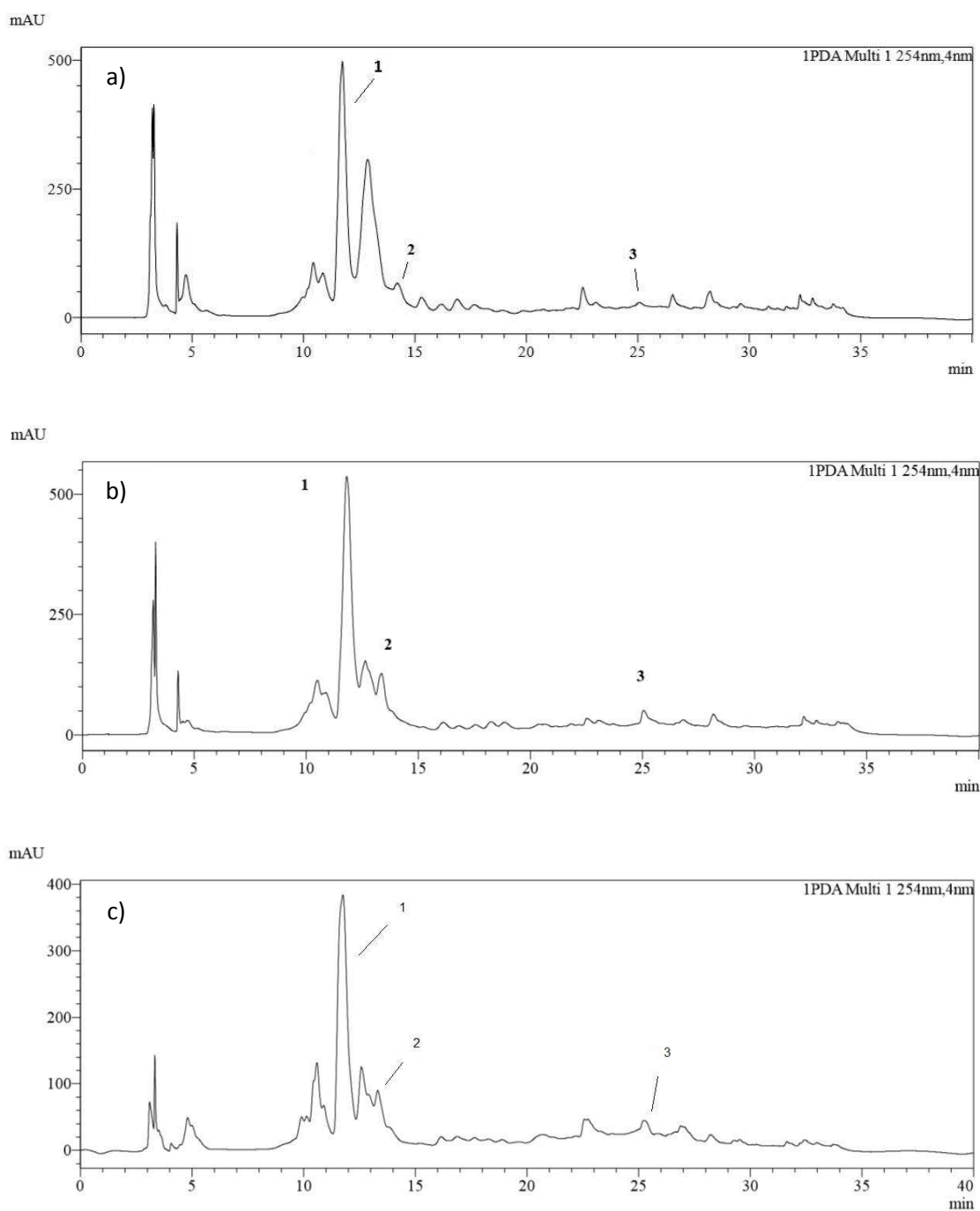


Figura 5 – Cromatogramas das cultivares de soja IAC-PL1, controle (a), com injuria mecânica (b) e injuriada por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (c). Os compostos daidzina (1), (tempo de retenção - TR 11,6 min), rutina (2), (TR 13,7 min) e quercetina (3), (TR 25 min) foram indetificados.

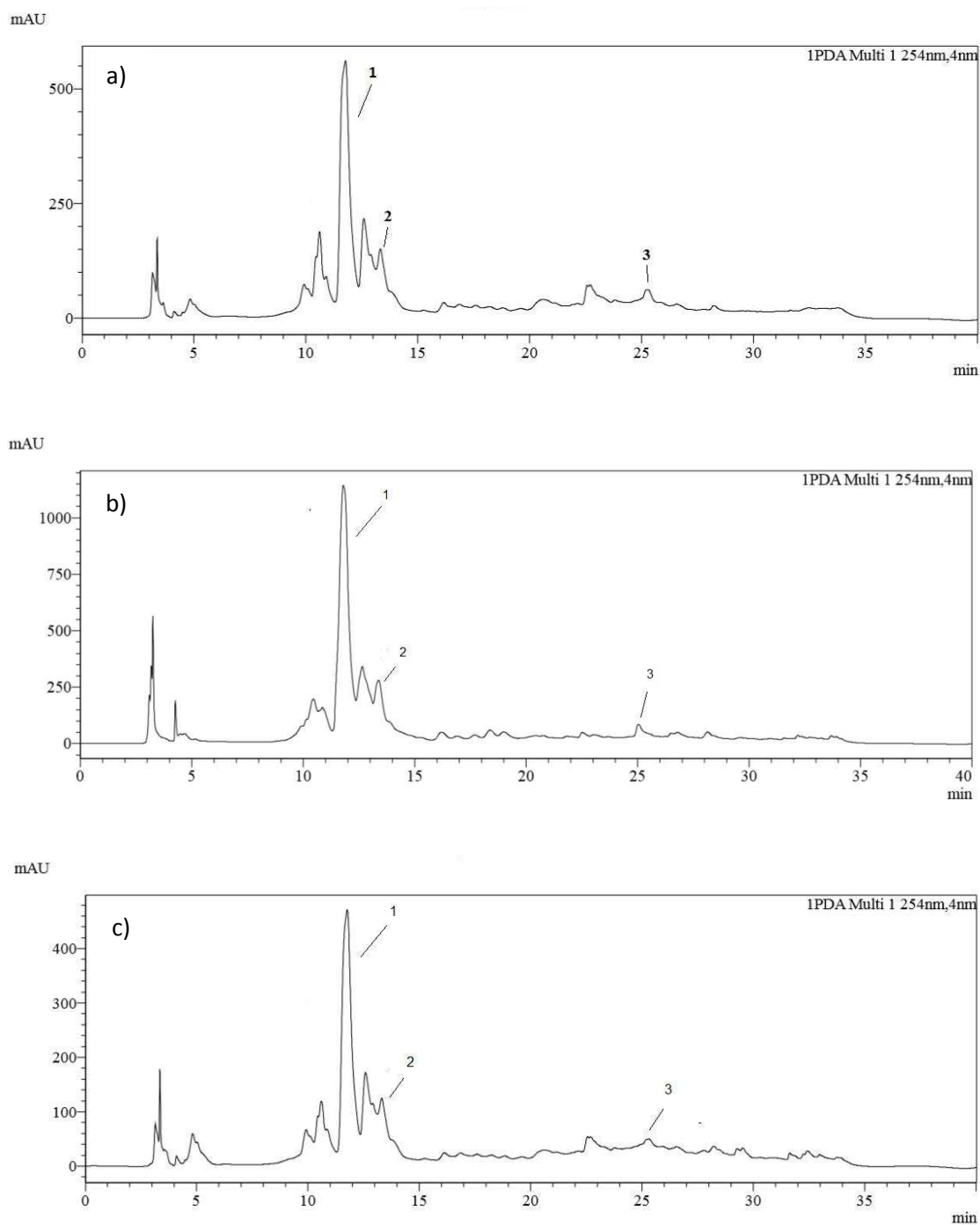


Figura 6 – Cromatogramas das cultivares de soja IAC-17, controle (a), com injuria mecânica (b) e injuriada por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (c). Os compostos daidzina (1), (tempo de retenção - TR 11,6 min), rutina (2), (TR 13,7 min) e quercetina (3), (TR 25 min) foram indetificados.

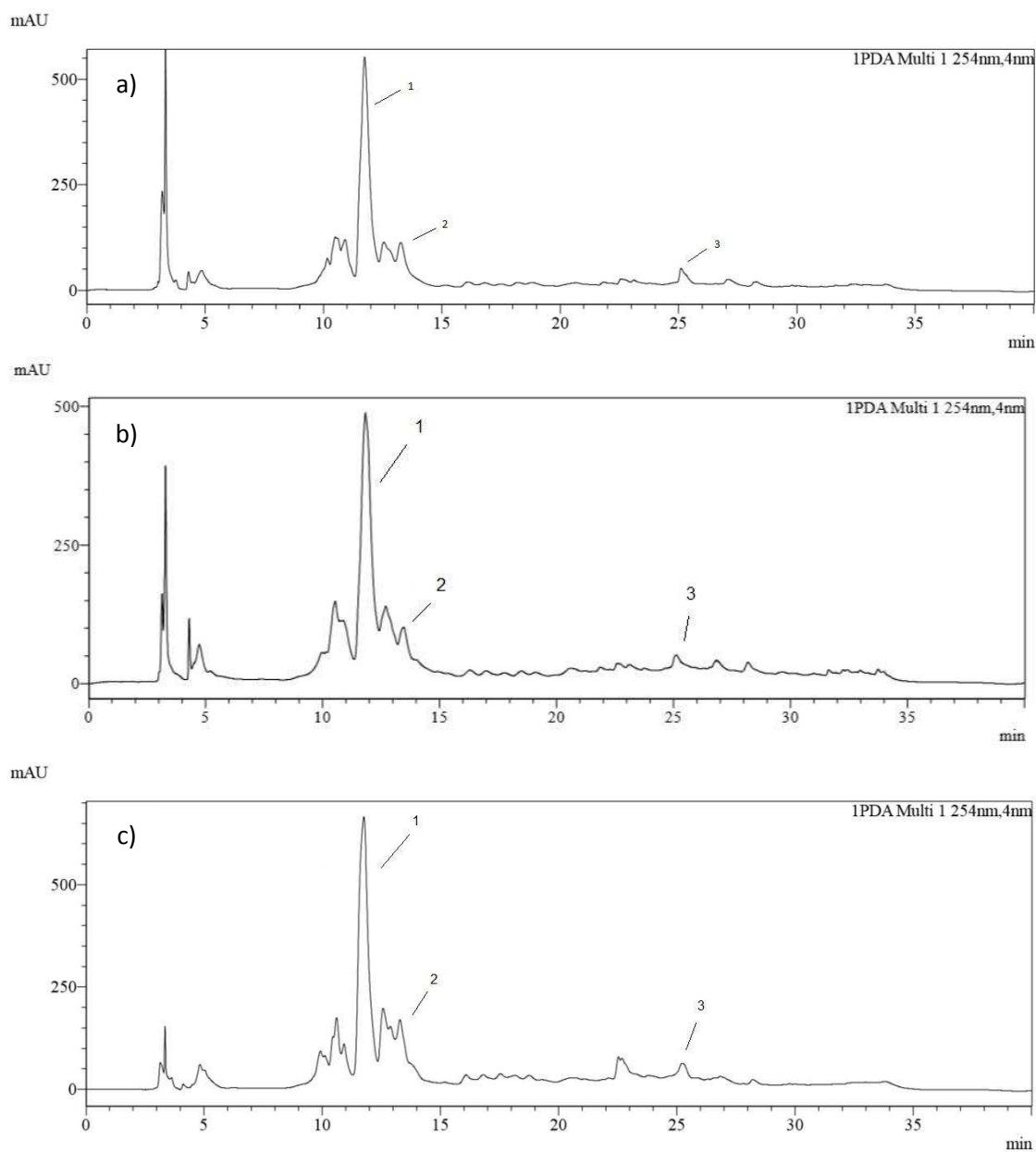


Figura 7 – Cromatogramas das cultivares de soja IAC-24, controle (a), com injuria mecânica (b) e injuriada por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (c). Os compostos daidzina (1), (tempo de retenção - TR 11,6 min), rutina (2), (TR 13,7 min) e quercetina (3), (TR 25 min) foram identificados.

### 5.1.1 - Resposta fitoquímica dos cultivares de soja por dano mecânico e biológico

As concentrações dos flavonóides daidzina, quecertina e rutina não diferiram estatisticamente entre as cultivares IAC-PL1, IAC-17 e IAC-24 com e sem injúria mecânica e injuriadas por *A. gemmatalis* ( $P > 0,05$ ) após 24 horas (Tabela 2) (Figura 4, 5 e 6).

Tabela 2- Concentração(mg/g) de rutina, daidzina e quercetina nos cultivares de soja injuriadas por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e injuriadas mecanicamente por 24 horas.

Tratamentos	Rutina (mg/g)		Daidzina (mg/g)		Quercetina (mg/g)	
	Média	Dp	Média	Dp	Média	Dp
IAC-17 Controle	0,036	+ 0,034	0,216	+ 0,113	0,014	+ 0,006
IAC-17 Mecânico	0,016	+ 0,011	0,207	+ 0,089	0,014	+ 0,007
IAC-17 Biológico	0,013	+ 0,012	0,287	+ 0,049	0,009	+ 0,002
IAC-24 Controle	0,042	+ 0,010	0,253	+ 0,057	0,011	+ 0,003
IAC-24 Mecânico	0,033	+ 0,001	0,242	+ 0,017	0,011	+ 0,003
IAC-24 Biológico	0,033	+ 0,001	0,213	+ 0,017	0,010	+ 0,001
IAC-PI1 Controle	0,019	+ 0,009	0,051	+ 0,009	0,009	+ 0,003
IAC-PI1 Mecânico	0,020	+ 0,004	0,042	+ 0,013	0,009	+ 0,003
IAC-PI1 Biológico	0,013	+ 0,012	0,086	+ 0,035	0,007	+ 0,001

Entre os tratamentos não houve diferenças significativas pela Anova,  $P > 0,05$ .

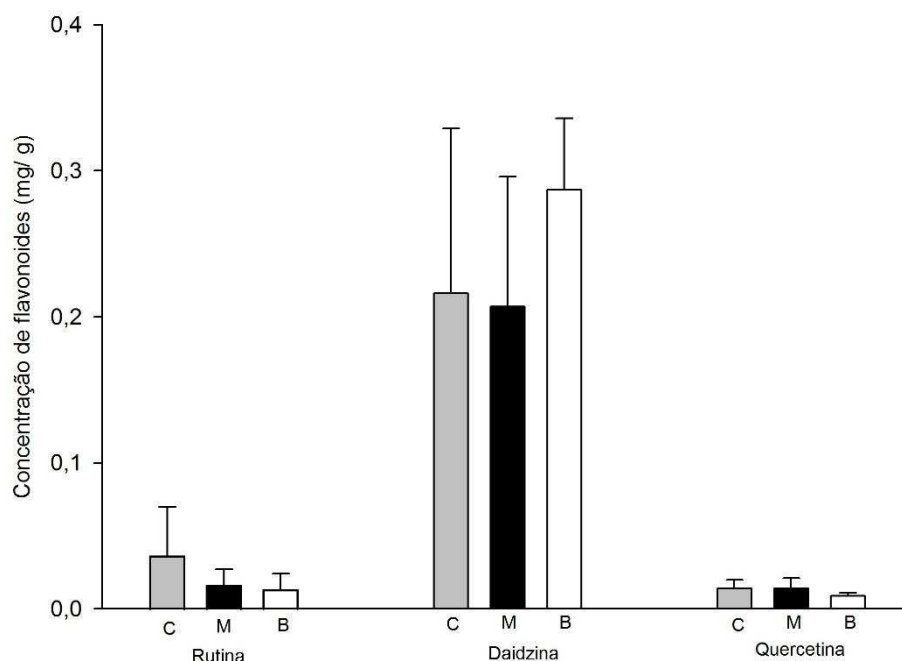


Figura 8 – Concentração de rutina, daidzina e quercetina na cultivar IAC-17: controle (C), injuriadas mecanicamente (M) e injuriadas por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (B) por 24 horas. Entre os tratamentos (Rutina  $F_{2,9} = 1,15$   $P > 0,05$ ; Daidzina  $F_{2,9} = 0,67$   $P > 0,05$ ; Quercetina  $F_{2,9} = 1,73$   $P > 0,05$ ) não houve diferenças significativas pela ANOVA.

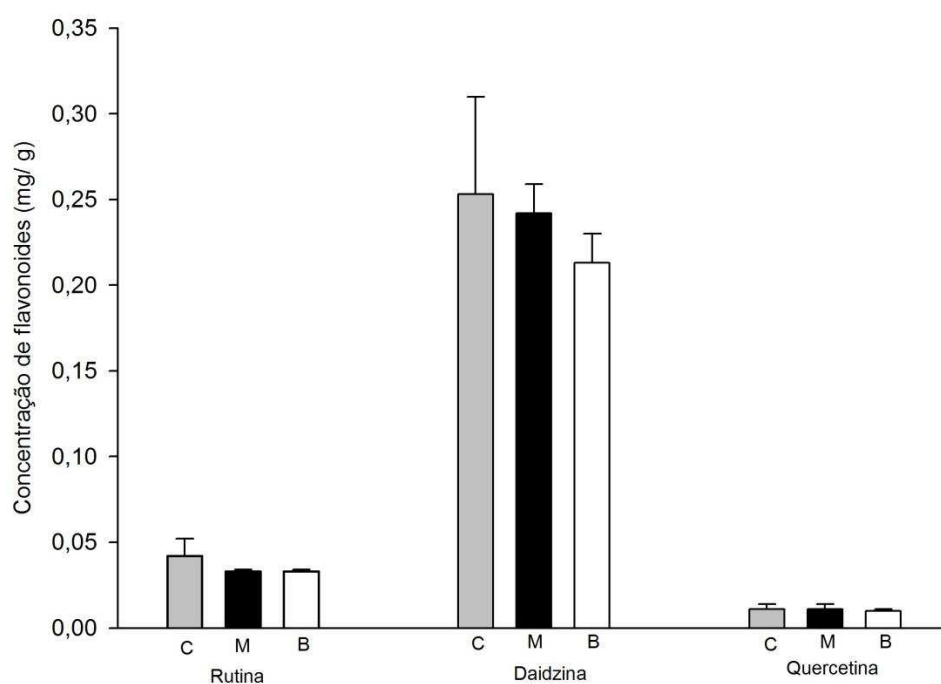


Figura 9 – Concentração de flavonóides rutina, daidzina e quercetina na cultivar de soja IAC-24: controle (C), injuriadas mecanicamente (M) e injuriadas por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (B) por 24 horas. Entre os tratamentos (Rutina  $F_{2,9} = 2,35$   $P > 0,05$ ; Daidzina  $F_{2,9} = 0,81$   $P > 0,05$ ; Quercetina  $F_{2,9} = 0,47$   $P > 0,05$ ) não houve diferenças significativas pela ANOVA.

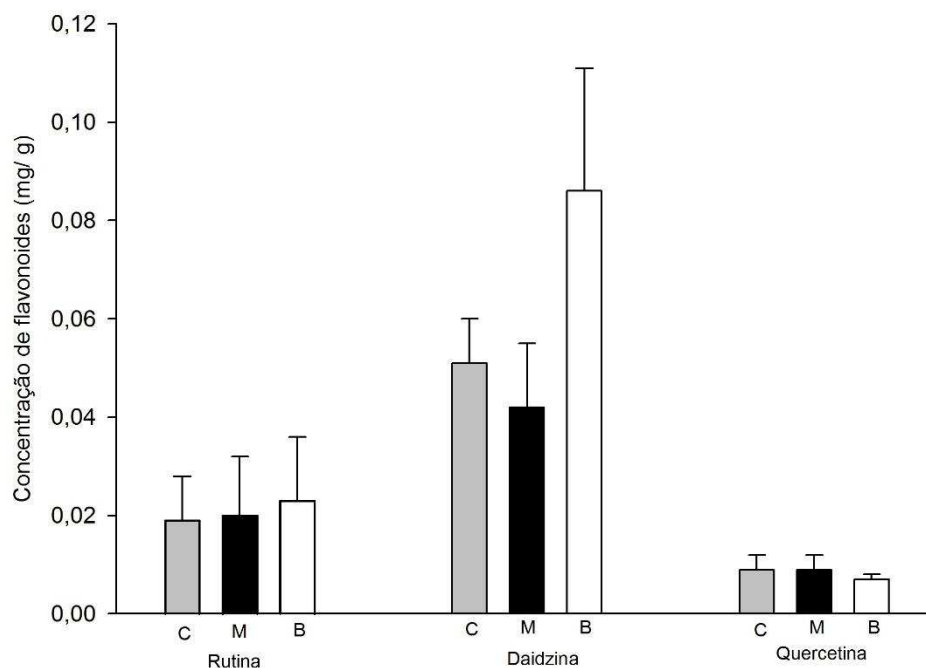


Figura 10 – Concentração de flavonóides rutina, daidzina e quercetina em plantas de soja IAC-PL1: controle (C), injuriadas mecanicamente (M) e injuriadas por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (B) por 24 horas. Entre os tratamentos (Rutina  $F_{2,9} = 0,45$   $P > 0,05$ ; Daidzina  $F_{2,9} = 3,54$   $P > 0,05$ ; Quercetina  $F_{2,9} = 0,52$   $P > 0,05$ ) não houve diferenças significativas pela Anova.

### 5.1.2 - Concentração de flavonóides no cultivar de soja IAC-24 injuriadas mecanicamente e por *A. gemmatalis* em função do tempo

A concentração de flavonóides daidzina, rutina e quercetina em plantas do cultivar de soja IAC-24 atacadas por *A. gemmatalis* ou injuriadas mecanicamente foi semelhante às do controle nos diferentes períodos de avaliação ( $P > 0,05$ ), (Fig. 7 e 8).

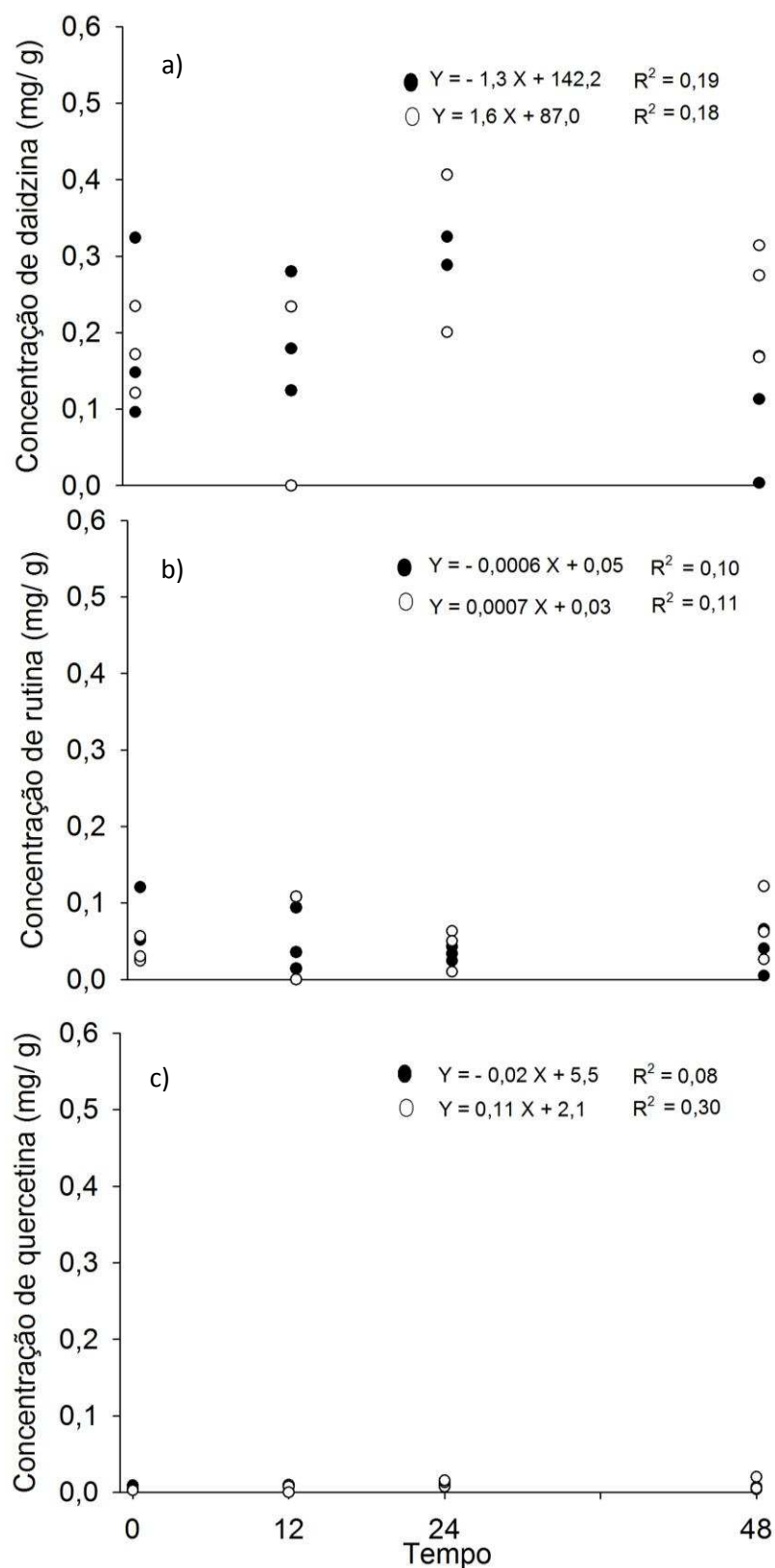


Figura 11 - Concentração de flavonóides em folíolos de soja injuriadas por *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). O círculo fechado indica plantas atacadas pela lagarta e o círculo aberto, controle. (a) Daidzina ( $F_{1,20} = 2,17$   $P > 0,05$ ); (b) Rutina ( $F_{1,20} = 2,43$   $P > 0,05$ ); (c) Quercetina ( $F_{1,20} = 3,63$   $P > 0,05$ ) não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Covariância.

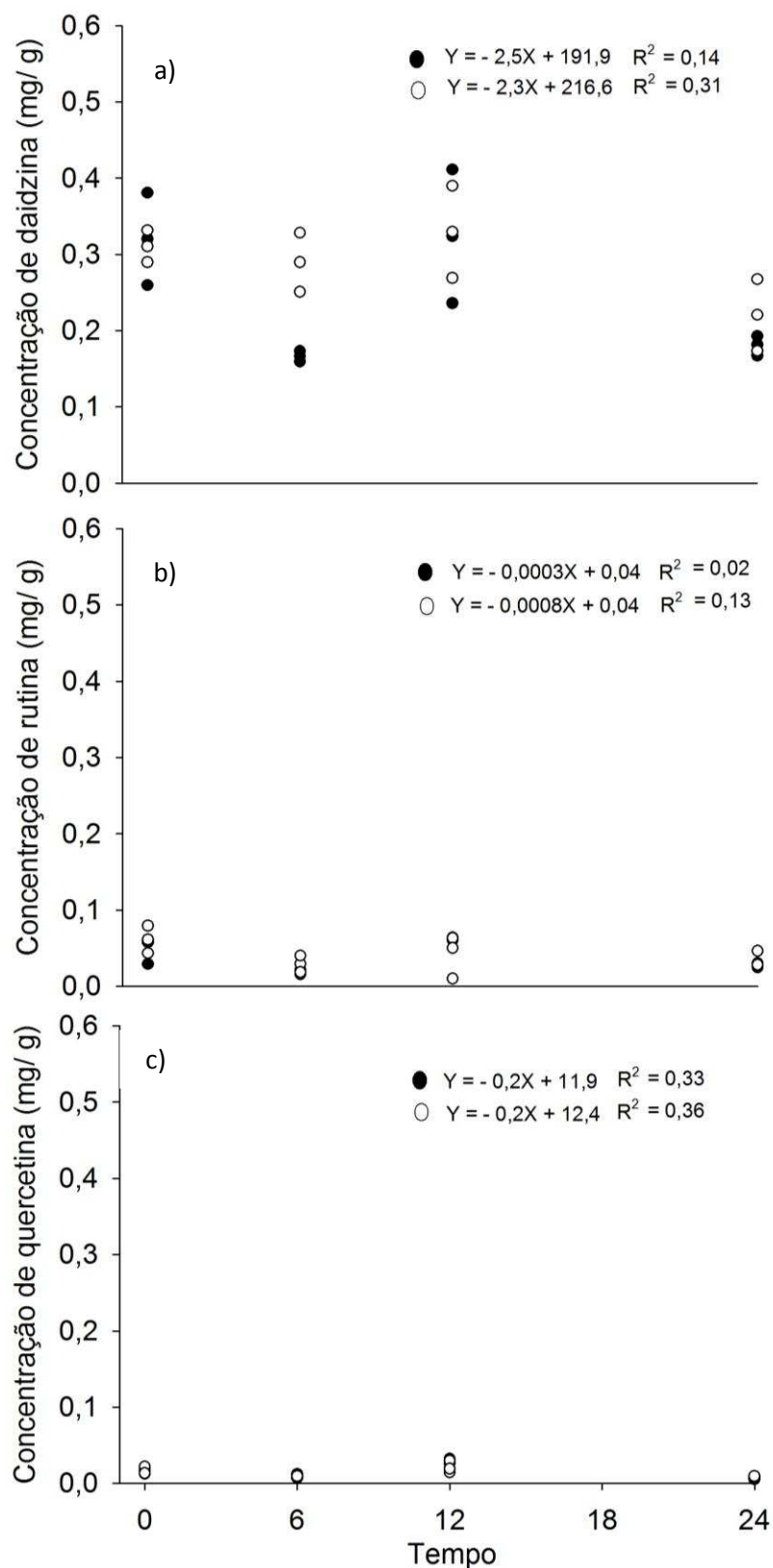


Figura 12 - Concentração de flavonóides em folíolos de sojas injuriadas por dano mecânico. O círculo fechado indica plantas injuriadas por dano mecânico e o círculo aberto, controle. (a) Daidzina ( $F_{1,20} = 0,008$   $P > 0,05$ ); (b) Rutina ( $F_{1,20} = 0,25$   $P > 0,05$ ); (c) Quercetina ( $F_{1,20} = 0,008$   $P > 0,05$ ) não apresentaram diferenças significativas pelo teste de Covariância.

### 5.1.3 - Concentração de flavonóides em sojas resistentes a insetos

Na cultivar IAC-17 a concentração dos flavonóides, daidzina, quercetina e rutina apresentaram diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ), com valores de 0,207; 0,014 e 0,016 mg/g (p/p), respectivamente. O extrato foliar da IAC-24 mostrou maior concentração de daidzina ( $P < 0,05$ ) em relação à quercetina e rutina, 0,242; 0,011 e 0,033 mg/g (p/p), respectivamente (Figura 9).

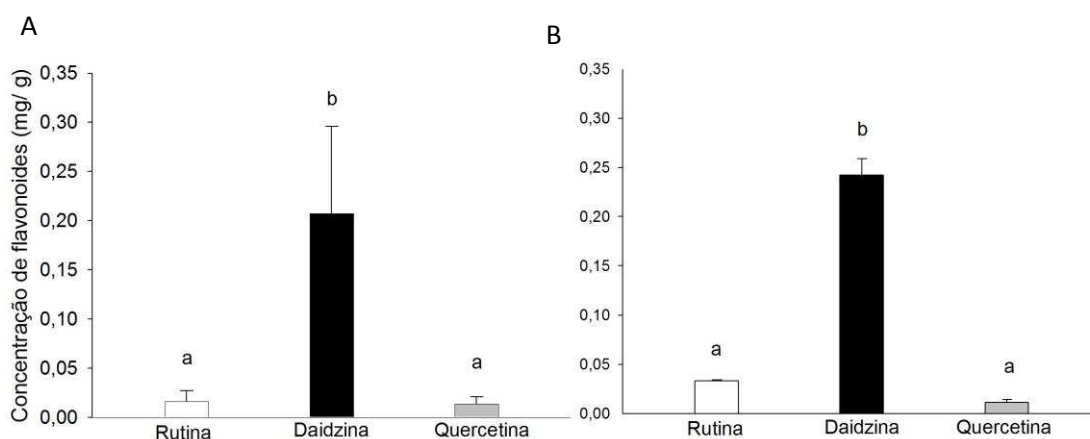


Figura 13 - Concentração de flavonóides em extrato foliar de cultivares de sojas resistentes a insetos IAC 17 (A) e IAC 24 (B) injuriadas mecanicamente. As médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A concentração dos flavonóides entre as cultivares resistente e suscetível a insetos mostrou diferença significativa, para o composto rutina e daidzina ( $P < 0,05$ ), enquanto que a quercetina teve valores iguais nas cultivares IAC-17, IAC-24 e PL1 (Figura 10).

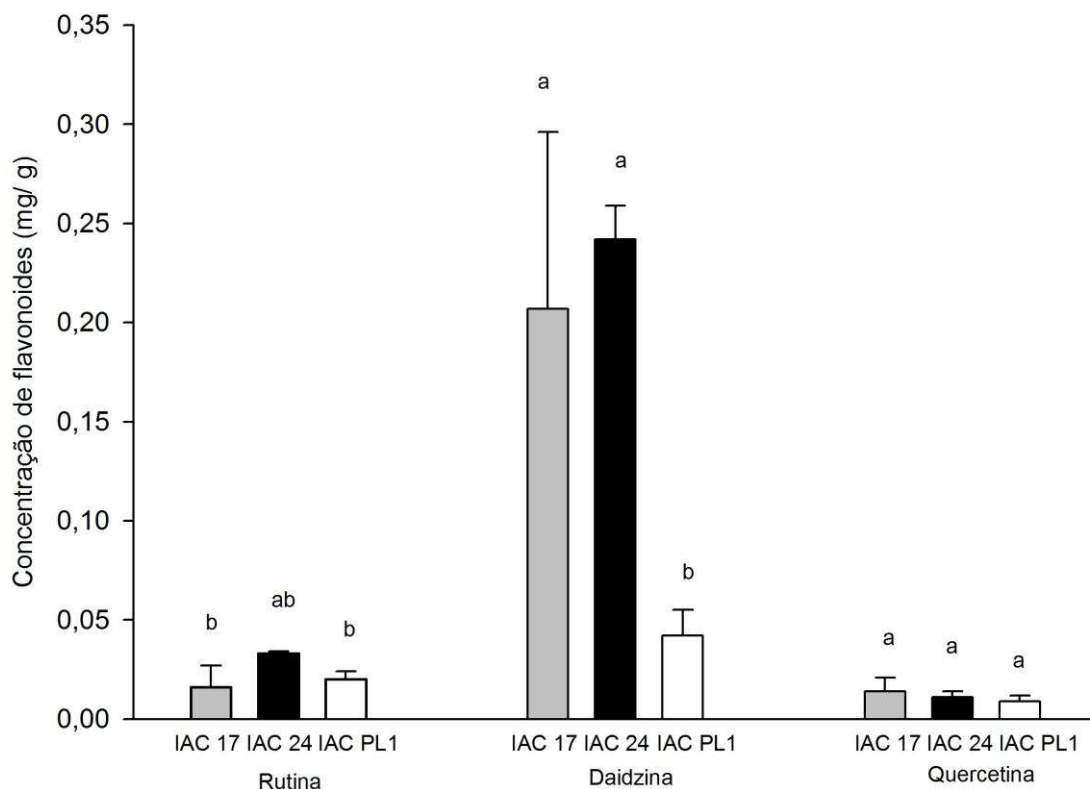


Figura 14 - Concentrações de flavonóides nas cultivares de soja (IAC-17, 24) resistente e suscetível a insetos (IAC-PL1), injuriadas mecanicamente. As médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 5.2 - Defesa por inibidores de proteases da soja

O extrato bruto das cultivares IAC-24 atacada por *A. gemmatilis* apresentou diferença estatística ( $P < 0,05$ ) para inibição da tripsina nos tempos de 12 h, 24 h, e 36 h. Para o tempo zero não houve diferença significativa para inibição da tripsina (Figura 11).

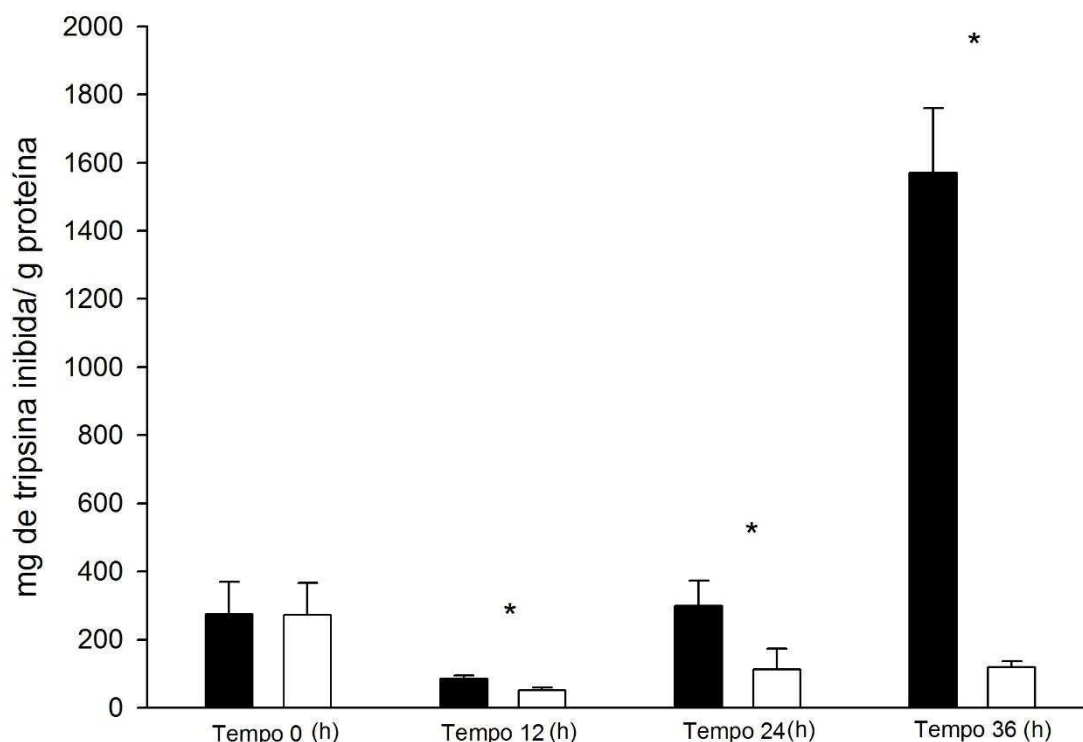


Figura 15 – Inibição da tripsina pelo extrato de folhas da cultivar IAC-24 injuriada por *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (barras escuras) e controle (barras claras). Os tratamentos sinalizados com asteriscos apresentam diferença estatística pelo teste de ANOVA (Tempo 0 h,  $F_{1,4} = 0,0008$   $P < 0,05$ ; Tempo 12 h,  $F_{1,4} = 23,97$   $P < 0,05$ ; Tempo 24 h,  $F_{1,4} = 11,19$   $P < 0,05$ ; Tempo 36 h,  $F_{1,4} = 341,33$   $P < 0,05$ ).

### 5.3 - Resposta biológica de lagarta-da-soja *A. gemmatalis* após consumo de soja resistente

A mortalidade das lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta, soja suscetível (IAC-PL1) e resistentes (IAC-17, IAC-24) apresentou diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) (Figura 12). A duração da fase larval de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta (controle), soja suscetível (IAC-PL1) e resistente (IAC-17 e IAC-24) também apresentou diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) (Figura 13).

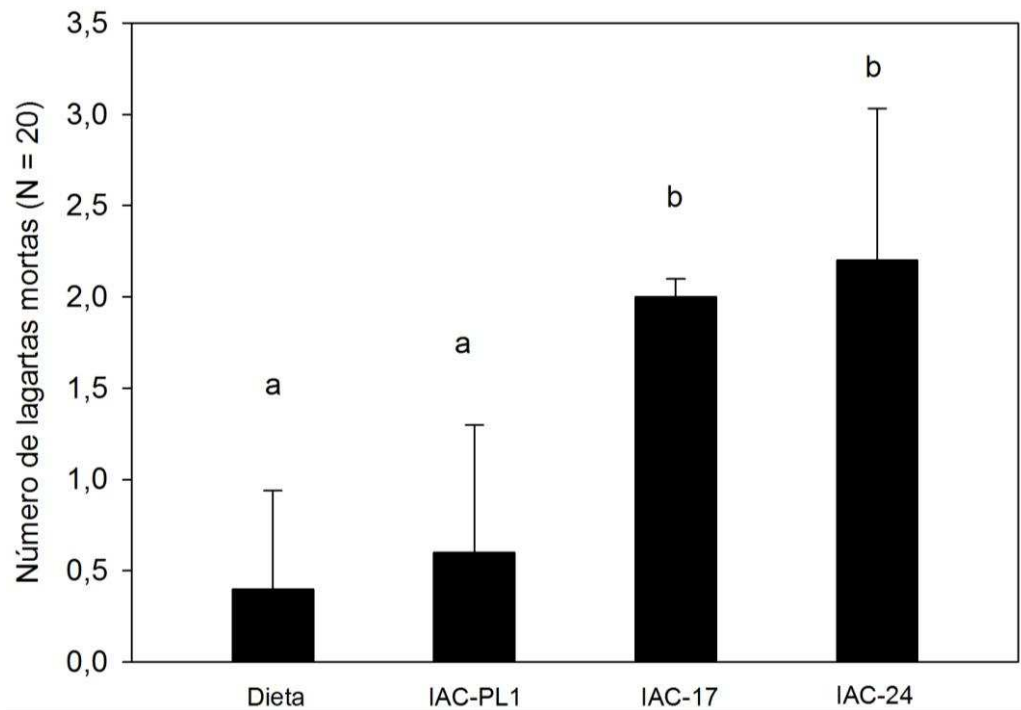


Figura 16 – Mortalidade de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas com dieta, folíolos de soja susceptível (IAC-PL1) e resistente a insetos (IAC-17 e IAC-24). As médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

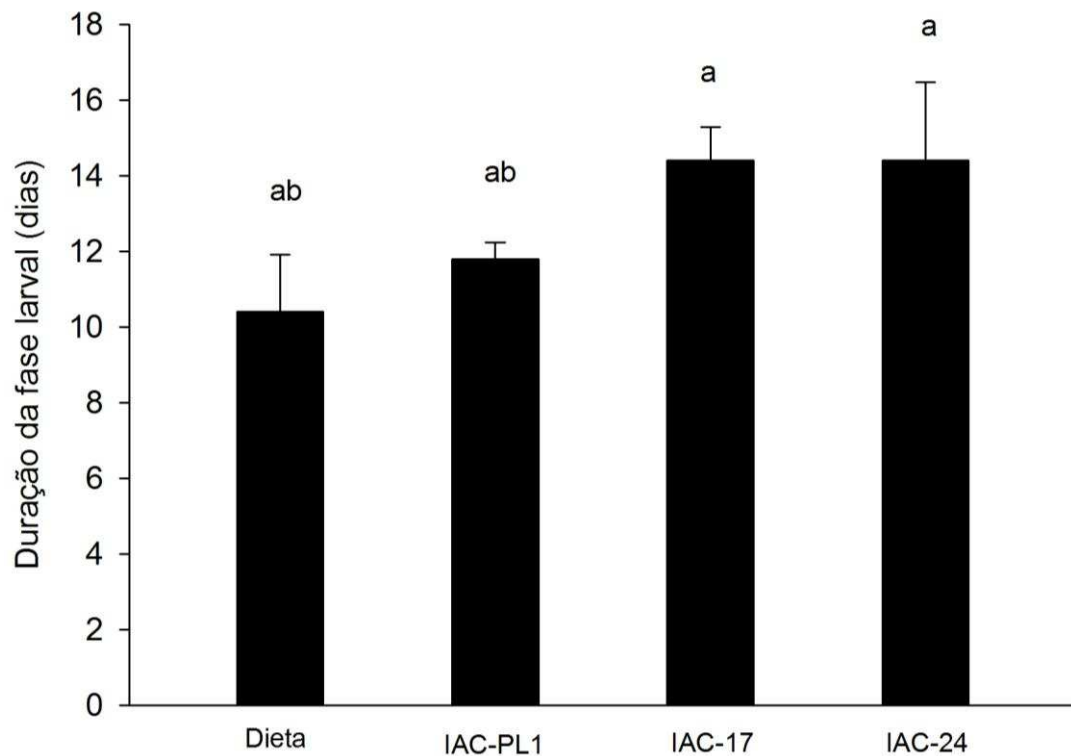


Figura 17 – Duração da fase larval de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) alimenta com dieta, folíolos de soja susceptível (IAC-PL1) e resistente a insetos (IAC-17 e IAC-24). As médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## 6 - DISCUSSÃO

As cultivares de soja IAC-17, IAC-24, resistentes a insetos, e IAC-PL1, suscetível apresentaram os flavonóides daidzina, rutina e quercetina, tanto quando atacados pelas lagartas de *A. gemmatalis* quanto de soja injuriadas mecanicamente (Figuras 1, 2 e 3). Plantas de soja produzem esses metabólitos secundários como parte do arsenal químico contra insetos pragas (Stamp & Skrobola, 1993; Hoffmann-Campo *et al.*, 2006; Salvador *et al.*, 2010; Anshul *et al.*, 2013; Nenaah, 2013; Céspedes *et al.*, 2014). Os flavonóides rutina e genistina foram relatados em folhas de soja (Piubelli *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2013) e daidzeina, genisteina e naringenina em sementes de soja (Maria John *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014).

A concentração de flavonóides não aumentou nas cultivares IAC-17, IAC-24 e IAC-PL1, atacadas por lagartas de *A. gemmatalis* e injuriadas mecanicamente (Tabela 2), não havendo resposta das plantas ao estresse biótico e abiótico. Além disso, a concentração de flavonóides em plantas de soja atacadas por *A. gemmatalis* ou injuriadas mecanicamente ao longo do tempo, mostraram novamente ausência de resposta induzida da planta ao estresse biótico (Figuras 7 e 8). Os flavonóides de plantas são produzidos por rotas metabólicas da via do chiquimato e da acetilcoenzima A, produzindo fenilalanina que dará origem aos esqueletos de carbono pela ação de enzimas específicas (Winkel-Shirley, 2001; Mohanta *et al.*, 2012). Plantas de soja que não respondem ao estresse biótico são insensíveis ao ataque da lagarta-da-soja, o que pode ser devido a elicitores específicos para a rota metabólica dos flavonóides (Alborn 1997; Piubelli *et al.*, 2003; O'Neil *et al.*, 2010). A ausência

de resposta da planta após ao estresse abiótico (dano mecânico), pode ser devido a falta de elicitores  $\beta$ -glicosidase e volicitin encontrados na saliva do inseto (Alborn 1997; Piubelli *et al.*, 2003; Maria John *et al.*, 2013). No entanto, plantas podem produzir compostos químicos após injúrias mecânicas e danos por insetos, como isoflavonóides em sementes de cultivares de soja danificadas por percevejos *N. viridula* (Piubelli *et al.*, 2003) e flavonóides em plantas elicitadas por *Manduca sexta* lepidóptera (Woldemariam, 2013). Flavonóides também foram produzidos por plantas atacadas por *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Lepidoptera: Noctuidae) (Mohanta *et al.*, 2012). Por outro lado, plantas injuriadas mecanicamente, produziram compostos químicos como o linalol e óxido de linalol (Piesik *et al.*, 2006); *Ocimum minimum* (Lamiales: Lamiaceae) produziu 15 compostos sendo o linalol, eugenol e sesquiterpenos em maior concentração (Zabaras, 2001) e *Minthostachys mollis* o mentona e pulegona (Banchio *et al.*, 2005). As cultivares de soja envolvidas nesse estudo caracterizam-se por apresentarem defesa constitutiva, onde a planta produz compostos químicos independente de um estresse do meio externo (Mello & Silva – Filho, 2002).

A quercetina e rutina, presentes na soja resistente a inseto (Figura 9), são citadas com ações adversas sobre pragas agrícolas. Extrato de *Hybanthus parviflorus* contendo rutina apresentou efeito inseticida sobre moscas *Ceratitis capitata* (Broussalis *et al.*, 2010). A rutina, encontrada em genótipos de soja (Hoffmann-Campo *et al.*, 2001; Piubelli *et al.*, 2005), tem sido alvo em programas de melhoramento de plantas como fonte de resistência contra insetos desfolhadores. Esse composto causou efeitos antibióticos e/ou antinutricionais em insetos mastigadores (Stamp & Skrobola, 1993), incluindo

*A. gemmatalis* Hübner (Hoffmann-Campo *et al.*, 2006). A quercetina também afeta a fisiologia do inseto. Extratos da planta *Ficus sarmentosa* var. *henryi* contendo quercetina apresentaram efeito inseticida em *Musca domestica* e *Aedes albopictus* (Xue-gui *et al.*, 2011). Em cultivares de sojas resistentes a insetos, a rutina teve variação na concentração de 0,212 – 3,682 mg/g (Piubelli *et al.*, 2005). A presença dos tres compostos, rutina, daidzina e quercetina pode atuar sinergisticamente contra a herbiboria (Malarvannan *et al.*, 2008), pois a inclusão de quercetina e rutina na dieta causou mortalidade de lagartas *Helicoverpa armigera* (Hübner), *Spodoptera litura* e *A. gemmatalis* (Gazzoni *et al.*, 1997; Jadhav *et al.*, 2012).

A concentração dos flavonóides nas cultivares de soja resistentes a insetos IAC-17, 24 e PL1 diferiu estatisticamente para a rutina e daidzina ( $P < 0,05$ ), sendo a rutina 2,5 vezes maior na cultivar IAC 24 comparado a IAC 17 que apresentou menor concentração (Figura 10). Concentração de daidzina foi em torno de 5,7 vezes maior em relação a cultivar IAC-PL1, suscetível a insetos. Essas concentrações de flavonóides podem conferir a essas cultivares maior resistência a insetos, pois esses compostos afetam a fisiologia desses organismos (Boué & Raina, 2003; Jadhav *et al.*, 2012). Além disso, foi demonstrado que em planta de tabaco geneticamente modificada ocorre uma maior síntese de rutina, com efeito inseticida em lagartas *S. litura* e *H. Armigera*, importantes pragas agrícolas (Pandey *et al.*, 2012). Outro fator é que a daidzina é produzida principalmente nas sojas resistentes a insetos em maior quantidade independente de estresse biótico ou abiótico. Portanto, essa questão trata-se de uma defesa natural da soja em relação a insetos (Zavala *et al.*, 2015).

Além disso, o sistema de defesa de plantas conta com ação de inibidores de proteases, e estes podem ser ativados nas plantas submetidas a ataques de lagartas *A. gemmatalis* (Paixão *et al.*, 2013). A maior produção desse composto foi na cultivar IAC-24 injuriadas por *A. gemmatalis* em 36 horas de exposição (Figura 11). Isso pode estar relacionado à elicitores na saliva das lagartas que ativam genes responsáveis pela produção de hormônios de defesa da planta como o ácido jasmônico, os quais ativam as vias de defesa (Alborn *et al.*, 1997; Mello & Silva-Filho, 2002). Os inibidores de proteases são produzidos de forma induzida (Mello & Silva – Filho, 2002) como outra forma de defesa contra insetos pragas, apresentando efeito de inibição as proteases intestinais (Amirhusin *et al.*, 2007; Paixão *et al.*, 2013), e causando mortalidade (Pilon *et al.*, 2006; Marinho-Prado *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2014).

A mortalidade de *A. gemmatalis* foi maior quando consumiu folíolos de soja IAC-17 e IAC-24, resistentes a insetos (Figura 12). Hoffmann-Campo *et al* (2001) verificaram maior mortalidade em pupas de *T. ni* alimentadas com soja PI 227687. O mesmo ocorreu com larvas de *A. gemmatalis* quando consumiram o cultivar de soja IAC-100, resistente a insetos (Piubelli *et al* 2005). Os flavonóides rutina e quercetina foram responsáveis pela mortalidade de lagartas de *A. gemmatalis* (Gazzoni *et al* 1997) e também coleópteros (Nenaah *et al.*, 2012), assim estes flavonóides podem ter ligação com a mortalidade de lagartas-da-soja que se alimentaram da cultivar IAC-17 e 24.

A duração da fase larval da lagarta-da-soja foi maior quando consumiram folíolos de soja IAC-17 e 24 (Figura 13). A duração da fase de ninfa de *N. viridula* (Hemiptera: Pentatomidae) aumentou em relação ao

controle ao serem alimentadas com cultivares de sojas resistentes a insetos, IAC-17, IAC-19 e IAC-24 (Souza *et al.*, 2012). Mas a longevidade de adultos de *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) foi menor, em comparação ao controle, quando alimentados com as cultivares resistentes a insetos IAC-17, IAC-18, IAC-19 e IAC-24, sendo que a IAC-19 se destacou ao diminuir esta longevidade (Silva *et al.*, 2013). A duração larval de *Trichoplusia ni* aumentou após alimentação com soja resistente a insetos PI 227687 (Hoffmann-Campo *et al.*, 2001). A duração larval *Anticarsia gemmatalis* apresentou o mesmo efeito ao consumir soja resistente a insetos (Piubelli *et al.*, 2005; Salvador *et al.*, 2010). Esta situação também foi observada neste experimento com as cultivares de soja IAC-17 e IAC-24.

## 7 – CONCLUSÕES

A concentração de flavonóides nas plantas de soja não variou após injúrias mecânicas e danos por lagartas de *A. gemmatalis*, possivelmente por falta de ativação das vias de biossíntese, mostrando que essa planta produz esses compostos em nível basal de forma constitutiva. Os compostos químicos rutina, quercetina, daidzina e inibidores de proteases são indícios que dois mecanismos de defesa, nas cultivares aqui estudadas, possam atuar juntos contra a herbivoria de lagartas de *A. gemmatalis*. Esses mecanismos de defesa, principalmente flavonóides, podem ser responsáveis por causar mortalidade e a aumentar a duração larval de *A. gemmatalis*.

Entre os três flavonóides analisados na soja, a daidzina foi o composto majoritário nas três cultivares estudadas. Esse composto obteve maior concentração nas cultivares de sojas resistentes a insetos IAC-17 e IAC-24 comparado a cultivar susceptível IAC-PL1. A daidzina é produzida nesses cultivares de soja de forma constitutiva, ou seja, independe de estresse biótico ou abiótico para ser produzida.

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Armstrong, A. M; Ruiz, H; Pantoja, A. 1990. *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae): A new pest attacking pigeon pea in Puerto Rico. Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico. 74, 93-94.

Acker, S. A. B. E. V; Berg, D. J. V. B; Tromp, M. N. J. L; Griffioen, D. H; Bennekom, W. P. V; Vijgh, W. J. F. V. D; Bast, A. 1996. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. Free Radical Biology Medicine. 20 (3), 331-342.

Alborn, H. T; Turlings, T. C; Jones, T. H; Stenhagen. G; Loughrin, J. H; Tumlinson, J. H. 1997. An elicitor of plant volatiles from beet armyworm oral secretion. Science. 276, 945-949.

Abdeen, A; Virgos, A; Olivella, E; Villanueva, J; Aviles, X; Gabarra, R; Prat, S. 2005. Multiple insect resistance in transgenic tomato plant over- expressing two families of plant proteinase inhibitors. Plant Molecular Biology. 57, 189–202.

Amirhusin, B; Shade, R. E; Koiwa, H. K; Hasegawa, P. M; Bressan, R. A; Murdock, L. L; Zhu-Salzman, K. 2007. Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. Journal of Insect Physiology. 53, 734–740.

Arimura, C; Kost, G; Boland, W. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. Biochimica et Biophysica Acta. 734, 91 – 111.

Anshul, N; Bhakuni, R. S; Gaur, R; Singh, D. 2013. Isomeric flavonoids of *Artemisia annua* (Asterales: Asteraceae) as insect growth inhibitors against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). Florida Entomologist. 96 (3), 897 – 903.

Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248.

Broadway, R.M., D.L. Missurelli. 1990. Regulatory mechanisms of tryptic inhibitory activity in cabbage plants. *Phytochemistry*. 29, 3721-3725.

Buschman, L. L; Whitcomb, W. H; Neal, T. M; Mays, D. L. 1977. Winter survival and hosts of the velvetbean caterpillar in Florida. *Florida Entomology*. 60, 267-273.

Bagga, S; Straney, D. 2000. Modulation of cAMP and phosphodiesterase activity by flavonoids which induce spore germination of *Nectria haematococca* MP VI (*Fusarium solani*). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 56 (2), 5161.

Birt, D. F; Hendrich, S; Wang, W. 2001. Dietary agents in cancer prevention: flavonoids and isoflavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 90, 157-177.

Batista, R.B; Oliveira, M.G.A; Pires, C.V; Piovesan, N.D; Rezende, S.T; Moreira, M.A. 2002. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37 (11), 1517-1524.

Boué, S. M; Raina, A.K. 2003. Effects of plant flavonoids on fecundity, survival, and feeding of the *Formosan subterranean* termite. *Journal of Chemical Ecology*. 29, 2575 – 2584.

Bortoli, S. A; Doria, H. O. S; Albergaria, N. M. M. S; Murata A. T; Vescove, H V. 2005. Aspectos biológicos e nutricionais de *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja, amendoim e dieta artificial. *Boletim de Sanidade Vegetal Plagas*. 31, 171-178.

Banchio, E; Zygadlo, J; Valladares, G. 2005. Effects of mechanical wounding on essential oil composition and emission of volatiles from *Minthostachys mollis*. *Journal of Chemical Ecology*. 31, (4), 719 – 727.

Bruinsma, M; Van Dam, N. M; Van Loon, J. J. A; Dicke, M. 2007. Jasmonic acid-Induced changes in *Brassica oleracea* affect oviposition preference of two specialist herbívores. *Journal of Chemical Ecology*. 33, 655-668.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia, Empresa de Pesquisa Energética, Plano Decenal de Expansão de Energia 2008/2017. Rio de Janeiro: EPE, 2009. 435 p. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/PDEE/Forms/EPEEstudo.aspx>>. Acesso em: 02 mar. 2015 as 15:05.

Bari, R; Jones, J. D. G. 2009. Role of plant hormones in plant defense responses. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht. 69, 473-488.

Broussalis, A. M; Clemente, S; Ferraro, G. E. 2010. *Hybanthus parviflorus* (Violaceae): Insecticidal activity of a South American plant. *Crop Protection*. 29, 953- 956.

Centro de Inteligência da Soja. Aspectos Botânicos. [http://www.cisoja.com.br/index.php?p=aspectos\\_botanicos](http://www.cisoja.com.br/index.php?p=aspectos_botanicos). Acessado em 05/07/2012 as 14:55.

Chougule, N. P; Doyle, E; Fitches, E; Gatehouse, J. A. 2008. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (Cabbage moth: Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *Journal of Insect Physiology*. 54, 563-572.

Crozier, A; jaganath, I. B; Clifford, M. N. 2006. Phenols, polyphenols and tannins: an overview. In: Crozier, A; Clifford, M. N; Ashihara, H. *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Oxford: Wiley-Blackwell. p. 1-24.

Céspedes, C. L.; Salazar, J. R.; Ariza-Castol, A.; Yamaguchi, L.; Ávila, J. G.; Aqueveque, P.; Kubog, I.; Alarcón, J. 2014. Biopesticides from plants: *Calceolaria integrifolia* s.l. Environment Research Journal. 132, 391 – 406.

Dixon R. A.; Steele C. L. 1999. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. Trends in Plant Science. 4, 394-400.

de Bruxelles, G. L.; Roberts, M. R. 2001. Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. Crit. Critical Reviews in Plant Sciences. 20, 487-521.

Duke, S. O. 2007. The emergence of grass root chemical ecology. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 104 (43), 16729-16730.

Ellisor, L.O. 1942. Notes on the biology and control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hbn. Louisiana Agriculture Experimental Station Bulletin. 298, 8-9.

Embrapa Soja. Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil. Sistema de Produção.

<<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acessado 03/05/2012 as 13:06.

Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Soja, 2006. Tecnologia de produção de soja – região central do Brasil 2007. Londrina. 225p.

Ford, B. J.; Sfrayer J. R.; Reid, J.; Godfrey, G. L. 1975. The Literature of arthropods associated with soybeans IV. A bibliography of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). State of Illinois. Illinois Natural History Survey Urbana.

Fehr, W. R.; Caviness, C. E. 1977. Stages of soybean development. Ames: Iowa State University of Science and Technology. 11 p.

Farmer, E. E; Ryan, C. A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell*. 4, 129-134.

Fawe, A; Abou-Zaid; M., Menzies, J. G; Belanger, R. R. 1998. Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. *Phytopathology*. 88 (5), 396-401.

Fugi, C. G. Q; Lourenção, A. L; Parra, J. R. P. 2005. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. *Scientia Agricola*. 62 (1), 31-35.

Ferreira, C. C. A; Oliveira, M. G. A; Brumano, M. H. N; Guedes, R. N. C; Almeida, F. T; Silva, C. H. O; Moreira, M. A. 2005. Lack of seed lipoxygenases does not affect soybean defense against removal of reproductive tissue. *Bioscience Journal*. 21, 49-55.

Gregory Junior, B. M; Mackenzie, P. M; Noble, R. E. 1991. *Anticarsia Gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico: A new host-plant and two new bird predators. *Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. 75, 295-296.

Gazzoni, D. L; Hulsmeyer, A; Hoffmann-Campo, C. B. 1997. Efeito de diferentes doses de rutina e de quercetina na biologia de *Anticarsia gemmatalis*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 32, 673-681.

Gomes, A. P. G; Dias, S. C; Bloch Jr, C; Melo, F. R; Furtado-Jr, J. R; Monnerat, R.G; Grossi-De-Sa, M.F; Franco, O. L. 2005. Toxicity to cotton boll weevil *anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140, 313-319.

Griesbach, R. J. 2005. Biochemistry and genetics of flower color. *Plant Breeding Reviews*. 25, 89-114.

Gautam, K; Kumar, P; Poonia, S. 2013. Larvicidal activity and GC-MS analysis of flavonoids of *Vitex negundo* and *Andrographis paniculata* against two vector mosquitoes *Anopheles stephensi* and *Aedes aegypti*. Journal of Vector Borne Diseases. 50, 171 – 178.

Hoffman-Campo, C. B; Oliveira, E. B; Moscardi, F. 1985. Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina, EMBRAPA-CNPSO, 10, Documentos, 23p.

Harborne, J. B; Grayer, R. J. 1993. Flavonoids and insects. In Harborne, J. B (ed). 1986. The flavonoids, advances in research since. London, Chapman and Hall, 676 p.

Hoffmann-Campo, C. B; Mazzarin, R. M; Lustosa, P. R. 1994. Mecanismos de resistência de genótipos de soja: teste de não preferência para *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). Pesquisa Agropecuária Brasileira. 29, 513-519.

Hoffmann-Campo, C. B; Moscardi, F; Corrêa-Ferreira, B. S; Oliveira, L. J; Sosa-Gómez, D. R; Panizzi, A. R; Corso, I. C; Gazzoni, D. L; Oliveira, E. B. 2000. Pragas da soja no Brasil e seu manejo integrado. Londrina: Embrapa Soja.

Hoffmann-Campo, C. B; Harbone, J. B; Mcaffery, A. R. 2001. Pre-ingestive and post-ingestive effects of soya bean extracts and rutin on *Trichoplusia ni* growth. Entomologia Experimentalis et Applicata. 98, 181-194.

Haq, S. K; Atif, S. M; Khan, R. H. 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. Archives of Biochemistry and Biophysics. 431 (1), 145-159.

Hernandez, I; Alegre, L; Munne-Bosch, S. 2004. Drought-induced changes in flavonoids and other low molecular weight antioxidants in *Cistus clusii* grown under Mediterranean field conditions. Tree Physiology. 24, 1303-1311.

Hoffmann-Campo, C. B; Ramos Neto, J. A; Oliveira, M. C. N de; Oliveira, L. J. 2006. Detrimental effect of rutina on *Anticarsia gemmatalis*. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 41, 1453-1459.

Iwashina, T. 2003. Flavonoid function and activity to plants and other organisms. Biological Sciences in Space. 17 (1), 24-44.

Jongsma, M. A; Bolter, C. 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. Journal of Insect Physiology. 43 (10), 885-895.

Jayanthi, P; Lalitha, P; Aarth, N. 2012. Larvicidal and pupicidal activity of extracts and fractionates of *Eichhornia crassipes* (Mart.) solms against the filarial vector *Culex quinquefasciatus* say. Parasitology Research. 111, 2129 – 2135.

Jadhav, D. R; Mallikarjuna, N; Rathore, A; Pokle, D. 2012. Effect of some flavonoids on survival and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Spodoptera litura* (Fab) (Lepidoptera: noctuidae). Asian Journal of Agricultural Sciences. 4(4), 298-307.

Jin, D; Zeng, F; Dong, S; Zhang, H. 2014. Effects of a protease inhibitor protein from *Xenorhabdus bovienii* on physiology of pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. Pesticide Biochemistry and Physiology. 108, 85-91.

Kakade, M.L; Rackis, J. J; McGhee, J. E. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chemistry. 51, 376-382.

Kogan, M. 1986. Natural chemicals in plant resistance to insects. Iowa State Journal Research. 60, 501-527.

Kubo, I; Hanke, F. G. Chemical methods for isolating and identifying phytochemicals biologically active in insects. In: Miller, J.R; Miller, T. A. (Ed.). 1986. Insects-plant interactions. New York: Springer-Verlag, 121-153.

Koiwa, H; Bressan, R. A; Hasegawa, P. M. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. Trends Plant Science. 2, 379–384.

Karban, R; Baldwin, I. T. 1997. Induce responses to herbivory. Chicago, University of Chicago Press, 317p.

Kaur, T; Vasudev, A; Sohal, S. K; Manhas, R. K. 2014. Insecticidal and growth inhibitory potential of *Streptomyces hydrogenans* DH 16 on major pest of India, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). BMC Microbiology. 14, 227.

Kim, E; Lee, O; Kim, J; Kim, S; Lee, J; Kim, S; Chung, M. 2014. Isoflavones and anthocyanins analysis in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) from three different planting locations in Korea. Field Crops Research. 156, 76 -83.

Kim, J. K; Kim, E; Park, I; Yu, B; Lim, J. D; Lee, Y; Lee, J; Kim, S, Chung, M. 2014. Isoflavones profiling of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) germplasms and their correlations with metabolic pathways. Food Chemistry. 153, 258 – 264.

Lomate, P. R; Hivrale, V. H. 2013. Effect of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ac and protease inhibitor on growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hubner). Pesticide Biochemistry and Physiology. 105, 77-83.

Morandi, D; Branzanti, B; Gianinazzi-Pearson, V. 1992. Effect of some plant flavonoids on in vitro behaviour of an arbuscular mycorrhizal fungus. Agronomie. 12 (10), 811-816.

Middleton, E. J. 1998. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. Advances in Experimental Medicine and Biology. 439, 175–182.

Mello, M. O; Silva – Filho, M. C. 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 14(2), 71-81.

McNally, D. J; Wurms, K. V; Labbe, C; Belanger, R. R. 2003. Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 63 (6), 293-303.

Michalak, A. 2006. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15 (4), 523-530.

Machado, H. 2006. Atividade dos flavonóides rutina e naringina sobre o tumor ascítico de Erlich “in vivo”. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Moreira, F. L. 2007. Efeito do inibidor de serino-proteases, berenil, sobre a eficiência alimentar, atividade proteolítica e desenvolvimento pós- embrionário de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

Malarvannan, S; Senthil Kumar, S; Prabavathy, V. R; Nair, S. 2008. Individual and synergistic effects of leaf powder of few medicinal plants against American bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Noctuidae: Lepidoptera). *Asian Journal of Agricultural Sciences*. 22, 79-88.

Migliolo, L; Oliveira, A. S; Santos, E. A; Franco, O. L; Sales, M. P. 2010. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenantha pavonina* L. seeds with double activity toward serine and cystein-proteinases. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 29 (2), 148-56.

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

Marinho-Prado, J. S; Lourenção, A. L; Oliveira, J. A; Guedes, R. N. C; Oliveira, M. G. A. 2011. Survival and feeding avoidance of the eucalyptus defoliator *Thyrineina arnobia* exposed to the proteinase inhibitor berenil. Journal of Applied Entomology. 135, 763–770.

Mohanta, T. K; Occhipinti, A; Zebelo, S. A; Foti, A; Fliegmann, J; Bossi, S; Maffei, M. E; Berteaux, C. M. 2012. *Ginkgo biloba* responds to herbivory by activatin gearly signaling and direct defenses. PloS one. 7, e32822.

Maria John, K. M; Jung, E. S; Lee, S; Kim, J; Lee, C. H. 2013. Prymary and secondary metabolites variation of soybean contaminated with *Aspergillus sojae*. Food Research International. 54, 487 – 494.

Nenaah, G. E. 2012. Potential of using flavonoids, latex and extracts from *Calotropis procera* (Ait.) as grain protectants against two coleopteran pests of stored rice. Industrial Crops and Products. 45, 327 – 334.

Ohta, H; Ida, S; Mikami, B; Morita, Y. 1986. Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination. Plant & Cell Physiology. 22 (5), 911-918.

O'Neill, B. F; Zangerl, A. R; Dermody, O; Bilgin, D. D; Casteel, C. J; Zavala, J. A; DeLucia, E. H; Berenbaum, M. R. 2010. Impact of elevated levels of atmospheric CO<sub>2</sub> and herbivory on flavonoids of soybean (*Glycine max* Linnaeus). Journal of Chemical Ecology. 36, 35–45.

Oliveira, L. J; Hoffmann-Campo, C. B; Mazzarin, R. M. 1993. Aspectos biológicos e nutricionais de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera:

Noctuidae) em diversos genótipos de soja. Anais da Sociedade Entomológica do Brasil. 22, 547-552.

Oliveira, C. L; Pallini Filho, A; Tavares, W. S; Oliveira, M. G; Serrão, J. E; Zanuncio, J. C. 2014. Foraging and oviposition of *Thyrinteina leucoceraea* (Lepidoptera: Geometridae) on introduced and native hosts in Brazil sprayed with the protease inhibitor benzamidine. Invertebrate Survival Journal: ISJ. 11, 337-344.

Porter, P. M; Banwart, W. L; Hassett, J. J. 1986. Phenolic acids and flavonoids in soybean root and leaf extracts. Environmental and Experimental Botany. 26 (1), 65 – 73.

Piubelli, G. C; Hoffmann – Campo, C. B; Arruda, I. C; Frachini, J. C; Lara, F. M. 2003. Flavonoid increase in soybean as a response to *Nezara viridula* injury and its effect on insect – feeding preference. Journal of Chemical Ecology. 29 (5), 1223 – 1233.

Panizzi, A. R; Oliveira, L. J; Silva, J. J. 2004. Survivorship, larval development and pupal weight of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) feeding on potential leguminous host plants. Neotropical Entomology. 33, 563-567.

Pedriali, C. A. 2005. Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes. Dissertação (Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas; Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo.

Piubelli, G. C; Hoffmann-Campo, C. B; Moscardi, F; Miyakubo, S. H; Oliveira, M. C. N de. 2005. Are chemical compounds important for soybean resistance to *A. gemmatalis*? Journal of Chemical Ecology. 31, 1509-1524.

Praça, L. B; Silva Neto, S. P; Monnerat, R. G. 2006. *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae): Biologia, amostragem e métodos de controle. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Série Documento, 196).

Piesik, D; Weaver, D. K; Peck, G. E; Morrill, W. L. 2006. Mechanically-injured wheat plants release greater amounts of the secondary metabolites linalool and linalool oxide. *Journal of Plant Protec Research*. 46 (1).

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

Pilon, A. M; Oliveira, M. G. A; Pilon, F. M; Guedes, R. N. C; Oliveira, J. A; Fazollo, A. 2009. Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidóptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. *Ceres*. 56 (6), 744-748.

Picchi, D. G; Altei, W.F; Saito, M. S; Bolzani, V. S; Cilli, E. M. 2009. Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese e atividades biológicas. *Quimica Nova*. 32 (5), 1262-1277.

Pandey, A; Mirsa, P; Chandrashekar, K; Trivedi, P. K. 2012. Development of AtMYB12-expressing transgenic tobacco callus culture for production of rutin with biopesticidal potential. *Plant Cell Reports*. 31, 1867–1876.

Paixão, G. P; Lourenção A. L; Silva, C. R; Mendonça, E. G; Silva, P. L; Oliveira, J. A; Zanuncio, J. C; Oliveira, M. G. 2013. Biochemical responses of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean cultivars sprayed with the protease inhibitor berenil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61 (34), 8034-8038.

Richardson, M. 1991. Seed Storage Proteins: The enzyme Inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*. 5, 259-305.

Ryan, C. A. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta*. 7, 112-121.

Stamp, N. E; Skrobola C. M. 1993. Failure to avoid rutin diets results in altered food utilization and reduced growth rate of *Manduca sexta* larvae. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 68, 127-142.

Shirley, B. W. 1998. Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Science Research*. 8, 415-422.

Simmonds, M. S. J. 2001. Importance of flavonoids in insect-plant interactions: feeding and oviposition. *Phytochemistry*. 56, 245-252.

Salvador, M. C; Boiça Jr, A. L; Oliveira, M. C. N; Graça, J. P; Silva, D. M; Hoffmann-Campo, C. B. 2010. Do different casein concentrations increase the adverse effect of rutin on the biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Neotropical Entomology*. 39 (5), 774-783.

Shivaji, R; Camas, A; Ankala, A; Engelberth, J; Tumlinson, J. H; Williams, W. P; Wilkinson, J. R; Luthe, D. S. 2010. Plants on constant alert: elevated levels of jasmonic acid and jasmonate-induced transcripts in caterpillar resistant maize. *Journal of Chemical Ecology*. 36,179–191.

Shwetha, V. R; Chandrashekar, K. R. 2011. Larvicidal activities of *Knema attenuate* (Hook. F. & Thomson) Warb. (Myristicaceae) extracts against *Aedes albopictus* skuse and *Anopheles stephensi* Liston. *Parasitology Research*. 109, 1671 – 1676.

Souza, E. S; Baldin, E. L. L; Fanella, T. L. M. 2012. Desenvolvimento de *Nezara viridula* (L., 1758) (Hemiptera: Pentatomidae) em genótipos de soja. Bol San Veg Plagas. 38, 41 – 49.

Souza, G. H. B; Mello, J. C. P; Lopes, N. P. 2012. Farmacognosia: coletânea científica. Ouro preto: UFOP. 372p.

Silva, J. P. G. F; Baldin, E. L. L; Souza, E; Canassa, V. F; Lourenção, A. L. 2013. Characterization of antibiosis to the redbanded stink bug *Piezodorus guildinii* (Hemiptera: Pentatomidae) in soybean entries. Journal of Pest Science. 86, 649–657.

Samuel, L; Muthukumaran, R. B; Gurusubramanian, G; Senthilkumar, N. 2014. Larvicidal activity of *Ipomoea cairica* (L.) sweet and *Ageratina adenophora* (Spreng.) King & H. Rob. Plant extracts against arboviral and filarial vector, *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). Experimental Parasitology. 141, 112 – 121.

Xavier-Filho J; Campos F. A. P. 1989. Proteinase inhibitors. In: Cheek, P. R. Toxicants of plant origin. Boca Raton: Crc Press. 3, 1-27.

Xue-gui, W; Xiao-yi, W; Xing-yan, H; Li-tao, S; Yong-qing, T; Han-hong, X. 2011. Insecticidal constructure and bioactivities of compounds from *Ficus sarmentosa* var. *henryi*. Agricultural Sciences in China. 10, 1402-1409.

Zabaras, D; Wyllie, S. G. 2001. The effect of mechanical wounding on the composition of essential oil from *Ocimum Minimum* L. leaves. Molecules. 6, 79-86.

Zavala, J. A; Mazza, C. A; Dillon, F. M; Chludil, H. D; Ballaré, C. L. 2015. Soybean resistance to stink bugs (*Nezara viridula* and *Piezodorus guildinii*) increases with exposure to solar UV-B radiation and correlates with isoflavonoid content in pods under field conditions. Plant, Cell and Environment. 38, 920–92.

Whitaker, J. R. 1994. Principles of enzymology for the food sciences. New York: M. Dekker. 625 p.

Winkel-Shirley, B. 2001. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. *Plant Physiology*. 126, 485–493.

Woldemariam, M. G; Dinh, S. T; Oh, Y; Gaquerel, E; Baldwin, I. T; Galis, I. 2013. NaMYC2 transcription factor regulates a subset of plant defense responses in *Nicotiana attenuata*. *BMC Plant Biol*. 13, 73.

Yamasaki, H; Sakihama, Y; Ikehara, N. 1997. Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Plant Physiology*. 115, 1405-1412.