

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL INSETICIDA DE UM EXTRATO QUITINOLÍTICO  
DE *Streptomyces* sp. ENT-21 SOBRE *Spodoptera frugiperda*  
(J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**

**Thiago Trevisoli Agostini  
Biólogo**

**2017**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**POTENCIAL INSETICIDA DE UM EXTRATO QUITINOLÍTICO  
DE *Streptomyces* sp. ENT-21 SOBRE *Spodoptera frugiperda*  
(J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**

**Thiago Trevisoli Agostini**

**Orientador: Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Agronomia (Entomologia Agrícola)

**2017**

A275p Agostini, Thiago Trevisoli  
Potencial inseticida de um extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp.  
ENT-21 sobre *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera:  
Noctuidae) / Thiago Trevisoli Agostini. -- Jaboticabal, 2017  
x, 23 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2017  
Orientador: Guilherme Duarte Rossi  
Banca examinadora: Angela Regina Araujo, Ricardo Antonio  
Polanczyk  
Bibliografia

1. Biotecnologia. 2. Controle de insetos. 3. Quitinase. I. Título. II.  
Jaboticabal - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 595.7:632.9

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –  
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: POTENCIAL INSETICIDA DE UM EXTRATO QUITINOLÍTICO DE *Streptomyces* sp. ENT-21 SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

AUTOR: THIAGO TREVISOLI AGOSTINI

ORIENTADOR: GUILHERME DUARTE ROSSI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUILHERME DUARTE ROSSI  
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. ANGELA REGINA ARAUJO  
Departamento de Química Orgânica / UNESP / Câmpus de Araraquara/SP

Prof. Dr. RICARDO ANTONIO POLANCZYK  
Departamento de Fitossanidade / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de julho de 2017

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Thiago Trevisoli Agostini** - Nascido em 11 de Junho de 1991, na cidade de Jaboticabal, São Paulo, Brasil é graduado em Biologia pelo Centro Universitário de Araraquara (UNIARA), título obtido em março de 2015. Durante a sua graduação (Jan/2010 - Jan/2015), teve a oportunidade de participar de eventos na área de Entomologia e desenvolveu projeto de iniciação científica com bolsa da Fapesp no Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes-Praga. Ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da Unesp - Câmpus de Jaboticabal em março de 2015 com término em 4 de julho de 2017.

**“A sabedoria é uma virtude que devemos cultivar ao longo de toda a vida. Uma pessoa nunca tem tanta sabedoria ao ponto de que seja impossível ela ficar ainda mais sábia. Os sábios sabem disso.”**

**Geralt of Rivia**

Aos meus amados pais Eliana de Fatima Trevisoli Agostini e José Guilherme Agostini, que dedicaram seu tempo e sua força ao sucesso de seus filhos, sendo meus grandes exemplos de vida.

## Dedico

Aos meus queridos irmãos Matheus Trevisoli Agostini e Lucas Trevisoli Agostini, que sempre auxiliaram incondicionalmente meus passos, além da força para sempre seguir em frente. À minha amada Sabrina Nayara Kotuzi, que com seu amor sempre trouxe alegrias sendo minha base de dedicação e inspiração nesse caminho.

Aos meus avós Anselmo Agostini (*in memoriam*), Maria Madalena Agostini, Pedro Trevisoli Sobrinho e Natalina Longhi Trevizoli, que são os responsáveis pela base sólida na educação.

## Ofereço

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista pela superior infraestrutura e oportunidade concedida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola), pelos conhecimentos passados e por serem responsáveis por mais um degrau alçado.

Aos professores Dr. Odair Aparecido Fernandes, Dr. Arlindo Leal Boiça Junior, Dr. Marcos Rogério André, Dra. Rosangela Zacarias Machado, Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto, Dr. Francisco Jorge Cividanes, Dr. Fernando Luis Cònsoli e Dra. Janete Aparecida Desidério e à Bióloga Josy Aparecida dos Santos Costa da "Biofábrica de Cotesia" da Usina São Martinho (Pradópolis, SP) que foram fundamentais para a execução técnica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi, pela amizade, orientação e ensinamentos.

À minha noiva Sabrina Nayara Kotuzi pelo seu amor e companheirismo.

Aos meus grandes amigos e companheiros de pós-graduação Emiliano Brandão de Azevedo, Diandro Ricardo Barilli, Juliana Barroso Silva e Nicole de Paula Souza, por não medirem esforços para me ajudar, pela paciência de ensinar e pelo companheirismo, amizade e grande ajuda em todos os momentos.

Aos meus amigos: Daniel Oliveira, Rafael Nascimento de Moraes, Paulo Henrique Barbosa, Laís Alves, Thuane Molina Gil, que tanto me apoiaram e me auxiliaram nessa caminhada.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram para a realização dessa dissertação.



## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Danos causados à agricultura por insetos.....	3
2.2. Exploração biotecnológica de actinobactérias para obtenção de substâncias inseticidas.....	4
2.3. Exploração biotecnológica de quitinases com ênfase para o controle de insetos.....	5
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	8
3.1. Produção do extrato quitinolítico por <i>Streptomyces</i> sp. ENT-21 .....	8
3.2. Determinação do pH ótimo do extrato quitinolítico produzido por <i>Streptomyces</i> sp. ENT-21 .....	9
3.3. Detecção da atividade de quitinase no extrato quitinolítico de <i>Streptomyces</i> sp. ENT-21 .....	9
3.4. Avaliação do desenvolvimento de <i>Spodoptera frugiperda</i> em dietas contendo o extrato quitinolítico de <i>Streptomyces</i> sp. ENT-21 .....	10
4. RESULTADOS .....	12
5. DISCUSSÃO.....	14
6. REFERÊNCIAS .....	15

**POTENCIAL INSETICIDA DE UM EXTRATO QUITINOLÍTICO DE *Streptomyces* sp. ENT-21 SOBRE *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**

**RESUMO** - A exigência da sociedade por alimentos produzidos com baixos riscos de contaminação aos consumidores e ao meio ambiente tem aumentado constantemente. Nesse cenário, a identificação de novas formas eficazes e seguras para o controle de insetos-praga se mostra como uma tarefa contínua e as quitinases aparecem como uma interessante ferramenta. As quitinases são enzimas com ação de hidrólise sobre quitina e podem interferir no desenvolvimento de pragas visto que esse polímero constitui estruturas como a cutícula e a membrana peritrófica dos insetos. No presente trabalho, foi realizada a produção de um extrato quitinolítico a partir do cultivo da actinobactéria *Streptomyces* sp. ENT-21 em meio contendo quitina e avaliaram-se os efeitos desse extrato sobre o desenvolvimento de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), importante praga da cultura do milho. O extrato quitinolítico produzido resultou na interferência do desenvolvimento larval de *S. frugiperda*, no aumento da mortalidade e na redução do ganho de peso das lagartas em relação a lagartas mantidas como controle. Após fervura, o extrato produzido teve sua atividade quitinolítica inativada e não exerceu influência sobre a mortalidade larval de *S. frugiperda* em relação ao controle na concentração avaliada. Os resultados indicam que o extrato quitinolítico produzido pelo cultivo de *Streptomyces* sp. ENT-21 possui atividade inseticida sobre lagartas de *S. frugiperda* e que a atividade quitinolítica é um fator importante para a atividade inseticida do extrato.

**Palavras-chave:** Biotecnologia, controle de insetos, quitinase.

**INSECTICIDAL POTENTIAL OF A CHITINOLITIC EXTRACT FROM *Streptomyces* sp. ENT-21 AGAINST *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**

**ABSTRACT** - Society's demand for food production at low contamination risks to consumers and to the environment is in constant increase. In this scenario, the identification of new effective and safe forms for the control of insect pests come into sight as a continuous task and chitinases are considered an interesting promise. Chitinases are enzymes that hydrolyze chitin and can disrupt the development of insect pests since this polymer constitutes vital structures such as the cuticle and peritrophic membrane of insects. In the present work, we produced a chitinolytic extract using the actinobacterium *Streptomyces* sp. ENT-21 and evaluated the effects of this extract on larval development of an important pest of maize, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. The chitinolytic extract interfered in the larval development of *S. frugiperda* affecting parameters such as larval mortality and larval weight gain. After boiling, no chitinolytic activity was detected in the extract and no influence of boiled extract was observed over *S. frugiperda* larval development at the evaluated concentration. The results suggest that the evaluated chitinolytic extract has insecticidal activity against *S. frugiperda* larvae and indicate the chitinolytic activity as an important component of the insecticidal activity of the extract.

**Keywords:** Biotechnology, chitinase, insect control.



## 1. INTRODUÇÃO

O controle de pragas nos sistemas de produção vegetal é fundamental para a geração de produtos de forma economicamente sustentável (GALLO et al., 2002). O controle químico tem sido a forma de controle de pragas mais utilizada nos sistemas de produção agrícola, mas, apesar de em determinados momentos se apresentar de forma eficiente, esta prática pode resultar em efeitos colaterais indesejados como a seleção de populações de insetos resistentes aos agentes de controle e/ou a contaminação de ambientes e organismos não alvo (KOGAN, 1998).

Para que o controle de pragas seja realizado de forma racional, com bons índices de controle e reduzidos efeitos colaterais negativos, a comunidade científica e as indústrias agroquímicas necessitam desenvolver constantemente novas ferramentas e táticas para o controle de insetos-praga (SPARKS, 2013).

As plantas transgênicas estão entre as mais recentes ferramentas desenvolvidas em uso e muito têm auxiliado no controle de insetos-praga (BERNAL et al., 2004; FERRY et al., 2006). A incorporação de genes que codificam proteínas com atividade inseticida em plantas tem sido realizada com sucesso, destacando-se as plantas transgênicas que expressam as proteínas Cry derivadas do microrganismo *Bacillus thuringiensis* Berliner que garantem proteção às plantas contra imaturos da ordem Lepidoptera, por exemplo (SANAHUJA et al., 2011). Em determinadas situações, a adoção das plantas transgênicas com resistência a insetos-praga em sistemas de cultivo tem resultado na diminuição do uso de inseticidas em sistemas de produção agrícola (EDGE et al., 2001).

Porém, problemas relacionados à eficiência de proteínas Cry presentes em plantas transgênicas para o controle de insetos-praga são observados, tais como a seleção de populações resistentes ou a ineficiência das proteínas inseridas nas plantas transgênicas para controlar determinadas espécies de insetos-praga (FRANKENHUYZEN, 2009; STORER et al., 2010; TABASHNIK et al., 2013; FARIAS et al., 2014; SANTOS-AMAYA et al., 2015; FARIAS et al., 2016).

De forma a investigar novas fontes de moléculas com atividade inseticida, o presente trabalho foi realizado para avaliar o potencial inseticida de uma quitinase produzida pelo microrganismo *Streptomyces* sp. ENT-21 (ROSSI et al., 2015) sobre

lagartas neonatas (tempo de eclosão menor que 24 horas) da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), uma importante praga da cultura do milho no Brasil e em outras regiões do mundo (CAPINERA, 1999; BLANCO et al., 2016).

No manejo de pragas, as quitinases podem auxiliar a ação de outros agentes de controle por meio de sua expressão em plantas transgênicas em conjunto com outras proteínas (piramidação gênica) (RANJEKAR et al., 2003; GATEHOUSE, 2011) ou podem ser utilizadas em conjunto com outras formas de controle tradicional, resultando em efeitos sinérgicos no controle de insetos-praga (REGEV et al., 1996; DING et al., 1998).

Além do sítio catalítico responsável pela hidrólise de quitina, as quitinases podem possuir domínios ligantes em quitina (ARAKANE; MUTHUKRISHNAN, 2010) com possível atividade inseticida similar à observada em proteínas ligantes em quitina sem ação quitinolítica (WANG; GRANADOS, 2001; ROSSI et al., 2012).

A hipótese para que a atividade inseticida do extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 ocorra sobre lagartas de *S. frugiperda* foi baseada em trabalhos em que a adição de quitinases no alimento de insetos resultou em aumento da mortalidade dos mesmos (DING et al., 1998; CORRADO et al., 2008; ARAKANE; MUTHUKRISHNAN, 2010; CHANDRASEKARAN et al., 2012; WANG et al., 2013) provavelmente em função de alterações das propriedades de suas membranas peritróficas (KELKENBERG et al., 2015; BERINI et al., 2016).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Danos causados à agricultura por insetos

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de produtos agrícolas como citrus, café, açúcar, etanol e plantas oleaginosas, além de carnes bovinas e suínas (CONAB, 2017). Porém, devido ao alto índice de ataque de pragas agrícolas ocorridas no Brasil, uma perda econômica de até US\$14 milhões ao ano é estimada (OLIVEIRA et al., 2014). Entre os principais causadores de perdas no processo de produção agrícola, observam-se os insetos-praga como grandes competidores para o crescimento da produção e exportação de produtos derivados da agricultura, visto que os mesmos acarretam um alto índice de injúria e perda de produção agrícola tanto na pré-colheita quanto no armazenamento da produção (OERKE, 2006). Além das perdas diretas causadas pelos insetos-pragas, a produção agrícola é onerada monetariamente pelos custos da utilização de agrotóxicos para reduzir os danos causados pelos mesmos (OERKE; DEHNE, 2004).

A agricultura brasileira é praticada em clima tropical e é baseada em um intenso sistema de monoculturas e, com isso, alguns insetos-praga podem estabelecer várias gerações ao longo do ano (MARTINELLI et al., 2007; STORER et al., 2012). Entre estes insetos, pode ser destacada a lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae).

*Spodoptera frugiperda* é um dos principais insetos-praga da cultura do milho no Brasil (CAPINERA, 1999; CRUZ, 2009; FARIAS et al., 2014; BLANCO et al., 2016) e, em função de seu hábito alimentar polífago, também pode ocorrer em outras culturas como soja, algodão, trigo e aveia (SILVA et al., 2017). Na cultura do milho, as lagartas recém eclodidas alimentam-se inicialmente pela raspagem das folhas centrais e, com o passar de seu desenvolvimento, iniciam a perfuração das folhas e deslocam-se para o interior do cartucho do milho que pode ser completamente destruído (GALLO et al., 2002). Inseticidas como piretroides e carbamatos, plantas transgênicas que expressam proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner e o controle biológico por bioinseticidas produzidos a partir da bactéria *B. thuringiensis*, predadores e parasitoides podem ser utilizados para o controle de *S.*

*frugiperda* (GALLO et al., 2002; TABASHNIK et al., 2013). Além de ser considerada uma importante praga em culturas de grande importância econômica, o inseto escolhido apresenta hábito alimentar polífago e apresenta suscetibilidade a toxinas ativas em seus intestinos médios (LEMES et al., 2014), o que torna *S. frugiperda* um interessante modelo para testar os efeitos dos extratos quitinolíticos produzidos por *Streptomyces* sp. ENT-21 após ingestão.

## **2.2. Exploração biotecnológica de actinobactérias para obtenção de substâncias inseticidas**

Actinobactérias são bactérias Gram-positivas que desenvolvem seu papel biológico em diversos nichos ecológicos como, por exemplo, no solo, na água, em plantas ou associados a insetos (ZUCCHI et al., 2011; SMAOUI et al., 2012). Entre as actinobactérias, destacam-se as espécies pertencentes ao gênero *Streptomyces* Waksman & Henrici, 1943 por seu grande potencial na produção de substâncias com atividade antibiótica (SWIATEK et al., 2012; LIU et al., 2013). Como exemplos de substâncias com atividade antibióticas produzidas por espécies do gênero *Streptomyces*, pode-se citar a estreptomicina sintetizada por *Streptomyces griseus* (Krainsky 1914), a clorotetraciclina sintetizada por *Streptomyces aureofaciens* Duggar, 1948 emend. Groth et al., 2003 e a terramicina sintetizada por *Streptomyces rimosus* Sobin, Finlay, Kane, 1953 (VINING, 1992; CHATTERJEE et al., 1995; GEBHARDT et al., 2002; GAO et al., 2012; SEIPKE et al., 2012).

Extratos produzidos a partir do cultivo de espécies de *Streptomyces* resultaram em valores de até 70% de mortalidade sobre imaturos de lepidópteros e dípteros (KAUR et al., 2014; NAINI; DEVI, 2014; SAMRI et al., 2016). O cultivo de *Streptomyces* sp. CAI-155, isolado da folhagem de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (chapéu-de-napoleão), resultou na produção de extratos com atividade inseticida sobre *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae), *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Chilo partellus* (Swinhoe, 1885) (Lepidoptera: Crambidae) (VIJAYABHARATHI et al., 2014).

Entre os compostos químicos presentes nos extratos de *Streptomyces* sp. CAI-155, uma amida derivada de ácido graxo foi identificada como responsável pela ação inseticida sobre *H. armigera* (GOPALAKRISHNAN et al., 2016). Outro exemplo



de molécula com atividade inseticida caracterizada a partir de uma espécie de *Streptomyces* é um policetídeo produzido por *Streptomyces* sp. AP-123 que apresentou atividade inseticida de aproximadamente 70% sobre imaturos de *H. armigera* e *S. litura* e os adultos sobreviventes apresentaram má formação e tamanho reduzido (ARASU et al., 2013). Espécies do gênero *Streptomyces* também possuem o potencial de produzir substâncias utilizadas para o controle de insetos-praga como alosamidina (SAKUDA et al., 1986) e colesterol oxidase (CHO et al., 1995).

### **2.3. Exploração biotecnológica de quitinases com ênfase para o controle de insetos**

Após a celulose, a quitina é o biopolímero de maior abundância na natureza e é comumente encontrada exercendo papéis estruturais no exoesqueleto de artrópodes e na parede celular de fungos (SUBASINGHE, 1995; COHEN-KUPIEC, 1998; DAHIYA, 2006).

As quitinases (E.C. 3.2.1.14) são enzimas que realizam a hidrólise de quitina e podem ser classificadas em duas categorias de acordo com o tipo de hidrólise realizada sobre a quitina: endoquitinases e exoquitinases. As endoquitinases (EC 3.2.1.14) atuam hidrolizando ligações internas do polímero de quitina e formam oligômeros de N-acetilglicosamina solúveis em água. As exoquitinases podem ser divididas em duas categorias: as quitobiosidases (EC 3.2.1.29), que catalisam a hidrólise de quitina a partir da extremidade não redutora formando diacetilquitobiosídeos e as  $\beta$ -1-4-acetilglucosaminidases (EC 3.2.1.30), que atuam sobre os produtos oligoméricos das endoquitinases e quitobiosidases e geram monômeros de N-acetilglicosamina (HAMID et al., 2013).

As quitinases são amplamente distribuídas na natureza e são encontradas em plantas, microrganismos ou insetos (KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1998; ARAKANE; MUTHUKRISHNAN, 2010). Nos sistemas biológicos, as quitinases estão envolvidas em diversas funções como na ecdise dos insetos, na nutrição, parasitismo e defesa de microrganismos, no desenvolvimento de fungos, na resposta de plantas ao ataque de insetos herbívoros e microrganismos

fitopatogênicos ou no sistema imunológico de mamíferos (SAHAI; MANOCHA, 1993; GOODAY, 1995; PATIL et al., 2000; MERZENDORFER; ZIMMICH, 2003; ARAKANE; MUTHUKRISHNAN, 2010).

Com a abundante quantidade de quitina presente na natureza, quitinases são utilizadas na indústria alimentícia, no processamento de drogas e para a produção de produtos cosméticos (MUZZARELLI et al., 2012). Quando utilizadas em momentos distintos dos observados nos sistemas biológicos, as quitinases podem causar danos irreversíveis ao desenvolvimento de determinados organismos alvo. Para o controle de pragas, as quitinases têm sido avaliadas como alternativa para a degradação da quitina presente em insetos e em patógenos de plantas (OPPENHEIM; CHET, 1992; SAHAI; MANOCHA, 1993; CHANDRASEKARAN et al., 2012).

No caso de insetos, as quitinases podem ser uma interessante fonte de resistência a insetos herbívoros (KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1998; CHANDRASEKARAN et al., 2012; WANG et al., 2013). Essa possibilidade é considerada pois a quitina é um dos componentes da membrana peritrófica do intestino médio de insetos que recobre e protege as células epiteliais do intestino dos insetos contra partículas abrasivas e microrganismos que podem invadir a hemocele (LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; LEHANE, 1997).

A membrana peritrófica dos insetos é uma estrutura acelular que se assemelha a um envelope e é composta por quitina, proteínas, proteoglicanos e glicoproteínas. A membrana peritrófica dos insetos tem as funções de (i) proteger o epitélio do intestino médio contra abrasões possivelmente causadas por pedaços de alimento, (ii) proteger a hemocele dos insetos contra a invasão de parasitas e microrganismos e (iii) dividir o ambiente intestinal para melhor eficiência do processo digestivo (LEHANE; BILLINGSLEY, 1996; LEHANE, 1997; TERRA; FERREIRA, 2005). Com a membrana peritrófica desestruturada, as funções desempenhadas por ela são prejudicadas, podendo resultar na interrupção do desenvolvimento larval do inseto (KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1998; WANG; GRANADOS, 2001; KABIR et al., 2006; CHANDRASEKARAN et al., 2012; WANG et al., 2013, KELKENBERG et al., 2015).

As quitinases, além de representarem uma promissora forma de controle de pragas por sua eficiência, também se apresentam como interessantes opções de controle do ponto de vista de segurança alimentar a mamíferos, pois esses organismos não possuem quitina em sua composição e as chances de toxidez das quitinases a esse grupo de seres vivos é muito reduzida (EURICH et al., 2009).

A aplicação das quitinases no controle de pragas pode ser feita de diferentes maneiras. Em função de sua natureza proteica, a informação genética que codifica uma quitinase pode ser incorporada ao genoma de organismos de interesse comercial por meio das tecnologias de engenharia genética, resultando em organismos geneticamente modificados que expressem as quitinases e, possivelmente, sejam resistentes ao ataque de insetos-praga.

A expressão de quitinases em plantas transgênicas tem sido reportada como eficiente método de controle de insetos (DING et al., 1998; CORRADO et al., 2008) e a transformação de microrganismos utilizados em programas de controle microbiano de insetos-praga também se mostra viável pois a expressão de quitinases nesses organismos podem torná-los mais eficazes para o controle de pragas (WANG et al., 2013).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Produção do extrato quitinolítico por *Streptomyces* sp. ENT-21

A actinobactéria *Streptomyces* sp. ENT-21 foi isolada a partir do inseto *Acromyrmex subterraneus brunneus* Forel, 1893 (Hymenoptera: Formicidae) (ZUCCHI et al., 2011).

Para produção do extrato quitinolítico, *Streptomyces* sp. ENT-21 foi cultivada em meio Czapek modificado (QCz) composto por 10,0 g de quitina coloidal; 2,0 g de NaNO<sub>3</sub>; 1,0 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g de MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O; 0,5 g de KCl; 0,01 g de FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O e 16 g de ágar em 1,0 L de água para produção do extrato quitinolítico (ROSSI et al., 2015).

A quitina coloidal foi preparada de acordo com método proposto por Ramírez et al. (2004) com modificações. Para isso, uma parte de quitina cristalina (Sigma) foi incubada com cinco partes de ácido clorídrico (37% p/V) por 50 minutos (min) em temperatura ambiente e agitação constante. Após incubação, a solução de quitina+ácido clorídrico foi transferida para um bécker contendo 1 L de água deionizada. A solução formada foi filtrada em sistema de filtração à vácuo para retirada da água e coleta da quitina coloidal. A quitina coloidal coletada foi sedimentada por centrifugação (4.000xg, 25°C, 10 min) e, após descartar o sobrenadante, o sedimento foi lavado (3x) com tampão fosfato de sódio 0,1 M pH=7,0 até que o pH da solução se estabilizasse em pH=7,0. Uma última lavagem com água foi realizada para retirada do tampão fosfato.

Após o cultivo do microrganismo em meio QCz sólido, um pré-inóculo foi preparado por meio da inoculação de 2 discos de 0,5 cm da cultura de *Streptomyces* sp. ENT-21 em frasco Erlenmeyer contendo 50 mL de meio líquido QCz mantido sob agitação constante de 180 rpm a 28°C por 3 dias. Após esse período, alíquotas de 1 mL desse pré-inóculo foram adicionadas a 50 mL de meio QCz que foram incubados a 28°C e 180 rpm. Após 8 dias de cultivo, os sobrenadantes obtidos após centrifugação (4.000xg, 15 min, 4°C) foram considerados os extratos quitinolíticos de *Streptomyces* sp. ENT-21. Uma parte do extrato quitinolítico (80 mL) foi fervida (100°C; 5 min) em banho maria para inativação da atividade quitinolítica.

### 3.2. Determinação do pH ótimo do extrato quitinolítico produzido por *Streptomyces* sp. ENT-21

A determinação do pH ótimo da atividade quitinolítica do extrato produzido por *Streptomyces* sp. ENT-21 foi realizada utilizando quitina coloidal como substrato (15 mg/mL). As reações compostas por 100 µL do extrato enzimático de *Streptomyces* sp. ENT-21, 50 µL de quitina coloidal e 50 µL de solução tampão (Tabela 1) foram incubadas em banho-maria a 30°C. Após 120 min, 200 µL do reagente DNS (NOELTING; BERNFELD, 1948) foram adicionados às amostras e as mesmas foram fervidas em bloco seco (100°C; 5 min). Em seguida, as amostras foram arrefecidas até temperatura ambiente e foram adicionados 1600 µL de água. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro regulado no comprimento de onda de 550 nm. Foram realizadas três repetições em cada pH e os valores de absorbância foram transformados para porcentagem.

**Tabela 1.** Soluções tampão utilizadas nos ensaios de determinação de pH ótimo e de atividade com suas respectivas faixas de pH.

Tampão	pH
Citrato-Fosfato de sódio (100mM)	4,0-7,0
Fosfato de sódio (100mM)	7,0-8,0
Tris-HCl (100mM)	8,0-8,6
Glicina-NaOH (100mM)	8,6-10,0
Fosfato de sódio-NaOH (100mM)	11,0

Obs.: Preparo dos tampões de acordo com Fasman (1970).

### 3.3. Detecção da atividade de quitinase no extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21

O substrato utilizado para detecção de atividade quitinolítica no extrato foi a quitina coloidal (15 mg/mL). A reação para detecção da atividade quitinolítica foi composta por 100 µL do extrato enzimático de *Streptomyces* sp. ENT-21, 50 µL de quitina coloidal (15 mg/mL) e 50 µL de tampão glicina-NaOH pH=9,0. Em intervalos

de 30 min, 200  $\mu$ L do reagente DNS foram adicionados às amostras para interrupção da reação e quantificação dos grupos redutores formados (NOELTING; BERNFELD, 1948). Após fervura em bloco seco (100°C; 5 min), as amostras foram arrefecidas até temperatura ambiente e 1600  $\mu$ L de água foram adicionados às amostras. A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro regulado no comprimento de onda de 550 nm.

Uma curva padrão de glicose (grupo redutor) foi utilizada como referência para os cálculos de atividade. Uma unidade (U) foi definida como a quantidade de enzima responsável pela formação de 1  $\mu$ mol de grupos redutores por minuto. Foram realizadas reações controle (branco de enzima e branco de substrato).

#### **3.4. Avaliação do desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em dietas contendo o extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21**

Uma lagarta neonata de *S. frugiperda* foi colocada em um poço (2 cm de diâmetro por 1,5 cm de altura) de uma placa de cultivo de células de 12 poços contendo uma porção de aproximadamente 5 g de dieta artificial baseada em feijão cozido e farelo de soja de acordo com recomendações descritas por Parra (2001). Os efeitos do extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 foram observados após aplicação de 200  $\mu$ L do extrato quitinolítico sobre uma porção de dieta artificial colocada em cada poço da placa com posterior período para absorção do extrato pela dieta e secagem da superfície da dieta antes da inserção de 1 lagarta recém eclodida por poço (Figura 1).

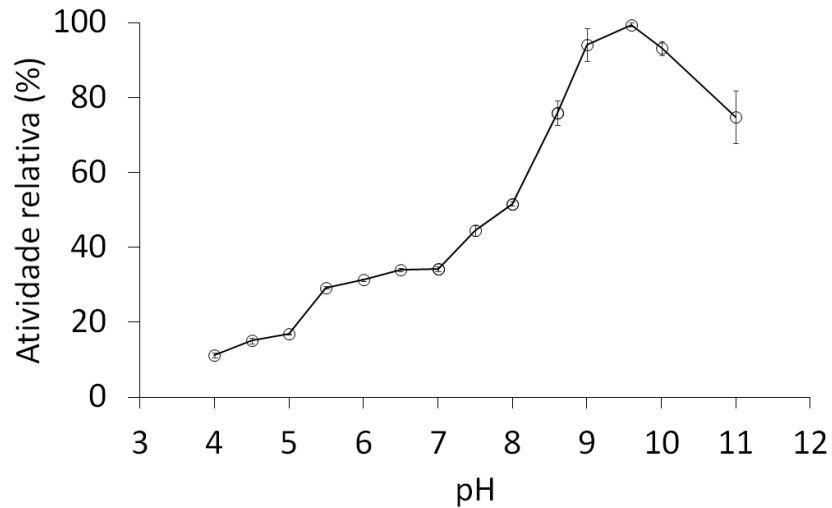


**Figura 1.** Representação de uma repetição do bioensaio em placas de cultivo de células contendo dieta artificial para avaliação do efeito do extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 sobre o desenvolvimento larval de *Spodoptera frugiperda*.

O desenvolvimento das lagartas na presença do extrato foi realizado em condições controladas ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $60\pm 10\%$  e fotofase de 14 horas). Parâmetros biológicos como mortalidade, período larval, ganho de peso das lagartas entre o 13<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dias após o início da alimentação e peso de pupas com 24h após a formação foram avaliados. Ensaios controle contendo H<sub>2</sub>O deionizada autoclavada (120 atm; 20 min) e o extrato quitinolítico fervido (sem atividade quitinolítica) foram realizados. Os tratamentos foram replicados com 8 repetições, sendo um grupo de 12 lagartas considerado uma repetição. As médias obtidas foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ( $p\leq 0,05$ ) utilizando o programa R versão 3.1.0 (R CORE TEAM, 2014).

#### 4. RESULTADOS

O extrato quitinolítico produzido após o cultivo de *Streptomyces* sp. ENT-21 em meio QCz apresentou atividade quitinolítica ótima em pH alcalino (Figura 2).



**Figura 2.** pH ótimo da atividade quitinolítica do extrato produzido pelo cultivo de *Streptomyces* sp. ENT-21 em meio contendo quitina.

A quantificação da atividade quitinolítica do extrato de *Streptomyces* sp. ENT-21 em pH alcalino (pH=9,0) foi de  $49,33 \pm 1,71$  U/mL de extrato. Após fervura por 5 minutos, a atividade quitinolítica do extrato não foi detectada.

O fornecimento de dieta artificial contendo aproximadamente 10U (200  $\mu$ L) do extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 para lagartas de *S. frugiperda* recém eclodidas resultou em valores superiores de mortalidade larval ( $59,37 \pm 8,42\%$ ) e redução de aproximadamente 40% no ganho de peso das lagartas sobreviventes no tratamento contendo atividade quitinolítica em relação aos tratamentos contendo o extrato fervido (aplicação do extrato sem atividade quitinolítica) e no tratamento controle (aplicação de água deionizada e autoclavada) (Tabela 2).



**Tabela 2.** Avaliação do desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* em dieta contendo extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 (média±erro padrão).

Tratamento	Mortalidade (%)	Tempo letal (dias)	Período larval (dias)	Peso de pupas (g)	Ganho de peso (g)
Extrato (10U)	59,37±8,42a	7,54±1,06a	22,64±2,83a	0,555±0,011a	0,22±0,03b
Extrato fervido (0U)	29,17±4,72b	10,05±0,93a	21,78±0,49a	0,569±0,006a	0,33±0,03a
Controle (0U)	14,57±4,38b	10,66±2,30a	22,21±0,44a	0,542±0,007a	0,39±0,04a

Médias na coluna seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p \geq 0,05$ ).

## 5. DISCUSSÃO

O uso de extratos brutos obtidos pelo cultivo de *Streptomyces* spp. em meio contendo quitina para indução da produção de quitinases visando à supressão do desenvolvimento de insetos-praga foi observado no presente trabalho e por Quecine *et al.* (2011). Na concentração avaliada, o extrato quitinolítico produzido por *Streptomyces* sp. ENT-21 necessitou da manutenção da atividade quitinolítica para a supressão do desenvolvimento de *S. frugiperda*, sugerindo o envolvimento de quitinase(s) diretamente com a atividade inseticida.

O extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 possivelmente alterou propriedades como permeabilidade e capacidade de proteção ao epitélio do intestino médio da membrana peritrófica de *S. frugiperda* (KELKENBERG *et al.*, 2015; BERINI *et al.*, 2016). Com a possível desestruturação da membrana peritrófica, o extrato quitinolítico resultou na supressão do desenvolvimento larval de *S. frugiperda* assim como observado em outros insetos (KRAMER; MUTHUKRISHNAN, 1998; CORRADO *et al.*, 2008; CHANDRASEKARAN *et al.*, 2012).

A combinação dos fatores associados com a atividade inseticida presentes no extrato quitinolítico (principalmente a ação quitinolítica) de *Streptomyces* sp. ENT-21 com outros agentes de controle de pragas por piramidação gênica ou por sua utilização em conjunto com outras formas de controle tradicional poderá ser avaliada para auxiliar o controle de insetos-praga (REGEV *et al.*, 1996; DING *et al.*, 1998).

A presença de outras moléculas inseticidas diferentes de quitinases no extrato quitinolítico produzido deve ser considerada, visto que várias moléculas inseticidas como um tipo de policetídeo (ARASU *et al.*, 2013), alosamidina (SAKUDA *et al.*, 1986) e colesterol oxidase (CHO *et al.*, 1995) também foram isoladas a partir de outras espécies de *Streptomyces* spp. Considerando que a mortalidade larval de *S. frugiperda* não foi alterada em relação ao controle quando o extrato quitinolítico foi fervido, outras moléculas inseticidas possivelmente presentes no extrato produzido podem ter perdido sua atividade inseticida pelo processo de fervura (termolábeis) ou as mesmas podem necessitar da atividade quitinolítica para expressar sua característica inseticida.

## 6. REFERÊNCIAS

ARAKANE, Y.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinase and chitinase-like proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 67, n. 2, p. 201-216, 2010.

ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A.; SARITHA, V.; DURAIPIDIYAN, V.; MUTHUKUMAR, C.; KIM, S. Antifeedant, larvicidal and growth inhibitory bioactivities of novel polyketide metabolite isolated from *Streptomyces* sp. AP-123 against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **BMC Microbiology**, London, v. 13:105, 2013.

BERINI, F.; CACCIA, S.; FRANZETTI, E.; CONGIU, T.; MARINELLI, F.; CASARTELLI, M.; TETTAMANTIA, G. Effects of *Trichoderma viride* chitinases on the peritrophic matrix of Lepidoptera. **Pest Management Science**, Sussex, v. 72, p. 980-989, 2016.

BERNAL, J. S.; PRASIFKA, J.; SÉTAMOU, M.; HEINZ, K. M. Transgenic insecticidal cultivars in integrated pest management: Challenges and opportunities. In: KOUL, O., DHALIWAL, G. S. (Eds.) **Integrated pest management: Potential, constraints and challenges**. Wallingford: CABI Publishing, 2004, p. 123-145.

BLANCO, C. A.; CHIARAVALLE, W.; DALLA-RIZZA, M.; FARIAS, J. R.; GARCÍA-DEGANO, M. F.; GASTAMINZA, G.; MOTA-SÁNCHEZ, D.; MURÚA, M. G.; OMOTO, C.; PIERALISI, B. K.; RODRÍGUEZ, J. Current situation of pests targeted by *Bt* crops in Latin America. **Current Opinion in Insect Science**, Amsterdam, v. 15, p. 131-138, 2016.

CAPINERA, J. Fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae). **Publication EENY098**. University of Florida, Gainesville: Institute of Food and Agricultural Sciences, 1999. p. 1-6.

CHANDRASEKARAN, R.; REVATHI, K.; NISHA, S.; KIRUBAKARAN, S. A.; SATHISH-NARAYANAN, S.; SENTHIL-NATHAN, S. Physiological effect of chitinase purified from *Bacillus subtilis* against the tobacco cutworm *Spodoptera litura* Fab. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 104, n. 1, p. 65-71, 2012.

CHATTERJEE, S.; VIJAYAKUMAR, E. K.; FRANCO, C. M.; MAURYA R.; BLUMBACH, J.; GANGULI, B. N. Phencomycin, a new antibiotic from a *Streptomyces* species HIL Y-9031725. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 48, p. 1353–1354, 1995.

CHO, H. J., CHOI, K. P., YAMASHITA, M., MORIKAWA, H., MUROOKA, Y. Introduction and expression of the *Streptomyces* cholesterol oxidase gene (ChoA), a potent insecticidal protein active against boll weevil larvae, into tobacco cells. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 44, p.133-138, 1995.

COHEN-KUPIEC, R.; CHET, I. The molecular biology of chitin digestion. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 270-277, 1998.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento (Março, 2017). Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 29 mar. 2017.

CORRADO, G.; ARCIELLO, S.; FANTI, P.; FIANDRA, L.; GARONNA, A.; DIGILIO, M. C.; LORITO, M.; GIORDANA, B.; PENNACCHIO, F.; RAO, R. The Chitinase A from the baculovirus AcMNPV enhances resistance to both fungi and herbivorous pests in tobacco. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 17, p. 557-571, 2008.

CRUZ, I. Milho: ataque precoce. **Cultivar Grandes Culturas**, Pelotas, v.11, n. 118, p. 20-23, 2009.

DAHIYA, N.; TEWARI, R.; HOONDAL, G. S. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 71, p. 773-782, 2006.

DING, X.; GOPALAKRISHNAN, B.; JOHNSON, L. B.; WHITE, F. F.; WANG, X.; MORGAN, T. D.; KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect resistance of transgenic tobacco expressing an insect chitinase gene. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 7, n. 2, p. 77-84, 1998.

EDGE, J. M.; BENEDICT, J. H.; CARROLL, J. P.; REDING, H. K. Bollgard cotton: an assessment of global economic, environmental, and social benefits. **Journal of Cotton Science**, Baton Rouge, v. 5, n. 2, p. 121-136, 2001.

EURICH, K.; SEGAWA, M.; TOEI-SHIMIZU, S.; MIZOGUCHI, E. Potential role of chitinase 3-like-1 in inflammation associated carcinogenic changes of epithelial cells. **World Journal of Gastroenterology**, Pleasanton, v. 15, n. 42, p. 5249-5259, 2009.

FASMAN, G. D. **Handbook of Biochemistry and Molecular Biology**. Boca Raton: CRC Press, v.1, p. 132-146, 1970.

FARIAS, J. R.; ANDOW, D. A.; HORIKOSHI, R. J.; BERNARDI, D.; RIBEIRO, R. D. S.; NASCIMENTO, A. R. D.; SANTOS, A. C. D.; OMOTO, C. Frequency of Cry1F resistance alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science**, Sussex, v. 72, p. 2295-2302, 2016.

FARIAS, J. R., ANDOW, D. A., HORIKOSHI, R. J., SORGATTO, R. J., FRESIA, P., SANTOS, A. C., OMOTO, C. Field-evolved resistance to Cry1F maize by *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Crop Protection**, Oxford, v. 64, p. 150-158, 2014.

FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; GATEHOUSE, J.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 15, p. 13-19, 2006.

FRANKENHUYZEN, K. V. Insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 101, p. 1-16, 2009.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002, 920p.

GAO, C.; HINDRA; MULDER, D.; YIN, C.; ELLIOT, M. A. Crp is a global regulator of antibiotic production in *Streptomyces*. **mBio**, Washington, v. 3, p. 01-12, 2012.

GATEHOUSE, J. A. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. **Current Protein and Peptide Science**, Sharjah, v. 12, p. 409-416, 2011.

GEBHARDT, K.; SCHIMANA, J.; KRASTEL, P.; DETTNER, K.; RHEINHEIMER, J.; ZEECK, A.; FIEDLER, H. Endophenazines A-D, New phenazine antibiotics from the arthropod associated endosymbiont *Streptomyces anulatus*. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. **The Journal of Antibiotics**, Tokyo, v. 55, p. 794-800, 2002.

GOPALAKRISHNAN, S.; RAJENDRAN, V.; ARUMUGAM, S.; SHARMA, H. C.; VADLAMUDI, S.; BHIMINENI, R. K.; GONZALEZ, S. V.; MELØ, T. M.; SIMIC, N. Insecticidal activity of a novel fatty acid amide derivative from *Streptomyces* species against *Helicoverpa armigera*. **Natural Product Research**, Oxon, v. 30, p. 2760-2769, 2016.

GOODAY G. W. Diversity of roles for chitinases in nature. In: ZAKARIA, M. B.; WAN MUDA, W. M.; ABDULLAH, M. P (Eds.). **Chitin and Chitosan**. Malaysia: Penerbit University Kebangsaan, 1995. p.191-202.

HAMID, R.; KHAN, M. A.; AHMAD, M.; AHMAD, M. M.; ABDIN, M. Z.; MUSARRAT, J.; JAVED, S. Chitinases: An update. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, New Delhi, v. 5, n. 1, p. 21-29, 2013.

KABIR, K. E.; HIROWATARI, D.; WATANABE, K.; KOGA, D. Purification and characterization of a novel isozyme of chitinase from *Bombyx mori*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n. 1, p. 252-262, 2006.

KAUR, T.; VASUDEV, A.; SOHAL, S.K.; MANHAS, R.K. Insecticidal and growth inhibitory potential of *Streptomyces hydrogenas* DH16 on major pest of India, *Spodoptera litura* (Fab.) (Lepidoptera: Noctuidae). **BMC Microbiology**, London, v. 14: 227, 2014.

KELKENBERG, M.; ODMAN-NARESH, J.; MUTHUKRISHNAN, S.; MERZENDORFER, H. Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 56, p. 21-28, 2015.

KOGAN, M. Integrated Pest Management: Historical Perspectives and Contemporary Developments. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 4, p. 243-270, 1998.

KRAMER, K. J.; MUTHUKRISHNAN, S. Insect chitinases: Molecular biology and potential use as biopesticides. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v. 27, p. 887-900, 1998.

LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 42, p. 525-550, 1997.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. **The Biology of Insect Midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. 486p.

LEMES, A. R. N.; DAVOLOS, C. C.; LEGORI, P. C. B. C.; FERNANDES, O. A.; FERRÉ, J., LEMOS, M. V. F. Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 Proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **Plos One**, San Francisco, v.9, n. 10, e107196, 2014.

LIU, G.; KEITH, F. C.; GOVIND, C.; GUOQING, N.; HUARONG, T. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 77, p. 112-143, 2013.

MARTINELLI, S.; CLARK, P. L.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-FILHO, M. C.; FOSTER, J. E., OMOTO, C. Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 97, p. 225-231, 2007.

MENDES, S. M.; VIANA, P. A.; WAQUIL, J. M. Manejo integrado de Pragas em sorgo sacarino. **Seminário Temático Agroindustrial de Produção de Sorgo Sacarino para Bioetanol**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, v. 145, 2012. p. 45-51.

MERZENDORFER, H.; ZIMMICH, L. Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 206, p. 4393-4412, 2003.

MUZZARELLI, R. A. A.; BOUDRANT, J.; MEYER, D.; MANNO, N.; DEMARCHIS, M.; PAOLETTI, M. G. Currents views on fungal chitin/ chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v,87, p. 995-1012, 2012.

NAINE, S. J.; DEVI, C. S. Larvicidal and repellent properties of *Streptomyces* sp. VITJS4 crude extract against *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Polish Journal of Microbiology**, Warsaw, v. 63, p. 341-348, 2014.

NOELTING, G.; BERNFELD, P. Sur les enzymes amylolytiques. III. La  $\beta$ -amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d' $\alpha$ -amylase. **Helvetica Chimica Acta**, Weinheim, v. 31, p. 286-290, 1948.

OLIVEIRA, C. M.; AUAD, A. M.; MENDES, S. M.; FRIZZAS, M. R. Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection**, Oxford, v. 56, p. 50-54, 2014.

OERKE, E. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, New York, v. 144, n. 1, p. 31-43, 2006.

OERKE, E. C.; DEHNE, H. W. Safeguarding production-losses in major crops and the role of crop protection. **Crop Protection**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 275-285, 2004.

OPPENHEIM, A. B.; CHET, I. Cloned chitinases in fungal plant-pathogen control strategies. **Trends in Biotechnology**, London, v. 10, p. 392-394, 1992.

PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. 6ed. Piracicaba: Fealq, 2001. 134p.

PATIL, R. S.; GHORMADE, V.; DESHPANDE, M. V. Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 26, p. 473-483, 2000.

QUECINE, M. C.; LACAVA, P. T.; MAGRO, S. R.; PARRA, J. R. P.; ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Partial characterization of chitinolytic extract from endophytic *Streptomyces* sp. and its effects on the boll weevil. **Journal of Agricultural Science and Technology**, Tehran, v. 5, p. 420-427, 2011.

R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2014. Disponível em: <<http://www.Rproject.org>>. Acesso em: 18 abr. 2017.

RAMÍREZ, M. G.; AVELIZAPA, L. I. R.; AVELIZAPA, N. G. R.; CAMARILLO, R. C. Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue RR, a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 56, p. 213-219, 2004.

RANJEKAR, P. K.; PATANKAR, A.; GUPTA, V.; BHATNAGAR, R.; BENTUR, J.; ANANDA KUMAR, P. Genetic engineering of crop plants for insect resistance. **Current Science**, Bangalore, v. 84, p. 321-329, 2003.



REGEV, A.; KELLER, M.; STRIZHOV, N.; SHEN, B.; PRUDOVSKY, E.; CHET, I.; GINZBERG, I.; KONCZ-KALMAN, Z.; KONCZ, C.; SCHELL, J.; ZILBERSTEIN, A. Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3581-3386, 1996.

ROSSI, G. D., ZUCCHI, T. D., GUIDOLIN, A. S., PERUCHI, A., CÔNSOLI, F. L. Chitin-degrading enzymes from an actinomycete ectosymbiont of *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae). **Annals of Microbiology**, New York, v. 65, p. 565-574, 2015.

ROSSI, G. D.; LABATE, M. T. V.; LABATE, C. A.; VINSON, S. B.; CÔNSOLI, F. L. Characterization of a *Toxoneuron nigriceps* (Viereck) (Hymenoptera: Braconidae) derived chitinase and its potential for pest control. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 104, p.96-102, 2012.

SAHAI, A. S.; MANOCHA, M. S. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 11, p. 317-338, 1993.

SAKUDA, S., ISOGAI, A., MATSUMOTO, S., SUZUKI, A., KOSEKI, K. The structure of allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor, produced by *Streptomyces* sp. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 27, p. 2475-2478, 1986.

SAMRI, S. E.; BAZ, M.; GHALBANE, I.; MESSOUSSI, S.; ZITOUNI, A.; MEZIANE, A. BARAKATE, M. Insecticidal activity of a Moroccan strain of *Streptomyces phaeochromogenes* LD-37 on larvae, pupae and adults of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **Bulletin of Entomological Research**, Cambridge, v. 107, n. 2, p. 217-224, 2016

SANAHUJA, G.; BANAKAR, R.; TWYMAN, R. M.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. **Plant Biotechnology Journal**, New Jersey, v. 9, p. 283-300, 2011.

SANTOS-AMAYA, O. F.; RODRIGUES, J. V. C.; SOUZA, T. C.; TAVARES, C. S.; CAMPOS, S. O.; GUEDES, R. N. C.; PEREIRA, E. J. G. Resistance to dual-gene *Bt* maize in *Spodoptera frugiperda*: selection, inheritance, and cross-resistance to other transgenic events. **Scientific Reports**, London, v. 5:18243, 2015.

SEIPKE, R. F.; KALTENPOTH, M.; HUTCHINGS, M. I. *Streptomyces* as symbionts: an emerging and widespread theme? **FEMS Microbiology Reviews**, Oxford, v. 36, p. 862-876, 2012.

SILVA, D. M.; BUENO, A. F.; ANDRADE, K.; STECCA, C. S.; OLIVEIRA, P. M.; NEVES, J.; OLIVEIRA, M. C. N. Biology and nutrition of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) fed on different food sources. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 74, p. 18-31, 2017.

SMAOUI, S.; MATHIEU, F.; ELLEUCH, L.; COPPEL, Y.; MERLINA, G.; KARRAY-REBAI, I.; MELLOULI, L. Taxonomy, purification and chemical characterization of four bioactive compounds from new *Streptomyces* sp. TN256 strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, New York, v. 28, p. 793-804, 2012.

SPARKS, T.C. Insecticide discovery: An evaluation and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 107, p. 8-17, 2013.

STORER, N. P.; BABCOCK, J. M.; SCHLENZ, M.; MEADE, T.; THOMPSON, G. D.; BING, J. W.; HUCKABA, R. M. Discovery and characterization of field resistance to *Bt* maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Oxford, v. 103, p. 1031-1038, 2010.

STORER, N. P., KUBISZAK, M. E., KING, J. E., THOMPSON, G. D., SANTOS, A. C. Status of resistance to *Bt* maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 110, p. 294-300, 2012.

SUBASINGHE, S. The development of crustacean and mollusc industries for chitin and chitosan resources. In: ZAKARIA, M. B.; MUDAWM, W.; ABDULLAH, M. P. (Eds.). **Chitin and Chitosan**. Malaysia: Penerbit University Kebangsaan, 1995. p. 27-34.

SWIATEK, M. A.; TENCONI, E.; RIGALI, S.; WEZEL, G. P. Functional analysis of the N-acetylglucosamine metabolic gene of *Streptomyces coelicolor* and role in control of development and antibiotic production. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 194, p. 1136-1144, 2012.

TABASHNIK, B. E.; BRÉVAULT, T.; CARRIÈRE, Y. Insect resistance to *Bt* crops: lessons from the first billion acres. **Nature Biotechnology**, New York, v. 31, p. 510-521, 2013.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Biochemistry of Digestion. In: GILBERT, L. I.; IATROU, K.; GILL, S. S. (Eds.) **Comprehensive Molecular Insect Science**. Oxford: Elsevier, v. 4, 2005. p. 171-224.

VIJAYABHARATHI, R.; KUMARI, B. R.; SATHYA, A.; SRINIVAS, V.; ABHISHEK, R.; SHARMA, H. C.; GOPALAKRISHNAN, S. Biological activity of entomopathogenic actinomycetes against lepidopteran insects (Noctuidae: Lepidoptera). **Canadian Journal of Plant Science**, Ontario, v. 94, p. 759-769, 2014.

VINING, L. C. Secondary metabolism, inventive evolution and biochemical diversity - a review. **Gene**, Amsterdam, v. 115, p. 135-140, 1992.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): Identification of potential PM target sites for insect control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, New Jersey, v. 47, p. 110-118, 2001.

WANG, Y.; CHOI, J. Y.; ROH, J. Y.; TAO, X. Y.; LIU, Q.; LEE, J. H.; KIM, J. S.; KIM, W. J.; JE, Y. H. Insecticidal activity of the chitinase from the *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. **Entomological Research**, New Jersey, v. 43, p. 63-69, 2013.

ZUCCHI, T. D.; GUIDOLIN, A. S.; CÔNSOLI, F. L. Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). **Microbiological Research**, Jena, v. 166, p. 68-76, 2011.