

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

**ATIVIDADE INSETICIDA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS  
POR *Streptomyces* sp. ENT-21 SOBRE LAGARTAS DE  
*Diatraea saccharalis* (FABRICIUS) (LEPIDOPTERA:  
CRAMBIDAE)**

**Ana Letícia Zéro dos Santos**

Engenheira Agrônoma

2019

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

**ATIVIDADE INSETICIDA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS  
POR *Streptomyces* sp. ENT-21 SOBRE LAGARTAS DE  
*Diatraea saccharalis* (FABRICIUS) (LEPIDOPTERA:  
CRAMBIDAE)**

**Discente: Ana Letícia Zéro dos Santos**

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

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

**2019**

S237a

Santos, Ana Letícia Zéro dos

Atividade inseticida de metabólitos produzidos por *Streptomyces* sp. ENT-21 sobre lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae) / Ana Letícia Zéro dos Santos. -- Jaboticabal, 2019

33 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Guilherme Duarte Rossi

1. Quitinase. 2. Metabólitos secundários. 3. Simbiose. 4. Biotecnologia. 5. Manejo insetos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ATIVIDADE INSETICIDA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR *Streptomyces* sp. ENT-21 SOBRE LAGARTAS DE *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

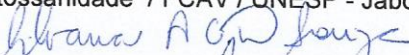
**AUTORA: ANA LETÍCIA ZÉRO DOS SANTOS**

**ORIENTADOR: GUILHERME DUARTE ROSSI**

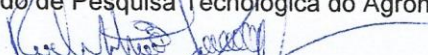
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (ENTOMOLOGIA AGRÍCOLA), pela Comissão Examinadora:



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



Pesquisadora Dra. SILVANA APARECIDA CRESTE DIAS DE SOUZA  
Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Cana / IAC - Ribeirão Preto/SP



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

Jaboticabal, 25 de julho de 2019

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**Ana Letícia Zéro dos Santos** - nascida em Pirassununga-SP no dia 19 de junho de 1991. Em agosto de 2011, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Câmpus de Uberlândia. Foi estagiária do Laboratório de Controle Biológico (Lacob) da UFU sob orientação do Prof. Dr. Marcus Vinícius Sampaio, onde desenvolveu trabalhos de iniciação científica em Entomologia com bolsa concedida pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Em agosto de 2017, ingressou no Programa de Pós-graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) para realização do mestrado sob orientação do Prof. Dr. Guilherme Duarte Rossi.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por me guiar e capacitar para a realização deste trabalho;

Ao Professor Dr. Guilherme Duarte Rossi pela orientação e pelos ensinamentos transmitidos;

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Entomologia Agrícola) (PPGEA), Unesp/FCAV, pelo aprendizado e convivência;

Ao Professor Dr. João Martins Pizauro Júnior, Departamento de Tecnologia, Unesp/FCAV, pelas orientações, sugestões e ajuda no processo de purificação do extrato quitinolítico;

Ao Professor Dr. Ricardo Antonio Polanczyk e a todos do Laboratório de Controle Microbiano de Artrópodes Pragas, à Professora Dra. Janete Aparecida Desidério e ao técnico Rodrigo Uchiyama do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, por disponibilizarem os equipamentos necessários para o cultivo do microrganismo;

À Dra. Silvana Creste e à Pós-doutoranda Andressa Peres Bini do Instituto Agrônomo de Campinas pelo auxílio na identificação do microrganismo;

Aos colegas de laboratório Juliana Barroso, Ciro Guidotti, Diandro Barilli, Nicole de Paula, Vitor Vieira, Cíntia Gomes, Sandy Fonseca e Leonardo Thiesen pelos momentos de descontração, pela ajuda e boa convivência;

Aos colegas do PPGEA pela amizade, companhia, conselhos, risadas e apoio;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos;

À minha mãe Elisabete Ap. Zero dos Santos por todo amor e incentivo na busca pelo conhecimento e formação profissional;

À minha família e aos meus amigos pelo amparo, compreensão e amor incondicional

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	ii
<b>ABSTRACT</b> .....	iii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
2.1. Danos causados por <i>Diatraea saccharalis</i> (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) e formas de controle.....	3
2.2. <i>Streptomyces</i> spp. como fonte de compostos inseticidas.....	4
2.3. Quitinases no Manejo Integrado de Pragas .....	6
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	8
3.1. Cultivo de <i>Streptomyces</i> sp. ENT-21 e visualização da atividade quitinolítica em meio sólido .....	8
3.2. Produção do extrato quitinolítico.....	9
3.3. Confirmação da identidade do microrganismo.....	9
3.4. Detecção da atividade de quitinase .....	10
3.5. Detecção da atividade de $\beta$ -N-acetilglicosaminidase.....	11
3.6. Quantificação de proteínas totais.....	11
3.7. Fracionamento do extrato quitinolítico de <i>Streptomyces</i> sp. ENT-21 por filtração molecular em Sephadex.....	12
3.8. Agrupamento de frações e detecção da atividade enzimática .....	12
3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida .....	13
3.10. Avaliação da atividade inseticida .....	13
<b>4. RESULTADOS</b> .....	16
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	21
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	23
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	24

**ATIVIDADE INSETICIDA DE METABÓLITOS PRODUZIDOS POR  
*Streptomyces* sp. ENT-21 SOBRE LAGARTAS DE *Diatraea saccharalis*  
(FABRICIUS) (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

**RESUMO** - A possibilidade da evolução da resistência dos insetos à maioria dos inseticidas disponíveis e a necessidade por moléculas específicas para o manejo de organismos alvos e não tóxicas ao meio ambiente guiam a contínua busca por novos compostos com atividade inseticida. No presente trabalho, investigamos o potencial da actinobactéria *Streptomyces* sp. ENT-21 como fonte de moléculas inseticidas sobre lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), uma importante praga da cana-de-açúcar. Um extrato quitinolítico foi produzido a partir do cultivo de *Streptomyces* sp. ENT-21 em meio contendo quitina. Este extrato foi fracionado por filtração molecular (Sephadex G25) e separado em amostras proteicas e não proteicas. Os efeitos do extrato quitinolítico bruto e fracionado sobre a taxa de mortalidade e peso das lagartas de *D. saccharalis* foram avaliados. A adição do extrato quitinolítico bruto de *Streptomyces* sp. ENT-21 à dieta artificial resultou em 100% de mortalidade das lagartas de *D. saccharalis*. Após fracionamento a amostra não proteica resultou em maior mortalidade e redução do peso das lagartas em relação à fração proteica. Esses dados sugerem que a atividade quitinolítica não seja o principal modo de ação responsável pela atividade inseticida do extrato quitinolítico. Os dados também sugerem um possível efeito sinérgico entre os composto proteicos e não proteicos presentes no extrato bruto de *Streptomyces* sp. ENT-21.

**Palavras-chaves:** quitinase, metabólitos secundários, simbiose, biotecnologia, manejo de insetos.



**INSECTICIDE ACTIVITY OF METABOLITES PRODUCED BY  
*Streptomyces* sp. ENT-21 ON LARVAL *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS)  
(LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)**

**ABSTRACT** - Insect resistance to most of the available insecticides and the requirement for specific molecules for pest management and safe to the environment guide a continuous search of new insecticidal compounds. In this work, we investigated the potential of the actinobacterium *Streptomyces* sp. ENT-21 as a source of insecticidal molecules against larval *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), an important sugarcane pest. The chitinolytic extract was prepared by cultivating *Streptomyces* sp. ENT-21 in a chitin containing medium. This extract was fractionated using molecular filtration (Sephadex G25) forming protein and non-protein fractions. The effects of the crude chitinolytic extract as well of the fractions were evaluated over the development of *D. saccharalis* larvae in bioassays conducted using artificial diet. The addition of the crude chitinolytic extract to the artificial diet used for rearing larval *D. saccharalis* resulted in 100% of larval mortality. A non-protein fraction resulted in a higher mortality rate and weight reduction over surviving larvae than the protein fraction, suggesting that the chitinolytic activity present in the protein fraction is not the main mode of action involved in the insecticidal activity of the chitinolytic produced extract. Results also suggest a possible synergic effect among protein and non protein compounds in the crude chitinolytic extract from *Streptomyces* sp. ENT-21.

**Keywords:** chitinase, secondary metabolites, symbiosis, biotechnology, pest management.

## 1. INTRODUÇÃO

Grande parte do controle de pragas em sistemas agrícolas de produção é realizado historicamente pela aplicação de moléculas inseticidas obtidas a partir de produtos naturais, como a nicotina (Ujváry 1999), avermectina (Fisher e Mrozik, 1989; Burg e Stapley, 1989) e espinosina (Galm e Sparks, 2016). Além da aplicação direta de produtos naturais, essas moléculas são excelentes moldes para o desenvolvimento de novos compostos sintéticos com características melhoradas para uso no manejo de pragas (Sparks et al., 2017). Porém, a evolução da resistência dos insetos pragas à maioria dos inseticidas disponíveis (Sparks e Nauen, 2015; Farias et al., 2016; Bolzan et al., 2019) e a exigência por moléculas específicas aos organismos alvos e não tóxicas ao meio ambiente guiam uma contínua busca por novas moléculas com atividade inseticida (Sparks, 2013).

Estudos sobre as relações de simbiose entre insetos e microrganismos têm mostrado o enorme potencial que a ecologia química entre esses organismos possui em termos de moléculas bioativas (Beemelmans et al., 2016; Martinez et al., 2019; Chevrette et al., 2019). Um exemplo é a relação de simbiose de formigas cortadeiras (Attini) e fungos basidiomicetos (Basidiomycota: Agaricales) na qual as formigas fornecem nutrientes e proteção contra competidores, enquanto os fungos fornecem alimento para as formigas (Quinlan e Cherrett, 1979; Currie, 2001). Nesta relação, um terceiro grupo de simbiontes é representado por actinobactérias dos gêneros *Streptomyces* e *Pseudonocardia* que produzem antibióticos principalmente para suprimir o crescimento do parasita *Escovopsis* (Ascomycota: Hypocreales) no jardim de fungos (Currie et al., 1999; Currie et al., 2003; Kost et al., 2007).

Actinobactérias do gênero *Streptomyces* são conhecidas por produzirem muitas moléculas bioativas (Carter et al., 2010). Entre essas, observam-se moléculas inseticidas não proteicas como porfirina, policetídeo, alosamidina e avermectina (Sakuda et al., 1986; Fisher e Mrozik, 1989; Burg e Stapley, 1989; Arasu et al., 2013; Martinez et al., 2019) bem como proteínas inseticidas como colesterol oxidase (Cho, 1995; Pollegioni et al., 2009) e quitinases (Broadway et al., 1998; Gongora et al., 2001).

No Brasil, a broca da cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), é um inseto praga que causa grandes prejuízos ao setor produtivo de cana de açúcar (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011; Dinardo-Miranda et al., 2012; Rossato Jr et al., 2019). Apesar do grande sucesso do controle biológico da broca da cana com o parasitoide *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae) (Parra, 2014), este método é utilizado em menos da metade da área de produção de cana de açúcar e o uso de inseticidas para o controle da broca da cana em algumas regiões do País é o principal método utilizado (Dinardo-Miranda, 2008; Parra, 2014). Além disso, duas variedades transgênicas de cana de açúcar com resistência a broca da cana foram desenvolvida como tática complementar para o manejo desse inseto praga (CTNBio, 2019). Porém, tanto o uso de inseticidas em pulverização como a adoção de plantas transgênicas podem resultar na seleção de insetos resistentes (Sparks e Nauen, 2015; Tabashnik e Carrière, 2017) e a disponibilidade de novas moléculas inseticidas é desejável.

No presente trabalho, a actinobactéria *Streptomyces* sp. ENT-21 isolada do tegumento de *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Forel, 1912) (Hymenoptera: Formicidae) (Zucchi et al., 2011) e identificada como produtora de quitinase (Rossi et al., 2015) foi explorada como uma possível fonte de moléculas inseticidas ativas sobre a broca da cana.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Danos causados por *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) e formas de controle

A agricultura brasileira é em grande parte praticada em clima tropical e baseada em diversos fatores que favorecem o desenvolvimento de insetos pragas, como intenso sistema de monoculturas, utilização do Sistema de Plantio Direto (SPD) e sucessão de culturas no mesmo ano agrícola. Com isso, os insetos podem estabelecer várias gerações ao longo do ano, ocasionando diversos danos nas culturas e prejuízos econômicos estimados em torno de US\$14 milhões ao ano (Martinelli et al., 2007; Storer et al., 2012, Busoli et al., 2014, Oliveira et al., 2014)

A broca da cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae), causa danos econômicos a diversas culturas (Mendes et al., 2014; Silva-Brandão et al., 2015) e é uma das principais pragas associadas à cana de açúcar (Cheavegatti-Gianotto et al., 2011). Em plantas de cana de açúcar em estágios iniciais de desenvolvimento, as lagartas causam a morte do botão apical e resultam na morte da planta. Em plantas em estágios de desenvolvimento mais avançados, o consumo de tecidos da planta pelas lagartas implica em alterações no desenvolvimento adequado das plantas como a formação de brotos laterais, enraizamento aéreo, perda de peso da planta, quebra do colmo e entrada de fungos oportunistas que resultam na morte na planta, em perdas de produção ou redução da qualidade tecnológica da produção (Dinardo-Miranda et al., 2012).

As lagartas de *D. saccharalis* podem ser controladas com o uso de inseticidas químicos no primeiro ínstar, estágio que as lagartas ainda alimentam-se das folhas da cana. Após esse período, lagartas de segundo ou terceiro ínstar penetram e permanecem no colmo até a fase adulta (Cruz, 2007), hábito que resulta na redução da eficiência do controle por inseticidas químicos. A liberação do parasitoide *Cotesia flavipes* Cameron, 1891 (Hymenoptera: Braconidae) é realizada em 40% dos canaviais para o manejo de *D. saccharalis*, porém é um método dependente de fatores ambientais e temporais e não é disponível para ser utilizado em toda área de produção de cana de açúcar do País (Parra, 2014).

O Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) lançou em 2017 a primeira cana transgênica no Brasil com resistência a *D. saccharalis* em função da introdução e expressão da proteína Cry1Ab derivada de *Bacillus thuringiensis* (CIB, 217). Esta foi também a primeira tecnologia de milho *Bt* implantada no Brasil e proporcionou níveis significativos no controle de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). Recentemente foi aprovada também para comercialização plantas de cana que expressam proteínas Cry1Ac, compondo mais uma alternativa ao controle de *D. saccharalis* (CTNBio, 2019). Porém, devido ao histórico de resistência de *S. frugiperda* às tecnologias *Bt* (Omoto et al., 2016), ações para o manejo da resistência de *D. saccharalis* a plantas transgênicas com expressão da toxina Cry1Ab devem ser consideradas.

## **2.2. *Streptomyces* spp. como fonte de compostos inseticidas**

*Streptomyces* spp. são bactérias Gram-positivas pertencentes ao filo das Actinobactérias, caracterizadas por apresentarem micélio e se dispersarem por esporos (Chater, 2011). Estas actinobactérias são encontradas em vários ambientes e podem desenvolver seu papel biológico no solo, na água, em plantas ou associados a insetos (Zucchi et al., 2011; Smaoui et al., 2012).

As actinobactérias do gênero *Streptomyces* contribuíram historicamente para o desenvolvimento de compostos inseticidas, como avermectinas e milbemicinas. As avermectinas são produzidas a partir da fermentação da actinobactéria *Streptomyces avermitilis*, sendo as avermectinas A2a, B1a e B2a produzidas em maior quantidade (Fisher e Mrozik, 1989; Burg e Stapley, 1989; Fisher e Mrozik, 1992).

A abamectina, composto usado em vários países como inseticida, nematicida e anti-helmíntico, é formada pela associação de 80% da avermectina B1a e 20% da avermectina B1b (Albers-Schoenberg et al., 1981; Kolar et al., 2008). O benzoato de emamectina é um derivado semi-sintético da abamectina que possui amplo efeito inseticida em lepidópteros (Jansson et al., 1997).

As milbemicinas, isoladas de *Streptomyces hygroscopicus* e *Streptomyces bingchenggensis*, são compostos estruturalmente semelhantes a avermectina e

possuem atividade acaricida e inseticida com toxicidade relativamente baixa para organismos não alvo (Takiguchi et al., 1980; Shoop et al., 1995; Xiang et al., 2008).

O sequenciamento dos genomas de actinomicetos como *Streptomyces coelicolor* e *S. avermitilis* tem revelado o enorme potencial biotecnológico desses microrganismos em função da identificação de um grande número de rotas metabólicas em seus genomas. Os metabólitos resultantes dessas rotas possuem uma grande variedade de estruturas químicas, mas a maioria desses compostos não é produzida sob condições de cultivo padrão. Dessa forma, estudos sobre técnicas de fermentação de alto rendimento e biossíntese combinatória a partir de *Streptomyces* spp. podem gerar novas moléculas bioativas (Bentley et al., 2002; Ikeda et al., 2003, Baltz, 2008; Nett et al., 2009).

Um policetídeo produzido por *Streptomyces* sp. AP-123 foi relatado com atividade inseticida de aproximadamente 70% sobre imaturos de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) e *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775) (Lepidoptera: Noctuidae), além causar má formação e tamanho reduzido nos adultos sobreviventes (Arasu et al., 2013). No extrato de *Streptomyces* sp. CAI-155 foi identificado uma amida derivada de ácido graxo que causou aproximadamente 80% de mortalidade em larvas de *H. armigera* (Gopalakrishnan et al., 2016).

*Streptomyces* sp. são conhecidos também por produzirem proteínas com atividade inseticida, como colesterol oxidase (Cho, 1995; Pollegioni et al., 2009) e quitinases (Broadway et al., 1998; Gongora et al., 2001). A colesterol oxidase é uma enzima com ação inseticida detectada em insetos das Ordens Coleoptera e Lepidoptera (Purcell et al., 1992; Greenplate et al., 1997). O seu efeito inseticida é atribuído à oxidação do colesterol na membrana do epitélio do intestino médio dos insetos seguida do rompimento físico e funcional da membrana (Purcell et al., 1993). As quitinases são enzimas que hidrolisam quitina e que podem ter efeito inseticida quando ingeridas pelos insetos por causarem a perda das funções da membrana peritrófica (Corrado et al., 2008; Patil e Jadhav, 2015; Berine et al., 2016).

### 2.3. Quitinases no Manejo Integrado de Pragas

A quitina é o segundo biopolímero mais abundante na natureza e um dos principais constituintes da parede celular dos fungos, do exoesqueleto dos artrópodes e da membrana peritrófica do intestino médio dos insetos (Tharanathan e Kittur, 2003; Dahiya et al. 2006; Berini et al., 2016). As quitinases são enzimas que catalisam a hidrólise das ligações do tipo  $\beta$ -(1,4) entre as unidades de N-acetilglicosamina (GlcNAc) da quitina.

As quitinases são encontradas em plantas, insetos, crustáceos, fungos e bactérias e sua função biológica é variável nos organismos (Usharani et al., 2011). Suas funções estão envolvidas na resposta a estresses bióticos ou abióticos em plantas, na ecdise dos insetos, no desenvolvimentos de fungos, na nutrição, parasitismo e defesa de microrganismos e no sistema imunológico dos mamíferos (Oppenheim; Chet, 1992; Sahai; Manocha, 1993; Gooday, 1995; Patil et al., 2000; Merzendorfer; Zimoch, 2003; Arakane; Muthukrishnan, 2010).

As quitinases podem ser classificadas em dois principais grupos de acordo com o produto formado após a hidrólise da quitina. São eles: (i) grupo das endoquitinases (E.C. 3.2.1.14), enzimas que clivam aleatoriamente ligações glicosídicas internas da quitina, gerando quitoligossacarídeos (ii) grupo das exoquitinases ou quitobiosidases, ativas sobre quitina a partir da extremidade não redutora (EC 3.2.1.200) ou redutora (3.2.1.201) que resultam na formação de dissacarídeos de GlcNAc. Complementarmente, as 1-4- $\beta$ -glicosaminidases (EC 3.2.1.52) atuam sobre os produtos das endoquitinases e quitobiosidases para formação de GlcNAc (The UniProt Consortium, 2019).

As quitinases têm sido exploradas como uma alternativa promissora no controle de insetos e patógenos de plantas (Berini et al., 2018; Subbanna et al., 2018). Os insetos, além do exoesqueleto quitinoso, apresentam no intestino médio uma película fina, acelular e cilíndrica denominada membrana peritrófica (Hegedus et al., 2009). Essa membrana é formada por uma rede de fibrilas de quitina associadas a diferentes classes de proteínas, glicoproteínas e proteoglicanos que conferem força e elasticidade e influenciam em suas propriedades de permeabilidade. As funções da membrana peritrófica dos insetos estão relacionadas com a proteção do epitélio

intestinal contra a abrasão mecânica, o auxílio na digestão de alimentos em função da compartimentalização do intestino e redução da exposição do epitélio intestinal a agentes entomopatogênicos (Terra, 1991; Hegedus, 2009, Terra, 2001).

Quando ingeridas pelos insetos, as quitinases podem hidrolisar a quitina que compõe a membrana peritrófica do intestino dos insetos e essa desestruturação pode alterar a fisiologia digestiva dos mesmos com consequente morte dos insetos pragas (Berini et al., 2016). Em razão da sua origem proteica, as quitinases podem ser empregadas no Manejo Integrado de Pragas (MIP) pela expressão em plantas transgênicas (Ranjekar et al., 2003) ou pela transformação de entomopatógenos utilizados no controle microbiano para torná-los mais virulentos (Ding et al., 2008; Wang et al., 2013).

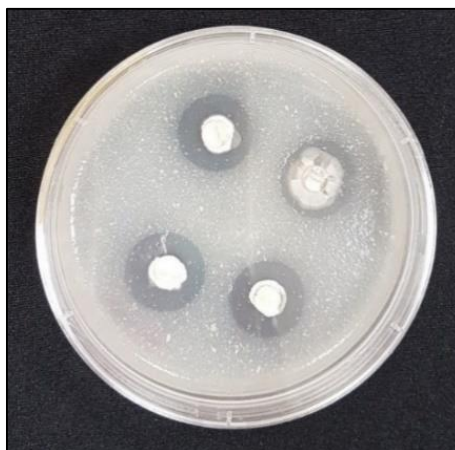


### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cultivo de *Streptomyces* sp. ENT-21 e visualização da atividade quitinolítica em meio sólido

O microrganismo *Streptomyces* sp. ENT-21 isolado do tegumento de *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae) (Zucchi et al., 2011) foi cultivado em meio Czapeck modificado (QCZ, 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, 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 da quitina cristalina (Sigma-Aldrich) foi incubada com cinco partes de ácido clorídrico (37% p/V) por 50 minutos (min) em temperatura ambiente e agitação constante. Após a 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 a vácuo para a retirada da água e coleta da quitina coloidal. A quitina coloidal foi lavada com tampão de fosfato de sódio 1 M pH=7,0 e filtrada a vácuo até estabilização do pH da solução em pH 7,0. Uma última lavagem com água foi realizada para a retirada do tampão fosfato.

As placas contendo meio QCz sólido foram inoculadas com *Streptomyces* sp. ENT-21 e incubadas a 28°C por dez dias. A hidrólise da quitina do meio de cultura foi visualizada pela formação de um halo transparente em torno das colônias (Figura 1). As colônias que formaram maiores halos foram utilizadas para produção do extrato quitinolítico em meio líquido.



**Figura 1.** Hidrólise da quitina visualizada pela formação do halo transparente em torno das colônias de *Streptomyces* sp. ENT-21 em meio QCZ contendo quitina coloidal.

### 3.2. Produção do extrato quitinolítico

O pré-inóculo foi preparado por meio da inoculação de 4 discos de 0,5 cm do cultivo de *Streptomyces* sp. ENT-21 em meio sólido em frasco Erlenmeyer contendo 100 mL de meio líquido QCz preparado com quitina cristalina e mantido sob agitação constante (180 rpm; 28°C) por 3 dias. Após esse período, alíquotas de 2 mL desse pré-inóculo foram adicionadas a 100 mL de meio QCz mantido sob agitação constante de 180 rpm a 28°C. Após 8 dias de cultivo (máximo da atividade quitinolítica do extrato - Rossi et al., 2015), os sobrenadantes obtidos após centrifugação (4.000xg, 15 min, 4°C) foram considerados os extratos quitinolíticos de *Streptomyces* sp. ENT-21 e o sedimento celular foi utilizado para confirmação da identidade do microrganismo em cultivo (item 3.3).

### 3.3. Confirmação da identidade do microrganismo

As células contidas no sedimento do cultivo de *Streptomyces* sp. ENT-21 em QCz foram utilizadas para extração do DNA genômico com o kit comercial GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) conforme as instruções do fabricante.

O DNA extraído foi utilizado para a amplificação do gene 16SrRNA com os primers 27F e 1492R como descrito por Monciardini et al. (2002). As reações de PCR

foram realizadas em volume final de 25  $\mu\text{L}$ , preparadas com: 17,65  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q, 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão (10x), 2,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (50 mM), 0,75  $\mu\text{L}$  de dNTP (10mM), 0,75  $\mu\text{L}$  de cada primer (10  $\mu\text{M}$ ), 0,3  $\mu\text{L}$  de Taq (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 0,8  $\mu\text{L}$  de DMSO e 1  $\mu\text{L}$  de DNA. As reações foram conduzidas em termociclador programado a 94°C por 1 min (1 ciclo); 94°C por 45 seg, 55°C por 45 seg e 72°C por 2 min (35 ciclos); 72°C por 10 min (1 ciclo) e manutenção das amostras a 10°C.

Os amplicons produzidos após reação de amplificação do gene 16SrRNA foram purificados com kit comercial Wizard<sup>®</sup> SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e enviados para sequenciamento com os primers 27F, 1492R, 515F e 907R no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), da Universidade Estadual Paulista, FCVA/UNESP, Jaboticabal.

Os resultados de sequenciamento foram acessados no programa FinchTV e as sequências foram alinhadas manualmente no programa MEGA. O consenso foi produzido no programa BioEdit e a comparação com o banco de dados do NCBI foi feita com a ferramenta Blastn.

### **3.4. Detecção da atividade de quitinase**

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 50  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático de *Streptomyces* sp. ENT-21, 25  $\mu\text{L}$  de quitina coloidal (15 mg/mL) e 25  $\mu\text{L}$  de tampão glicina-NaOH pH 9,0, pH ótimo da atividade quitinolítica do extrato (Rossi et al., 2015). Em intervalos de 30 min, 100  $\mu\text{L}$  do reagente DNS foram adicionados às amostras para interrupção da reação e quantificação dos grupos redutores formados (Noelting e Bernfeld, 1948). Após fervura em bloco seco (100°C; 5 min), as amostras foram arrefecidas até temperatura ambiente e 800  $\mu\text{L}$  de água foram adicionados às amostras. As amostras foram centrifugadas (10.000xg; 10 min) e o sobrenadante foi utilizado para quantificação dos grupos redutores. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro regulado no comprimento de onda de 550 nm.

Uma curva padrão de glicose (grupo redutor, 0,2 - 2  $\mu\text{mol}$ ) foi utilizada como referência para os cálculos de atividade. Uma unidade de quitinase (U) foi definida

como a quantidade de enzima responsável pela formação de 1 nmol de grupos redutores por minuto. Reações controle foram realizadas (branco de enzima e branco de substrato) para excluir aumentos de absorvância não associados à interação das quitinases com quitina coloidal nas mesmas condições de ensaio.

### **3.5. Detecção da atividade de $\beta$ -N-acetilglicosaminidase**

O substrato utilizado para detecção da atividade de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase no extrato foi o p-nitrofenil-N-acetil- $\beta$ -glicosamina (N1) (10 mM) preparado em tampão citrato-fostato de sódio 50 mM pH 4,6, pH ótimo da atividade de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase do extrato (Rossi et al., 2015). A reação para detecção da atividade de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase foi composta por 50  $\mu$ L do extrato enzimático de *Streptomyces* sp. ENT-21 e 50  $\mu$ L do substrato. Em intervalos de 15 min, 500  $\mu$ L de NaOH foram adicionados às amostras para interrupção da reação e quantificação do p-nitrofenol formado. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro regulado no comprimento de onda de 405 nm.

Uma curva padrão de p-nitrofenol (8 - 48  $\mu$ mol de p-nitrofenol) foi utilizada como referência para os cálculos de atividade. Uma unidade de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (U) foi definida como a quantidade de enzima responsável pela formação de 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por minuto. Foram realizadas reações controle (branco de enzima e branco de substrato) para excluir aumentos de absorvância não associados à interação de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase com o substrato em avaliação nas mesmas condições do ensaio.

### **3.6. Quantificação de proteínas totais**

A concentração de proteínas no extrato quitinolítico produzido foi estimada pelo método de Bradford (Bradford 1976), utilizando o reagente comercial Bradford Reagent (Sigma-Aldrich) e albumina de soro bovino (BSA) como padrão (2,5 - 25  $\mu$ g de BSA). A curva padrão de BSA foi construída pelo método de regressão linear no programa Excel e as proteínas foram quantificadas em  $\mu$ g/ $\mu$ L.

As amostras foram preparadas pela adição de 750  $\mu$ L do reagente de Bradford a 25  $\mu$ L de amostra. A amostra de referência (branco) foi preparada pela substituição do volume de amostra por 25  $\mu$ L de água. Após o preparo, as amostras foram mantidas por 10 min em temperatura ambiente e as amostras foram analisadas em espectrofotômetro regulado a 595 nm.

### **3.7. Fracionamento do extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 por filtração molecular em Sephadex**

O extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 produzido previamente foi liofilizado e o equivalente a 45 mL de extrato bruto foi ressuspenso em 1 mL de água deionizada. Em seguida, a amostra foi centrifugada (5 min, 10000xg) e o sobrenadante foi coletado e filtrado em microfiltro 0,2  $\mu$ m.

O método utilizado para separação das proteínas foi a cromatografia de exclusão por tamanho. Os extratos foram fracionados separadamente em dois tipos de resina Sephadex, a fim de selecionar a que obtinha o melhor perfil de fracionamento.

A primeira resina utilizada foi a Sephadex G75 em uma coluna de 2 cm de diâmetro por 30 cm de altura, contendo 27 cm de resina previamente equilibrada com água deionizada. A vazão foi mantida em 1 mL/min e frações de aproximadamente 1 mL foram coletadas. A segunda resina utilizada foi a Sephadex G25 em uma coluna de 2 cm de diâmetro por 38 cm de altura, contendo 35 cm de resina previamente equilibrada com água deionizada. A vazão foi mantida em 2 mL/min e frações de aproximadamente 2 mL foram coletadas. As frações coletadas em ambas as cromatografias foram analisadas quanto a sua densidade ótica em espectrofotômetro regulado a 280 nm e a coluna que resultou no melhor perfil de eluição foi selecionada para análises subsequentes.

### **3.8. Agrupamento de frações e detecção da atividade enzimática**

As frações coletadas durante a filtração molecular foram agrupadas em 6 amostras de acordo com o perfil de eluição a 280 nm e, após o agrupamento, as

amostras foram liofilizadas. Foram realizadas 24 repetições do processo de purificação e, após liofilização, cada amostra foi ressuspensa em 8 mL de água deionizada. As amostras foram avaliadas com relação a proteína total ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), atividade quitinolítica sobre quitina coloidal (U/mL) e atividade de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (U/mL).

### **3.9. Eletroforese em gel de poliacrilamida**

As proteínas da amostra 2 foram precipitadas com ácido tricloroacético 6,1 N (TCA) pela adição de 25  $\mu\text{L}$  de TCA a 100  $\mu\text{L}$  de amostra. A mistura foi homogeneizada e incubada a 4°C por 10 minutos. Após incubação, a amostra foi centrifugada (12000xg; 10 min), o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi lavado 2 vezes com 200  $\mu\text{L}$  de acetona (-20°C) e a amostra foi novamente centrifugada (12000xg; 5 min). O sobrenadante foi removido e a acetona residual no sedimento foi evaporada em bloco seco (95°C; 10 min). As proteínas do sedimento foram ressuspensas em 17  $\mu\text{L}$  de água deionizada.

Após precipitação, a amostra foi aplicada em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS 0,1% para observação do perfil proteico. Foi utilizado o método de Laemmli (1970) seguindo as orientações de Sambrook e Russel (2001).

### **3.10. Avaliação da atividade inseticida**

O bioensaio foi conduzido em dieta artificial (Parra, 2001). A dieta foi cortada em fatias de 3 mm de altura por 2,3 cm de diâmetro e colocadas em recipientes de plástico (6,5 cm de diâmetro x 3 cm de altura) com tampa na parte superior e papel filtro umedecido colocado no fundo (Figura 2).



**Figura 2.** Representação de um tratamento do bioensaio em recipientes de plástico contendo dieta artificial sobre papel filtro para avaliação do efeito do extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 sobre o desenvolvimento de lagartas de *Diatraea saccharalis*.

Alíquotas de 200  $\mu$ L das amostras 2, 3, 4 e 5 e do extrato bruto liofilizado foram aplicadas sobre a superfície da dieta. Como controle, foram aplicados 200  $\mu$ L de água deionizada autoclavada. A amostra 2 continha 294,9  $\mu$ g de proteínas, 8,7 U de quitinase e 16,6 U de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase. A amostra 3, 4 e 5 continham, respectivamente, 38,3; 8,4 e 7,5  $\mu$ g de proteínas respectivamente e não apresentaram atividade de quitinase ou de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase. O extrato bruto liofilizado continha 302,71  $\mu$ g de proteínas, 2,3 U de quitinase e 2,0 U de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase.

Após a absorção das amostras aplicadas sobre a dieta, 4 lagartas neonatas de *D. saccharalis* foram colocadas sobre cada fatia de dieta tratada. Os recipientes foram mantidos em condições controladas ( $25\pm 1^\circ\text{C}$ , umidade relativa de  $60\pm 10\%$  e fotofase diária de 14 horas) (Figura 3).



**Figura 3.** Representação de um tratamento contendo 4 lagartas de *Diatraea saccharalis* após 8 dias em dieta artificial.

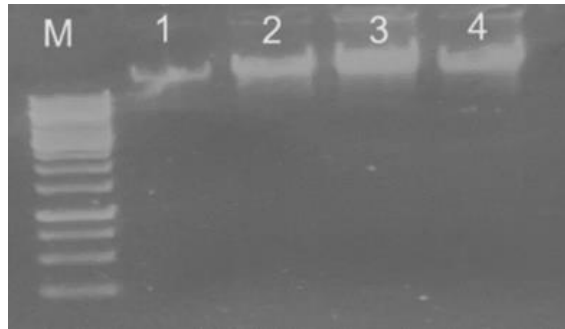
O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 5 repetições e 24 lagartas por repetição de cada tratamento. Após 13 dias, foram avaliados o peso das lagartas e a mortalidade larval. Foram consideradas mortas as lagartas que não responderam ao toque com um pincel de ponta fina. Além da mortalidade pela falta de resposta das lagartas após o toque, foi utilizado o conceito de mortalidade funcional (Chakroun et al., 2012), no qual foi definido que lagartas que apresentaram peso igual ou inferior a 20% do peso das lagartas do tratamento controle após expostas por 13 dias aos tratamentos foram consideradas mortas.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para constatação da normalidade. As médias foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) utilizando o programa GraphPad Prism v.5.



#### 4. RESULTADOS

O kit comercial GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich) foi eficiente para a extração do DNA de *Streptomyces* sp. ENT-21 (Figura 4 e Tabela 1).

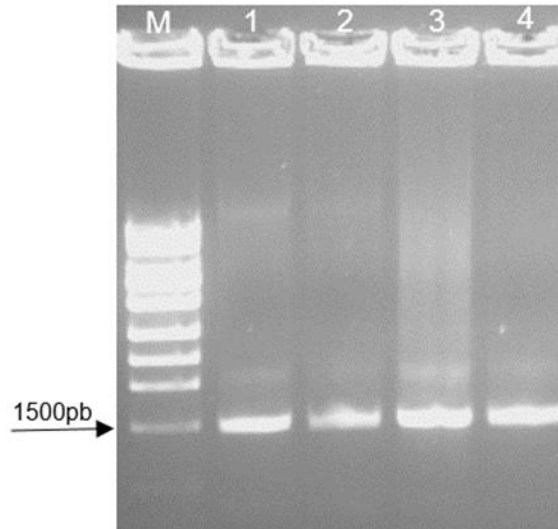


**Figura 4.** Eletroforese em gel de agarose (1%) e brometo de etídio (10 mg/mL), para avaliação da integridade do DNA após extração. As bandas da esquerda para a direita representam respectivamente o marcador molecular (1 kb, Norgen) e 4 amostras de células contidas no sedimento do cultivo de *Streptomyces* sp. ENT-21 em meio QCz contendo quitina coloidal.

**Tabela 1.** Quantificação no espectrofotômetro NanoDrop do DNA (ng/  $\mu$ L) de *Streptomyces* sp. ENT-21 extraído pelo kit GenElute Plant Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich).

Amostra	Concentração de DNA (ng/ $\mu$ L)
1	78
2	66
3	120
4	120

O conjunto de primers 27F e 1492R descritos por Monciardini et al. (2002) amplificaram fragmentos de 1500 pb do gene 16SrRNA de *Streptomyces* sp. ENT-21 (Figura 5).

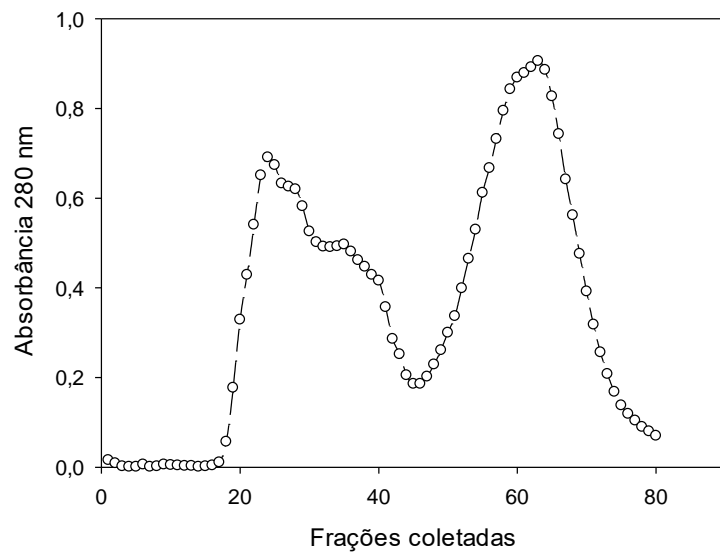


**Figura 5.** Eletroforese em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio (10 mg/mL), para avaliação da amplificação do gene 16SrRNA de *Streptomyces* sp. ENT-21. As bandas da esquerda para direita representam respectivamente: marcador molecular (1kb, Norgen), produto de PCR das amostras de DNA extraído 1, 2, 3 e 4.

A identidade do consenso produzido para o gene 16SrRNA da amostra em avaliação foi de 100% em relação à sequência de 16SrRNA de *Streptomyces* sp. ENT-21 (GenBank KF704237.1) depositada por Rossi et al. (2015), o que garante que o microrganismo em avaliação é o mesmo utilizado no estudo prévio.

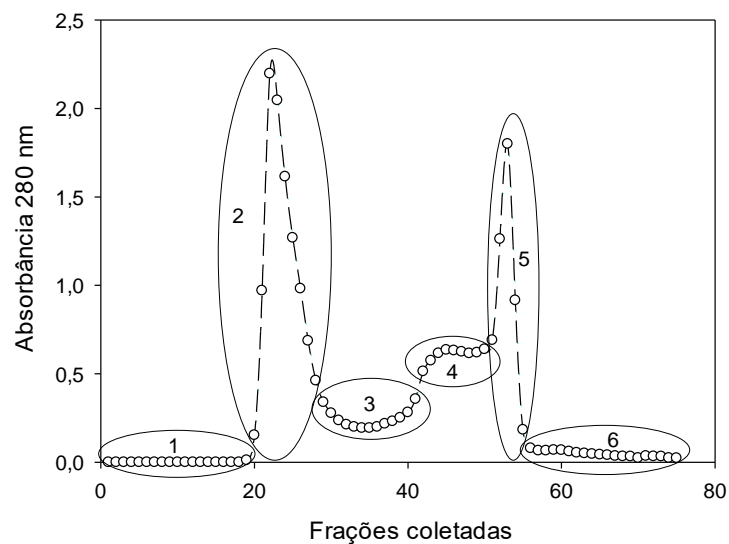
O extrato bruto de *Streptomyces* sp. ENT-21 apresentou atividade sobre quitina coloidal de 4,4 U/mL. Após liofilização (45 mL de extrato bruto liofilizados e ressuspensos em 1 mL de água), a atividade quitinolítica foi de 12 U/mL e 9,6 U/mL de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase.

A cromatografia de exclusão por tamanho em coluna cromatográfica contendo resina Sephadex G75 nas condições descritas não foi satisfatória (Figura 6), sendo a cromatografia em resina Sephadex G25 a que apresentou melhor perfil de eluição a 280 nm (Figura 7) e foi selecionada para análises subsequentes.



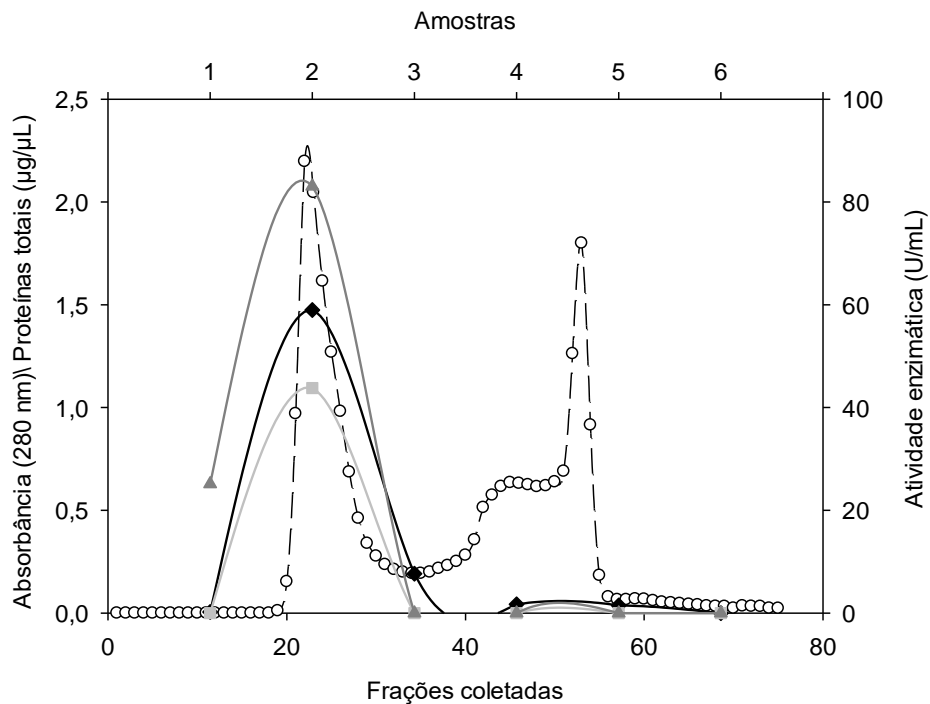
**Figura 6.** Perfil cromatográfico a 280 nm das frações coletadas após filtração molecular do extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 em Sephadex G75.

Pelo perfil de eluição a 280 nm na cromatografia com Sephadex G25 foi possível observar a formação de dois picos e, entre os picos, duas faixas intermediárias. A partir dessa observação, as frações foram divididas em 6 amostras que consistiam do agrupamento das frações (Figura 7).



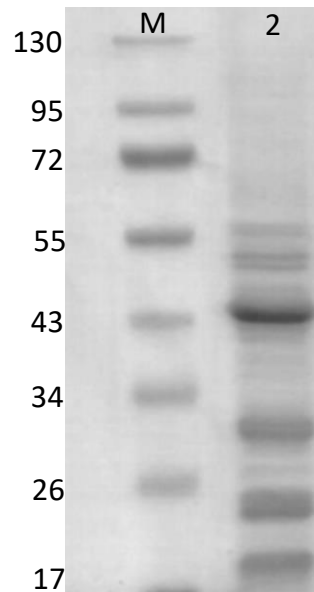
**Figura 7.** Perfil cromatográfico a 280 nm das frações coletadas após filtração molecular do extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 em Sephadex G25. Indicação das frações agrupadas em amostras em função dos picos (2 e 5) e fases intermediárias (3 e 4).

A amostra 1 apresentou baixa concentração de proteínas, não apresentou atividade sobre quitina coloidal, mas apresentou atividade de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (25,13 U/mL). A amostra 2 foi a que apresentou maior concentração de proteínas totais (1,47  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), atividade de quitinase (43,86 U/mL) e  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (83,06 U/mL). As amostras 3, 4, 5 e 6 apresentaram baixa concentração de proteínas e não apresentaram atividade de quitinase e de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (Figura 8).



**Figura 8.** Proteínas totais ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) (◆), atividade de quitinase (U/mL) (■) e atividade de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (U/mL) (▲) das amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 formadas pelo agrupamento das frações coletadas de acordo com o perfil de eluição a 280 nm (○).

A amostra 2 continha a maior concentração de proteínas totais e foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida. A presença de proteínas com peso molecular entre 17 e 55 kDa foi observada (Figura 9).



**Figura 9.** Perfil proteico da amostra 2 após filtração molecular em Sephadex G25 do extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 analisado em SDS-PAGE 10%. (M: Marcador de peso molecular Fermentas PageRuler Prestained Protein Ladder (kDa); 2: amostra 2 precipitada em TCA contendo aproximadamente 17 µg de proteínas totais).

Todos os tratamentos resultaram em alterações nas taxas de mortalidade e peso das lagartas de *D. saccharalis* ( $F_{4;20} = 60,23$ ;  $P < 0,0001$ ) em 13 dias após início da ingestão das amostras. A ingestão de dieta contendo extrato quitinolítico bruto de *Streptomyces* sp ENT-21 e a amostra 4 resultou em maiores taxas de mortalidade das lagartas de *D. saccharalis* ( $F_{5;24} = 82,07$ ;  $P < 0,0001$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Mortalidade (%) e peso (mg) das lagartas de *Diatraea saccharalis* em 13 dias após o início da alimentação com dieta artificial contendo extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 e as amostras obtidas após filtração molecular do extrato quitinolítico em Sephadex G25 (média ± erro padrão).

Tratamento	Quitinase (U/cm <sup>2</sup> )	β-N-acetilgli. (U/cm <sup>2</sup> )	Proteínas totais (µg/cm <sup>2</sup> )	Mortalidade (%)	Peso médio de lagartas (mg)
Controle	0	0	0	0,0 ± 0,0 c	26,3 ± 1,3 a
Ext. Bruto	0,57	0,48	72,90	100,0 ± 0,0 a	-
Amostra 2	2,11	4,00	71,06	7,5 ± 1,6 c	19,5 ± 0,9 b
Amostra 3	0	0	9,30	3,3 ± 1,6 c	17,2 ± 1,0 bc
Amostra 4	0	0	2,00	45,0 ± 9,9 b	7,6 ± 0,3 d
Amostra 5	0	0	1,80	11,7 ± 2,4 c	15,3 ± 0,6 c

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

## 5. DISCUSSÃO

O fracionamento do extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 em filtração molecular utilizando Sephadex G25 resultou em 6 amostras, sendo a amostra 2 a de maior conteúdo proteico e as demais não proteicas ou com concentrações muito reduzidas de proteínas. As frações proteicas (amostras 1 e 2) eluíram primeiro, o que é esperado nesse tipo de cromatografia. Moléculas com maior peso molecular, como as proteínas, eluem entre as esferas da resina, enquanto moléculas menores são retidas na coluna por penetrarem nos poros da resina e levarem um tempo maior até serem eluídas (Gelotte, 1960; Andrews, 1964).

A enzima  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase presente em extratos quitinolíticos de *Streptomyces* sp. ENT-21 teve seu peso molecular previamente estimado como superior a 100 kDa (Rossi et al., 2015). No presente trabalho, foi possível verificar uma pequena atividade de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase (25,13 U/mL) na amostra 1 em relação à amostra 2 (83,06 U/mL), o que sugere a tendência dessa enzima eluir primeiro na cromatografia de filtração molecular e reforça a estimativa prévia que trata-se de uma enzima de alto peso molecular (>100 kDa). Apesar de não ter sido observado no gel de eletroforese bandas com peso molecular >100 kDa, acredita-se em duas possibilidades que requerem maiores investigações: (i) a concentração da enzima  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase não é suficiente para ser visualizada em gel; (ii) a enzima  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase possui estrutura quaternária, ou seja, é composta por polipeptídeos com peso molecular menor que 100 kDa que são separados pelas condições desnaturantes da eletroforese.

Quando avaliado o potencial inseticida da amostra 2 obtida a partir do extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21, amostra com maior quantidade de proteínas e ativa sobre os substratos testados, verificou-se que a mesma não resultou na mortalidade de lagartas de *D. saccharalis*. A quantidade de proteínas associadas com o hidrólise de quitina ingeridas foi suficiente apenas para reduzir o peso das lagartas, provavelmente por alterarem a composição e funcionamento adequado da membrana peritrofica, uma estrutura do intestino médio de lepidópteros composta por quitina (Kelkenberg et al., 2015; Berini et al., 2016). Na concentração testada (71,06  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), as proteínas presentes no extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 não foram

suficientes para causar mortalidade da fase larval do lepidóptero praga *D. saccharalis*. As proteínas presentes na amostra 2 do extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 não apresentam potencial biotecnológico aparente como inseticidas para *D. saccharalis*, visto que toxinas Vip3 e Cry1, por exemplo, resultam na mortalidade de 95% dos indivíduos de *D. saccharalis* em concentrações bem inferiores (27,1 e 1,78  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respectivamente) (Lemes et al., 2014). Porém, o potencial biotecnológico das enzimas de *Streptomyces* sp. ENT-21 em questão não é descartado pois as mesmas podem atuar de maneira sinérgica com outras toxinas (Arora et al., 2003; Pardo-López et al., 2009; Tang et al., 2012; Augusto, 2018). Além disso, em função da amostra 2 tratar-se de uma mistura de várias proteínas, as proteínas com atividade inseticidas podem estar em baixas concentrações prejudicando a avaliação da mortalidade de *D. saccharalis*. O isolamento e a concentração dessas proteínas podem revelar potenciais moléculas inseticidas presentes na amostra 2 do extrato quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21.

Os resultados obtidos a partir da aplicação do extrato quitinolítico bruto sobre a dieta para o consumo por *D. saccharalis* sugerem que exista algum tipo de sinergismo entre as moléculas proteicas ativas para hidrólise de quitina (amostra 2) com as demais moléculas (amostra 3, 4 e 5). O extrato quitinolítico bruto possui atividades de quitinase e de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase inferiores às observadas nas amostras produzidas a partir de seu fracionamento em função das amostras serem concentradas após fracionamento por liofilização. Mesmo assim, a aplicação do extrato quitinolítico bruto resultou em mortalidade de 100% das lagartas, valor não alcançado nem pela soma da mortalidade entre as amostras 2-5. O sinergismo de quitinases com outras moléculas para o controle de lepidópteros pragas é relatado em outros estudos (Mohan et al., 2001; Huang et al., 2016).

A amostra 4 (não proteica, sem atividade quitinolítica ou de  $\beta$ -N-acetilglicosaminidase e peso molecular reduzido em função do perfil de eluição em Sephadex G25) foi a mais ativa para resultar em mortalidade (45%) e redução do peso das lagartas sobreviventes de *D. saccharalis* (peso 71% menor em relação ao peso das lagartas do controle). Vários compostos antibióticos produzidos por *Streptomyces* spp. como porfirinas (Martinez et al., 2017), policetídeo (Arasu et al., 2013), alosamidina (Sakuda et al., 1986) e a avermectina (Fisher e Mrozik, 1989; Burg e

Stapley, 1989) são conhecidos por suas atividades inseticida, acaricida, nematocida e anti-helmíntico (Kolar et al., 2008).

Desse modo, verificamos que os metabólitos não proteicos produzidos pelo cultivo de *Streptomyces* sp. ENT-21 causaram a maior mortalidade e redução do peso das lagartas de *D. saccharalis*. O isolamento, definição de estrutura química e testes biológicos desses metabólitos sobre organismos de interesse são etapas futuras necessárias para o conhecimento dos princípios ativos responsáveis pelos resultados obtidos no presente trabalho.

## 6. CONCLUSÕES

O extrato bruto quitinolítico de *Streptomyces* sp. ENT-21 possui atividade inseticida sobre lagartas de *D. saccharalis*.

O efeito inseticida do extrato bruto quitinolítico não está isoladamente associado às proteínas do extrato.

Os metabólitos não proteicos produzidos pelo cultivo de *Streptomyces* sp. ENT-21 causam mortalidade e redução de peso das lagartas de *D. saccharalis*.



## 7. REFERÊNCIAS

Albers-Schoenberg G, Arison BH, Chabala JC, Douglas AW, Eskola P, Fisher MH, Tolman RL (1981). Avermectins. structure determination. **Journal of the American Chemical Society** 103:4216-4221.

Andrews P (1964) Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration. **Biochemical Journal** 91:222.

Arakane Y, Muthukrishnan S (2010) Insect chitinase and chitinase-like proteins. **Cellular and Molecular Life Sciences** 67:201-216.

Arasu MV, Al-Dhabi NA, Saritha V, Duraipandiyan V, Muthukumar C, Kim, SJ (2013) Antifeedant, larvicidal and growth inhibitory bioactivities of novel polyketide metabolite isolated from *Streptomyces* sp. AP-123 against *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **BMC Microbiology** 13:105.

Arora N, Ahmad T, Rajagopal R, Bhatnagar RK (2003) A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 307:620-625.

Augusto MLV (2018) **Influência do domínio ligante em quitina de uma quitinase de *Bacillus thuringiensis* sobre sua atividade enzimática e ação inseticida sobre *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae)**. 47 f. Tese (Doutorado em Agronomia- Genética e Melhoramento de Plantas)- Unesp, Jaboticabal.

Baltz RH (2008) Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. **Current Opinion in Pharmacology** 8:557-563.

Beemelmans C, Guo H, Rischer M, Poulsen M (2016). Natural products from microbes associated with insects. **Beilstein Journal of Organic Chemistry** 12:314-327.

Bentley SD, Chater KF, Cerdeño-Tárraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Bateman A (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Nature**, 417:141.

Berini F, Caccia S, Franzetti E, Congiu T, Marinelli F, Casartelli M, Tettamanti G (2016) Effects of *Trichoderma viride* chitinases on the peritrophic matrix of Lepidoptera. **Pest Management Science** 72:980-989.

Berini F, Katz C, Gruzdev N, Casartelli M, Tettamanti G, Marinelli F. (2018). Microbial and viral chitinases: attractive biopesticides for integrated pest management. **Biotechnology Advances** 36:818-838.

Bolzan A, Padovez FE, Nascimento AR, Kaiser IS, Lira EC, Amaral FS, Omoto C (2019) Selection and characterization of the inheritance of resistance of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) to chlorantraniliprole and cross-resistance to other diamide insecticides. **Pest Management Science** 75:2682-2689.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254.

Broadway RM, Gongora C, Kain WC Sanderson JP, Monroy JA, Bennett KC, Hoffmann MP (1998) Novel chitinolytic enzymes with biological activity against herbivorous insects. **Journal of Chemical Ecology** 24:985-998.

Burg RW, Stapley EO (1989) Isolation and characterisation of the producing organism in ivermectin and abamectin. In: Campbell WC (ed) **Ivermectin and abamectin**. Springer, New York, pp 24-32.

Busoli AC, Crosariol Netto J, Viana DL, Aguirre-Gil OJ, Rainho HL (2014) Manejo Integrado de Pragas: Pesquisas, avanços e desafios. In: Busoli AC, Souza LA, Alencar JRCC, Fraga DF, Grigoll JFJ (Eds.) **Tópicos em Entomologia Agrícola VII**. Jaboticabal: Maria de Lourdes Brandel - ME, p.309-330.

Carter KF, Biro S, Lee KJ, Palmer T, Schrempf H (2010) The complex extracellular biology of *Streptomyces*. **FEMS Microbiology Reviews** 34:171-19.

Chakroun M, Bel Y, Caccia S, Abdelkefi-Mesrati L, Escriche B, Ferré J (2012) Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* and *S. exigua* to *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa insecticidal protein. **Journal of Invertebrate Pathology** 110:334-339.

Chapman RF (1998) **The insects**: Structure and function. 4<sup>th</sup> ed. Cambridge University Press, Cambridge, p.38-68.

Chater KF (2011) Differentiation in *Streptomyces*: the properties and programming of diverse cell-types. In: Dyson P (Eds.) **Streptomyces: Molecular Biology and Biotechnology**. Caister Academic Press, p. 43-86.

Cheavegatti-Gianotto A, De Abreu HMC et al. (2011) Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology** 4:62-89.

Chevrette MG, Carlson CM, et al. (2019) The antimicrobial potential of *Streptomyces* from insect microbiomes. **Nature Communications** 10:516.

Cho HJ, Choi KP, Yamashita M, Morikawa H, Murooka Y (1995) 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** 44:133-138.

CIB - Conselho de Informações sobre a Biotecnologia (2017) **Produtos aprovados**. Disponível em: <<http://cib.org.br/produtos-aprovados/ctb141175-01-a/>>. Acessado 04 Jun 2019.

Corrado G, Arciello S, Fanti P, Fiandra L, Garonna A, Digilio MC, Lorito M, Giordana B, Pennacchio F, Rao R (2008) The chitinase A from the baculovirus AcMNPV enhances resistance to both fungi and herbivorous pests in tobacco. **Transgenic Research** 17:557-571.

Cruz I (2007) A broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* em Milho no Brasil. Embrapa. **Circular Técnica** 90 Sete Lagoas, MG.

CTNBio. Conselho Técnico Nacional de Biossegurança (2019) **Liberação comercial**. Disponível em: <<http://ctnbio.mcti.gov.br/a-ctnbio>>. Acesso em: 12 ago. 2019.

Currie CR, Scott JA, Summerbell RC, Malloch (1999) Fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature** 398:701.

Currie CR (2001) A community of ants fungi and bacteria: a multilateral approach to studying symbiosis. **Annual Reviews in Microbiology** 55:357-380.

Currie CR, Scott JA, Summerbell RC, Malloch D (2003) Corrigendum: fungus-growing ants use antibiotic-producing bacteria to control garden parasites. **Nature** 423:461.

Dahiya N, Tewari R, Hoondal GS (2006) Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology** 71:773-782.

Dinardo-Miranda LL (2008) Pragas. Cana-de-açúcar. Campinas (SP): **Instituto Agrônomo** 1:349-404.

Dinardo-Miranda LL, Fracasso JV, Anjos IA, Garcia J, Costa V (2012) Influência da infestação de *Diatraea saccharalis* (Fabr.) sobre parâmetros tecnológicos da cana-de-açúcar. **Bragantia** 71:342-345.

Dinardo-Miranda LL, Dos Anjos IA, Costa VP, Fracasso JV (2012) Resistance of sugarcane cultivars to *Diatraea saccharalis*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília 47:1-7.

Ding X, Luo Z, Xia L, Gao B, Sun Y, Zhang Y (2008) Improving the insecticidal activity by expression of a recombinant cry1Ac gene with chitinase-encoding gene in acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis*. **Current Microbiology** 56:442- 447.

Eurich K, Segawa M, Toei-Shimizu S, Mizoguchi E (2009) Potential role of chitinase 3-like-1 in inflammation associated carcinogenic changes of epithelial cells. **World Journal of Gastroenterology** 15:5249-5259.

Farias JR, Andow DA, Horikoshi RJ, Bernardi D, Ribeiro RDS, Nascimento ARD, Santos ACD, Omoto C (2016) Frequency of Cry1F resistance alleles in *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Brazil. **Pest Management Science** 72:2295-2302.

Fisher MH, Mrozik H (1992) The chemistry and pharmacology of the ivermectins. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology** 32: 537-553.

Fisher MH, Mrozik H (1989) Chemistry in ivermectin and abamectin. In: Campbell WC, editor. **Ivermectin and abamectin**. New York (NY): Springer; p. 1-23.

Gelotte Bertil (1960) Studies on gel filtration: sorption properties of the bed material Sephadex. **Journal of Chromatography A** 3:330-342.

Galm U, Sparks TC (2016) Natural product derived insecticides: discovery and development of spinetoram. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** 43:185-193.

Greenplate JT, Corbin DR, Purcell JP (1997) Cholesterol oxidase: potent boll weevil larvicidal and oostatic agent suitable for transgenic cotton development. In **Proceedings of the Beltwide Cotton Conferences**. New Orleans: National Cotton Council of America, p.877-880.

Gongora CE, Wang S, Barbehenn RV, Broadway RM (2001) Chitinolytic enzymes from *Streptomyces albidoflavus* expressed in tomato plants: effects on *Trichoplusia ni*. **Entomologia Experimentalis et Applicata** 99:193-204.

Gopalakrishnan S, Rajendran V, Arumugam S, Sharma HC, Vadlamudi S, Bhimineni RK, Gonzalez SV, Melo TM, Simic N (2016) Insecticidal activity of a novel fatty acid amide derivative from *Streptomyces* species against *Helicoverpa armigera*. **Natural Product Research** 30:27602769.

Hamid R, Khan MA, Ahmad M, Ahmad MM, Abdin MZ, Musarrat J, Javed S (2013) Chitinases: An update. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences** 5:21-29.

Hegedus D, Erlandson M, Gillott C, Toprak U (2009) New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. **Annual Review of Entomology** 54:285-302.

Huang TT, Ali S, Long XZ, Yu YH. (2016). Joint application of *Isaria fumosorosea* chitinase and azadirachtin as biopesticides against the diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae). **Egyptian Journal of Biological Pest Control** 26.

Ikeda H, Ishikawa J, Hanamoto A, Shinose M, Kikuchi H, Shiba T, Ōmura S (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. **Nature biotechnology**, 21:526.

Jansson RK, Brown R, Cartwright B, Cox D, Dunbar DM, Dybas RA, Peterson RF (1997) Emamectin benzoate: a novel avermectin derivative for control of lepidopterous pests. In: **Proceedings of the 3rd International Workshop on Management of Diamondback Moth and Other Crucifer Pests**. MARDI: Kuala Lumpur, Malaysia, p.1-7.

Juárez-Hernández E, Casados-Vázquez LE, Bideshi DK, Salcedo-Hernández R, Barboza-Corona JE (2017) Role of the C-terminal and chitin insertion domains on enzymatic activity of endochitinase ChiA74 of *Bacillus thuringiensis*. **International Journal of Biological Macromolecules** 102:52-59.

Kelkenberg M, Odman-Naresh J, Muthukrishnan S, Merzendorfer H (2015) Chitin is a necessary component to maintain the barrier function of the peritrophic matrix in the insect midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** 56:21-28.

Kolar L, Eržen NK, Hogerwerf L, van Gestel CA (2008) Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environmental Pollution** 151:182-189.

Kost C, Lakatos T, Böttcher I, Arendholz WR, Redenbach M, Wirth R (2007) Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants. **Naturwissenschaften** 94:821-828.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature** 227:680-685.

Lemes ARN, Davolos CC, Legori PCBC, Fernandes OA, Ferre J, Lemos MVF, Desiderio JA (2014) Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. **PLoS One** 9:e107196.

Martinelli S, Clark PL, Zucchi MI, Silva-Filho MC, Foster JE, Omoto C (2007) Genetic structure and molecular variability of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) collected in maize and cotton fields in Brazil. **Bulletin of Entomological Research** 97:225-23.

Martinez AFC, de Almeida LG, Moraes LAB, Cônsoli FL (2019) Microbial diversity and chemical multiplicity of culturable taxonomically similar bacterial symbionts of the leaf-cutting ant *Acromyrmex coronatus*. **Microbial Ecology** 77:1067-1081.

Martinez AFC, de Almeida LG, Moraes LAB, Cônsoli FL (2017) Tapping the biotechnological potential of insect microbial symbionts: new insecticidal porphyrins. **BMC Microbiology** 17:143.

Mendes SM, Waquil JM, Rodrigues JAS, Sampaio MV, Viana PA (2014) Manejo de pragas na cultura do sorgo. **Informe Agropecu rio**, Belo Horizonte 35:89-99.

Merzendorfe RH, Zimoch L (2003) Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. **Journal of Experimental Biology** 206:4393-4412.

Monciardini P, Sosio M Cavaletti L, Chiocchini C, Donadio S (2002) New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes. **FEMS Microbiology Ecology** 42:419-429.

Mohan M, Selvakumar G, Sushil SN, Bhatt JC, Gupta HS (2011) Entomopathogenicity of endophytic *Serratia marcescens* strain SRM against larvae of *Helicoverpa armigera* (Noctuidae: Lepidoptera). **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 27:2545-2551.

Nett M, Ikeda H, Moore BS (2009) Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. **Natural Product Reports** 26:1362-1384.

Noelting G, Bernfeld P (1948) Sur les enzymes amylolytiques III La  $\beta$ -amylase: dosage d'activité et controle de l'absence d' $\alpha$ -amylase. **Helvetica Chimica Acta** 31:286-290.

Oliveira CM, Auad AM, Mendes SM, Frizzas MR (2014) Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture. **Crop Protection** 56:50-54.

Omoto C, Bernardi O, Salmeron E, Sorgatto RJ, Dourado PM, Crivellari A, Head GP (2016). Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science** 72:1727-1736.

Oppenheim AB, Chet I (1992) Cloned chitinases in fungal plant-pathogen control strategies. **Trends in Biotechnology** 10:392-394.

Pardo-López L, Muñoz-Garay H, Porta H, Rodríguez-Almazán C, Soberón M, Bravo A (2009) Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. **Peptides** 30:589-595.

Parra JRP (2014) Biological control in Brazil: an overview. **Scientia Agricola** 71:420-429.

Parra JRP (2001) **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba (SP): Fealq p.134.

Patil RS, Ghormade V, Deshpande MV (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. **Enzyme and Microbial Technology** 26:473-483.

Patil NS, Jadhav JP (2015) Significance of *Penicillium ochrochloron* chitinase as a biocontrol agent against pest *Helicoverpa armigera*. **Chemosphere** 128:231-235.

Pollegioni L, Piubelli L, Molla G (2009) Cholesterol oxidase: biotechnological applications. **The FEBS Journal** 276:6857-6870.

Purcell JP, Greenplate JT et al. (1993) Cholesterol oxidase: a potent insecticidal protein active against boll weevil larvae. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 196:1406-1413.

Purcell JP, Greenplate JT, Sammons RD (1992) Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. **Insecticide Biochemistry and Molecular Biology** 22:41-47.

Quinlan RJ, Cherrett JM (1979) The role of fungus in the diet of the leaf-cutting ant *Atta cephalotes* (L). **Ecological Entomology** 4:151-160

Ramírez MG, Avelizapa LIR, Avelizapa NGR, Camarillo RC (2004) Colloidal chitin stained with Remazol Brilliant Blue RR a useful substrate to select chitinolytic microorganisms and to evaluate chitinases. **Journal of Microbiological Methods** 56:213-219.

Ranjekar PK, Patankar A, Gupta V, Bhatnagar R, Bentur J, Ananda Kumar P (2003) Genetic engineering of crop plants for insect resistance. **Current Science** 84:321-329.

Rossato Jr JA, Madaleno LL, Mutton MJ, Higley LG, Fernandes OA (2019) Photosynthesis, yield and raw material quality of sugarcane injured by multiple pests **PeerJ** 7:e6166.

Rossi GD, Zucchi TD, Guidolin AS, Peruchi A, Cônsoli FL (2015) Chitin-degrading enzymes from an actinomycete ectosymbiont of *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera: Formicidae). **Annals of Microbiology** 65:565-574.

Sahal AS, Manocha MS (1993) Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. **FEMS Microbiology Reviews** 11:317-338.

Sakuda S, Isogai A, Matsumoto S, Suzuki A, Koseki K (1986) The structure of allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor, produced by *Streptomyces* sp. **Tetrahedron Letters** 27:2475-2478.

Sambrook J, Russel DW (2001) **Molecular Cloning**: a laboratory manual 3<sup>rd</sup> ed. New York (NY): Cold Spring Harbor; p. 250.

Sampson MN, Gooday GW (1998) Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insect. **Microbiology** 144:2189-2194.

Silva-Brandão KL, Santos TV, Cônsoll FL, Omoto C (2015) Genetic diversity and structure of Brazilian populations of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae): Implications for pest management. **Journal of Economic Entomology** 108:307-316.

Smaoui S, Mathieu F, Elleuch L, Coppel Y, Merlina G, Karrayrebal I, Melloull L (2012) Taxonomy, purification and chemical characterization of four bioactive compounds from new *Streptomyces* sp. TN256 strain. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 28:793-804, 2012.

Storer NP, Kubiszak ME, King JE, Thompson GD, Santos AC (2012) Status of resistance to Bt maize in *Spodoptera frugiperda*: lessons from Puerto Rico. **Journal of Invertebrate Pathology** 110:294-300.



Shoop WL, Mrozik H, Fisher MH (1995) Structure and activity of avermectins and milbemycins in animal health. **Veterinary parasitology** 59:139-156.

Sparks TC (2013) Insecticide discovery: an evaluation and analysis. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 107:8-17.

Sparks TC, Nauen R (2015) IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. **Pesticide Biochemistry and Physiology** 121:122-128.

Sparks TC, Hahn DR, Garizi NV (2017) Natural products their derivatives mimics and synthetic equivalents: role in agrochemical discovery. **Pest Management Science** 73:700-715.

Subbanna ARNS, Rajasekhara H, Stanley J, Mishra KK, Pattanayak A (2018) Pesticidal prospectives of chitinolytic bacteria in agricultural pest management. **Soil Biology and Biochemistry** 116:52-66.

Tabashnik BE, Carrière Y (2017) Surge in insect resistance to transgenic crops and prospects for sustainability. **Nature Biotechnology** 35:926.

Takiguchi Y, Mishima H, Okuda M, Terao M, Aoki A, Fukuda R (1980) Milbemycins, a new family of macrolide antibiotics: fermentation, isolation and physico-chemical properties. **The Journal of Antibiotics** 33:1120-1127.

Tang Y, Tong J, Zhang Y, Wang L, Hu S, Li W, Lu W (2012) Preliminary comparing the toxicities of the hybrid cry1Acs fused with different heterogenous genes provided guidance for the fusion expression of Cry proteins. **World Journal of Microbiology and Biotechnology** 28:397-400.

Terra WR (1991) Digestão do alimento e suas implicações na biologia dos insetos. In: Panizzi AR, Parra JRP. **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole. p.67-99.

Terra WR (2001) The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** 47:47-61.

Tharanathan RN, Farooqahmed SK (2013) Chitin - the undisputed biomolecule of great potential. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 43:61-87.

The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge (2019) **Enzyme nomenclature database**. Disponível em: <<https://enzyme.expasy.org/>>. Acessado em 16 Set 2019.

Ujváry I (1999) Nicotine and other insecticidal alkaloids. In: Yamamoto Z; Casida JE, editors. **Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor**. Tokyo: Springer; p. 29-69.

Usharani TR, Gowda TKS (2011) Cloning of chitinase gene from *Bacillus thuringiensis*. **Indian Journal of Biotechnology** 10:264-269.

Wang Y, Choi JY, Roh JY, Tao XY, Liu Q, Lee JH, Kim JS, Kim WJ, Je YH (2013) Insecticidal activity of the chitinase from the *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. **Entomological Research** 43:63-69.

Xiang WS, Wang JD, Fan HM, Wang XJ, Zhang J (2008) New seco-milbemycins from *Streptomyces bingchenggensis*: fermentation, isolation and structure elucidation. **The Journal of Antibiotics** 61:27.

Zucchi TD, Guidolin AS, Cônsoli FL (2011) Isolation and characterization of actinobacteria ectosymbionts from *Acromyrmex subterraneus brunneus* (Hymenoptera, Formicidae). **Microbiology Research** 166:68-78.