

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

KARINA FAN

AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO INSETO *DIAPHORINA CITRI*
ATRAVÉS DA ALIMENTAÇÃO EM DIETA ARTIFICIAL CONTENDO CISTATINAS
DE CITROS

SÃO CARLOS – SP

2023

KARINA FAN

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DO INSETO *DIAPHORINA CITRI*
ATRAVÉS DA ALIMENTAÇÃO EM DIETA ARTIFICIAL CONTENDO CISTATINAS
DE CITROS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal de São
Carlos para obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Andrea Soares da
Costa Fuentes

SÃO CARLOS – SP

2023

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pelo apoio e suporte, independente da situação, sem os quais eu não estaria aqui. À minha avó, que sempre esteve presente e pelo amor incondicional. Obrigada por confiarem nas minhas decisões e por me motivarem a ser quem eu sou.

Aos meus irmãos, Katia e Renato, e à minha prima, Rosana, que me apoiaram em todos os momentos, sejam fáceis ou difíceis, e me ajudaram a trilhar meu rumo. Agradeço todas as conversas, brincadeiras, reflexões, descontrações e até mesmo as brigas.

À Profa. Dra. Andrea Soares da Costa Fuentes, por me receber em seu laboratório, confiar e acreditar no meu potencial, assim como todo o suporte e orientação recebida, que foram primordiais para o meu desenvolvimento. Obrigada por toda a paciência, pelos ensinamentos e por ser um exemplo de diversas formas.

Às meninas do LBV, Sam, Dani e Isa, que me ensinaram inúmeras coisas, tanto dentro quanto fora do laboratório. Agradeço toda a companhia, a união, as conversas e conselhos, as saídas e todos os momentos de descontração. Vocês com certeza foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional, tornando o trajeto mais fácil e divertido.

Aos meus amigos de graduação, que foram fundamentais para minha trajetória, por todo o suporte e pela companhia ao longo dos anos: Rachel, Daniel e Stephany, por estarem comigo desde o início e me acompanharem sempre; Vini, Nath, Marisa e Lari, por serem meu apoio imprescindível nessa etapa final; e Matheus, por todas as conversas e reflexões, proporcionando diferentes visões da vida. Muito obrigada por todas as trocas, conselhos, risadas, rolês e surtos. Tudo isso foi necessário para me manter firme.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva por conceder os equipamentos necessários para o andamento dos experimentos e por todo o suporte fornecido pelo Laboratório de Biologia Molecular – LBM.

Às agências de fomento, CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo financiamento da pesquisa.

Ao Fundecitrus – Fundo de Defesa da Citricultura pela parceria para realização dos experimentos, sem os quais não seria possível o desenvolvimento da pesquisa.

A todos que de alguma forma contribuíram para minha trajetória e meu desenvolvimento, seja no lado pessoal quanto profissional.

RESUMO

O Brasil é um país essencialmente agrícola, sendo destaque na citricultura mundial, principalmente na produção e exportação de citros *in natura* e suco concentrado. Apesar da relevância econômica, as plantações são gravemente afetadas por pragas e patógenos, muitos dos quais possuem poucas medidas de controle efetivas. O Huanglongbing (HLB), conhecido como *greening* em alguns países, é considerado a doença mais grave e destrutiva do gênero citros, afetando o crescimento, amadurecimento e morfologia dos frutos. Os agentes causais do HLB são bactérias restritas ao floema da espécie *Candidatus Liberibacter spp.*, que são transmitidas pelo psilídeo asiático dos citros, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). Como consequência do HLB, os frutos apresentam baixo teor de suco e alta acidez, tornando inviável sua comercialização e resultando em sérias perdas econômicas. Atualmente, o controle do HLB se dá pelo monitoramento das mudas e uso de produtos químicos, porém é um método trabalhoso e nem sempre eficaz, podendo gerar resistência dos insetos. Dessa forma, novas tecnologias são necessárias, sendo o desenvolvimento de plantas superexpressando inibidores de cisteíno-peptidases (cistatinas) uma alternativa interessante. Os hemípteros utilizam diversas proteases em seu processo digestivo, principalmente do tipo cisteíno-peptidase e, portanto, a interação entre cistatinas e cisteíno-peptidases pode afetar o crescimento e desenvolvimento dos insetos-praga. Assim, este trabalho teve como objetivo a expressão heteróloga de cistatinas recombinantes de *Citrus clementina* (CclemCPI-1 e CclemCPI-3) e *Citrus sinensis* (CsinCPI-2) em *Escherichia coli* e purificação por cromatografia de afinidade. Essas proteínas purificadas foram utilizadas para avaliação da atividade inibitória em dieta artificial para *D. citri*, nas concentrações de 1 e 2 mg/mL, visando observar algum efeito no desenvolvimento do psilídeo. Nos ensaios realizados em dieta artificial contendo as proteínas purificadas foi observada mortalidade considerável para a proteína CclemCPI-1, com 26,97% na dosagem de 1 mg/mL e 48% na dosagem de 2 mg/mL. Nos ensaios com as proteínas CclemCPI-3 e CsinCPI-2 foi observada uma mortalidade de 6 e 8%, respectivamente, na maior concentração. Esses dados sugerem uma possível interferência no desenvolvimento do inseto. Entretanto, será necessário a realização de novos testes para padronização dos resultados, assim como investigar a interação cistatina-peptidase e avaliar por dose-dependência.

Palavras-chave: Citros; Huanglongbing; HLB; cistatina; *Diaphorina citri*; dieta artificial.

ABSTRACT

Brazil is an essentially agricultural country, being highlighted in citriculture worldwide, especially in the production and export of citrus in natura and concentrated juice. Despite its economic relevance, the crops are severely affected by pests and pathogens, many of which have few effective control measures. Huanglongbing (HLB), known as greening in some countries, is considered the most serious and destructive disease of citrus, affecting growth, ripening, and fruit morphology. The causal agents of HLB are phloem-limited bacteria of the species *Candidatus Liberibacter* spp. that are transmitted by the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). As a consequence of HLB, the fruits are characterized by low juice content and high acidity, which make their commercialization unfeasible and lead to serious economic losses. Currently, HLB control is done by monitoring seedlings and using chemicals, but it is a laborious method and not always effective, and may generate insect resistance. Thus, new technologies are needed, and the development of plants overexpressing inhibitors of cysteine-peptidases (cystatins) is an interesting alternative. Hemiptera use several proteases in their digestive process, mainly of the cysteine-peptidase type and, therefore, the interaction between cystatins and cysteine-peptidases can affect the growth and development of pest insects. Thus, this study aimed the heterologous expression of recombinant cystatins from *Citrus clementina* (CclemCPI-1 and CclemCPI-3) and *Citrus sinensis* (CsinCPI-2) in *Escherichia coli* and purification by affinity chromatography. These purified proteins were used to evaluate the inhibitory activity in artificial diet for *D. citri*, at concentrations of 1 and 2 mg/mL, in order to observe any effect on the psyllid development. In the tests performed in artificial diet containing the purified proteins, a considerable mortality rate was observed for CclemCPI-1 protein, with 26.97% at 1 mg/mL and 48% at 2 mg/mL. In the assays with CclemCPI-3 and CsinCPI-2 proteins, mortality of 6 and 8%, respectively, was observed at the highest concentration. These data suggest a possible interference in insect development. However, further tests will be necessary to standardize the results, as well as to investigate the cystatin-peptidase interaction and evaluate for dose-dependence.

Keywords: Citrus; Huanglongbing; HLB; cystatin; *Diaphorina citri*; artificial diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Psílídeo <i>Diaphorina citri</i>	17
Figura 2 – Sintomas do HLB em laranja doce.	18
Figura 3 – Ciclo de vida do inseto vetor	20
Figura 4 – Representação do mecanismo de ação de cisteíno peptidases.....	21
Figura 5 – Preparo da solução utilizada na dieta.....	27
Figura 6 – Preparo do sistema de ensaio	27
Figura 7 – Mapa do vetor pET28a	29
Figura 8 – Análise da purificação de CclemCPI-1 em SDS-PAGE 15%.....	30
Figura 9 – Análise da purificação de CclemCPI-3 em SDS-PAGE 15%.....	31
Figura 10 – Análise da purificação de CsinCPI-2 em SDS-PAGE 15%.....	32
Figura 11 – Comparativo do rendimento das cistatinas.....	33
Figura 12 – Secreções dos insetos alimentados por dieta artificial contendo cistatinas	34
Figura 13 – Insetos coletados ao término experimento	34

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Mortalidade de <i>D. citri</i> ao longo do experimento	38
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência que codifica as cistatinas utilizadas	24
Tabela 2 - Dados do ensaio da dieta artificial contendo cistatinas recombinantes ...	35
Tabela 3 - Mortalidade dos insetos durante o experimento	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
CaneCPI-1	<i>Cane Cystein Protease Inhibitor 1</i>
CaneCPI-2	<i>Cane Cystein Protease Inhibitor 2</i>
CaneCPI-3	<i>Cane Cystein Protease Inhibitor 3</i>
CaneCPI-4	<i>Cane Cystein Protease Inhibitor 4</i>
CaneCPI-5	<i>Cane Cystein Protease Inhibitor 5</i>
CaneCPI-6	<i>Cane Cystein Protease Inhibitor 6</i>
CclemCPI-1	<i>Citrus clementina Cystein Protease Inhibitor 1</i>
CclemCPI-3	<i>Citrus clementina Cystein Protease Inhibitor 3</i>
CsinCPI-2	<i>Citrus sinensis Cystein Protease Inhibitor 2</i>
D.O	Densidade óptica
h	hora(s)
HLB	Huanglongbing
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Quilodalton
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio monobásico
<i>lacI</i>	Gene que codifica a proteína <i>lacI</i> , repressora do operon <i>lac</i>
LB ágar	Meio LB contendo ágar
LB	Luria Bertani
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro

mM	Milimolar
Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NaH ₂ PO ₄	Fosfato de sódio monobásico
Ni	Níquel
nm	Nanômetro
NTA	Ácido nitrilotriacético
PBS	Tampão fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 A citricultura e a importância mundial	15
2.2 Huanglongbing	16
2.3 Diaphorina citri	19
2.4 Peptidases	20
2.4.1 Cisteíno-peptidases	21
2.5 Cistatinas	22
3 OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Expressão heteróloga das proteínas recombinantes em <i>Escherichia coli</i>	23
4.2 Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade	25
4.3 Análise em SDS-PAGE.....	26
4.4 Diálise e quantificação de proteínas	26
4.5 Liofilização de proteínas	26
4.6 Ensaio de atividade em dieta artificial	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Expressão e purificação das proteínas	28
5.2 Ensaio de atividade das cistatinas	33
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	40
REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A agricultura corresponde a um setor significativo da economia nacional, com desenvolvimento de tecnologias que aumentaram a produtividade em função da área total plantada (NEVES *et al.*, 2010). Entre os produtos exportados, as laranjas possuem destaque, sendo o Brasil líder de produção no âmbito mundial, seguido pela China, União Europeia e Estados Unidos (USDA, 2021), tendo como principais destinos União Europeia, Estados Unidos, Japão e China (CITRUSBR, 2020). No entanto, muitas pragas são responsáveis por causar danos significativos às plantações, gerando perdas econômicas. Como exemplo, a região da Flórida recebia destaque pela citricultura, mas a descoberta do Huanglongbing em 2005 reduziu a produção em 74% (SINGERMAN & ROGERS, 2020). Em 2020, o levantamento anual feito pelo Fundecitrus indicou que 20,87% das laranjeiras do cinturão São Paulo/Triângulo Mineiro possuíam sintomas da doença, correspondendo a 41 milhões de árvores (FUNDECITRUS, 2020).

Apesar da importância da doença no cenário econômico, ainda não há medidas de controle para os danos e a velocidade de disseminação. Atualmente faz-se o monitoramento de mudas visando a erradicação de plantas infectadas, assim como do inseto vetor (BOVÉ, 2006; BELASQUE JUNIOR *et al.*, 2010). O psílideo *Diaphorina citri* possui um ciclo de vida curto, com duração de cerca de 12-43 dias, sendo composto pelos estágios ovo, ninfa com cinco ínstar e adulto, sendo sensível a temperatura e desenvolvendo-se entre 25-32°C (HALBERT & MANJUNATH, 2004; LOPES *et al.*, 2015).

Tendo em vista que os insetos requerem diversas proteases para completar seu desenvolvimento, principalmente àquelas usadas em processos digestivos, as plantas, em resposta, coevoluíram com os inibidores de protease, que atuam na defesa diante dos danos mecânicos. Visto a importância dessas proteínas nas plantas, as cistatinas da cana-de-açúcar foram caracterizadas por nosso grupo de estudo: CaneCPI-1 (SOARES-COSTA *et al.*, 2002), CaneCPI-2, CaneCPI-3 (GIANOTTI *et al.*, 2006), CaneCPI-4 (GIANOTTI *et al.*, 2008), CaneCPI-5 (MIGUEL, 2014; SANTIAGO *et al.*, 2017) e CaneCPI-6 (MIGUEL, 2014), apresentando potencial inibitório contra catapsinas e legumainas (RIBEIRO *et al.*, 2008; VALADARES *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011; SANTOS-SILVA *et al.*, 2012; FONSECA *et al.*, 2012; SOARES-COSTA *et al.*, 2012; SOARES-COSTA *et al.*, 2014; FERRARA *et al.*, 2015).

Ferrara e colaboradores (2015) caracterizou uma cisteíno-peptidase do tipo catepsina B com função digestiva de *D. citri*, que foi eficientemente inibida pela cistatina de cana-de-açúcar CaneCPI-4. Além disso, o grupo já caracterizou diversas cistatinas de *Citrus sinensis* e *Citrus clementina*, denominadas CsinCPI e CclemCPI, respectivamente, e numeradas de 1 a 6 (SCHNEIDER *et al.*, 2020).

Portanto, o estudo das cistatinas de citros com ação contra o vetor do HLB se faz importante, sendo uma estratégia alternativa e específica para o controle da doença, visto que pode atuar diretamente no desenvolvimento do vetor. Diante da comprovada inibição da catepsina do tipo B de *D. citri in vitro* (FERRARA *et al.*, 2015), ensaios *in vivo* utilizando cistatinas de citros podem apresentar maior eficácia, pois são plantas que manifestam a doença. Dentre os métodos para confirmar a inibição, as dietas artificiais apresentam resultados promissores quanto à resposta do organismo aos inibidores, possibilitando avaliar a sobrevivência e a influência no desenvolvimento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A citricultura e a importância mundial

Os citros fazem parte da família Rutaceae, que possui cerca de 160 gêneros e mais de 1600 espécies. São cultivos de interesse global, tendo sua origem precisa desconhecida devido à geração de híbridos por cruzamentos ou seleção artificial (TALON *et al.*, 2020). O gênero *Citrus* engloba diversas plantas, incluindo laranjas, tangerinas, limas e limões, tendo provável origem na Ásia, em regiões de clima tropical e subtropical, sendo trazido ao Brasil pelos portugueses (MATTOS JUNIOR *et al.*, 2005).

A citricultura apresenta relevância mundial, tendo destaque para a produção de laranja, na qual o Brasil é líder (USDA, 2023), representando 22,1% da produção em 2020 (EMBRAPA, 2020), sendo exportador de frutos e suco, além de subprodutos como óleos essenciais, D-limoneno, terpenos e farelo de polpa cítrica (NEVES *et al.*, 2010). A principal região produtora corresponde ao cinturão citrícola, representado pelo estado de São Paulo e o Triângulo/Sudoeste Mineiro, numa área de 461.921 hectares, sendo 86% referente a laranjas (FUNDECITRUS, 2022b)

A estimativa da safra de 2021/2022 foi encerrada com 262,97 milhões de caixas de 40,8 kg (FUNDECITRUS, 2022b), sendo 16.722.488 toneladas de laranja no mês de dezembro de 2022 (IBGE, 2022), com previsão de 316,23 milhões de caixas para a próxima safra de 2022/23, de acordo com a reestimativa realizada em fevereiro de 2023 pelo Fundecitrus (FUNDECITRUS, 2023). Desta produção, há a exportação majoritária na forma de suco concentrado e congelado ou não concentrado, tendo como principais destinos a Europa, os Estados Unidos e a China (CITRUSBR, 2020; FUNDECITRUS, 2022c).

A oscilação na produção se deve a eventos climáticos, principalmente relacionados ao índice pluviométrico, em que as poucas chuvas, somado ao clima quente e seco, levam à redução da quantidade de frutos (FUNDECITRUS, 2022c), ou à queda prematura devido aos temporais (FUNDECITRUS, 2023). Além disso, outro fator constante e agravante são as doenças e pragas causadas por bactérias, fungos, vírus e nematoides (SANTOS FILHO; MAGALHÃES; COELHO, 2005), sendo o Huanglongbing (HLB), ou *greening*, a mais preocupante atualmente. Desde a sua detecção na Flórida, em 2005, antigo maior produtor de laranja dos Estados Unidos,

os pomares têm sofrido constantemente, chegando a alcançar queda de 74% da produtividade (USDA, 2022; SINGERMAN & ROGERS, 2020). A redução drástica foi crescente ao longo dos anos, com produção 203,2 milhões de caixas em 1995/1996 e declínio para 45 milhões de caixas em 2017/2018 (FDOC, 2018).

No Brasil, a doença foi detectada em 2004, no estado de São Paulo (COLETTA-FILHO, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2005a), com aumento significativo da incidência, chegando a dobrar a cada ano entre 2008 e 2012. Apesar disso, o país conseguiu manter a produtividade de cerca de 330 milhões de caixas nas últimas décadas e até aumentar a produtividade na safra de 2019/2020 (BASSANEZI *et al.*, 2020). No entanto, o HLB ainda é um problema, com avanço da incidência de 22,37% para 24,42% em 2022, representando cerca de 48,67 milhões de árvores (FUNDECITRUS, 2022a), reforçando a necessidade de se conter a disseminação.

2.2 Huanglongbing

Descrito inicialmente na China, em 1919, o Huanglongbing já apresentava relatos em 1700, na Índia, baseado na sintomatologia característica de brotos amarelados, muitas vezes confundido com deficiência de minerais. Posteriormente, a doença propagou-se para outros países e continentes, visto a capacidade de transmissão via enxertia e inoculação de material propagativo contaminado (GOTTWALD, 2010), sendo descrito com diferentes nomenclaturas na África do Sul, Filipinas, Indonésia e Tailândia (BOVÉ, 2006).

Os agentes associados à doença são bactérias Gram-negativas do gênero *Candidatus* (C.) *Liberibacter* (L.), restritas ao floema e não cultiváveis até o momento (HALBERT & MANJUNATH, 2004), sendo três espécies conhecidas: C.L. *asiaticus*, C.L. *africanus* e C.L. *americanus* – CLas, CLaf e CLam, respectivamente (TEIXEIRA *et al.*, 2005b; BOVÉ, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2008). No Brasil, as espécies CLas e CLam estão presentes, sendo a primeira mais severa (GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007) e com maior incidência (CANALE; KOMADA; LOPES, 2019) devido à rápida multiplicação e contágio entre citros (GABRIEL *et al.*, 2020).

A transmissão desses microrganismos ocorre por meio de dois insetos-vetores: *Diaphorina citri* Kuwayama, 1908 (Hemiptera: Liviidae) (Figura 1) na Ásia e

América e *Trioza erytreae* Del Guercio, 1918 (Hemiptera: Triozidae) na África. Apesar das diferentes espécies, os sintomas provocados são os mesmos e o diagnóstico é de difícil determinação, visto a inespecificidade e semelhança com outras patologias (DA GRAÇA & KORNSTEN, 2004; BOVÉ, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2008).



Figura 1 – Psílídeo *Diaphorina citri*
Inseto responsável pela transmissão da bactéria causadora do HLB.
Fonte: Manual de Psílídeo *Diaphorina citri* – Fundecitrus, 2018.

Os sintomas (Figura 2) variam com a idade e o estágio de infecção, sendo possível aparecer em toda a extensão ou estar restrito a um setor, apresentando seções saudáveis e infectadas em uma mesma planta (OBERHOLZER; VON STANDEN; BASSON, 1965; DA GRAÇA & KORNSTEN, 2004). De modo geral, observa-se folhas amareladas, com manchas irregulares e sem simetria nas duas metades (GOTTWALD; DA GRAÇA; BASSANEZI, 2007). Os frutos são pequenos, esverdeados (nomeando a doença, anteriormente, de *greening*) e deformados, decorrentes do amadurecimento inadequado. Além disso, caem precocemente e ocorre a inversão de cores na maturação. Internamente, apresentam a parte branca da casca mais espessa, sabor mais ácido e amargo e sementes não desenvolvidas (OBERHOLZER; VON STANDEN; BASSON, 1965; DA GRAÇA & KORNSTEN, 2004; BOVÉ, 2006).

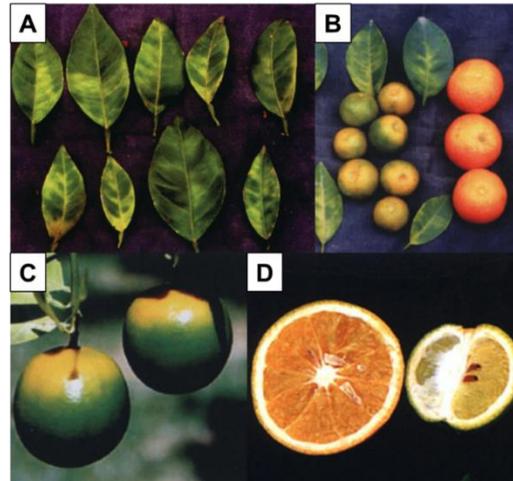


Figura 2 – Sintomas do HLB em laranja doce.

A. Folhas amareladas e manchadas; B. Comparação de frutos infectados (esquerda) e saudáveis (direita); C. Inversão de cores observado nos frutos infectados; D. Comparação da parte interna da laranja, em que o fruto infectado (direita) apresenta assimetria e sementes abortadas.

Fonte: Adaptado de Bové, 2006.

Atualmente, ainda não existem métodos curativos para o HLB, sendo o seu tratamento baseado na identificação precisa de mudas infectadas e controle da doença e do inseto-vetor, evitando o avanço e a disseminação. Uma vez detectada, as plantas doentes devem ser eliminadas completamente, além de fiscalizar as árvores ao redor, visto o período de latência das bactérias, em que não há manifestação dos sintomas. Dessa forma, faz-se necessário o plantio de mudas saudáveis (BOVÉ, 2006; BELASQUE JUNIOR *et al.*, 2010).

O monitoramento dos psilídeos deve ser feito visualmente, inspecionando as mudas do pomar, principalmente aquelas localizadas nas bordas, assim como o uso de armadilhas adesivas em pontos estratégicos, com avaliações periódicas e trocas regulares (FUNDECITRUS, 2018). Um dos métodos de controle consiste no uso de inseticidas sistêmicos e de contato direcionados ao vetor, tendo como objetivo controlar a população e sua dispersão (BOVÉ, 2006). A escolha dos produtos químicos utilizados deve ser baseada na incidência do inseto nos pomares, sobretudo no final do outono e do verão, caracterizados por surtos vegetativos, além de seguir um ciclo de rotação e pulverização adequado, evitando a resistência e aumentando a eficácia (FUNDECISTRUS, 2018)

Outro método corresponde ao controle biológico, utilizando parasitas naturais (BOVÉ, 2006). No Brasil, existe a vespa *Tamarixia radiata*, que deposita seus ovos embaixo das ninfas de *D. citri*, que são utilizadas como alimento no processo de

desenvolvimento das larvas, matando-as no processo (HALL *et al.*, 2009). Devido à sua especificidade, não há efeitos em outras espécies de insetos ou plantas, sendo utilizadas principalmente em locais abandonados ou sem controle químico (FUNDECITRUS, 2018).

Dentre os métodos, o uso intensivo de inseticidas tem se mostrado ineficaz em novas plantações, principalmente quanto à introdução do inseto-vetor (HALL *et al.*, 2009; GOTTWALD, 2007; BERGAMIN FILHO *et al.*, 2009), além de seu efeito variar conforme as condições climáticas, podendo ser lavado pelas chuvas, (ICHINOSE *et al.*, 2010), assim como possibilitar o desenvolvimento de resistência pelo uso inadequado (TIWARI *et al.*, 2011; HALL *et al.*, 2012). De modo geral, também não há compatibilidade entre os químicos e a *T. radiata*, impossibilitando seu uso em conjunto (HALL *et al.*, 2009).

2.3 *Diaphorina citri*

O inseto *D. citri*, também conhecido como psíldeo-asiático-dos-citros, está presente no estado de São Paulo desde 1942 na forma não infectante (PARRA *et al.*, 2010), sendo uma praga inicialmente secundária (GALLO *et al.*, 2002; SINGERMAN & ROGERS, 2020). É um inseto cosmopolita, originário da Ásia, de coloração cinza e asas com manchas escuras, que mede cerca de 2-3 mm de comprimento (PARRA *et al.*, 2010; MIRANDA, 2018).

O vetor possui como hospedeiros membros da família Rutaceae, como a planta ornamental *Murraya paniculata* e os citros. Durante o desenvolvimento, prefere brotos em crescimento, processo conhecido como *flush*, sendo essencial para o aumento populacional (BOVÉ, 2006; PARRA *et al.*, 2010), e tendo como característica marcante a disposição dos adultos em ângulo de 45° em relação à superfície da planta durante a alimentação (LOPES *et al.*, 2015).

O ciclo de vida é composto pelos estágios ovo, ninfa com cinco ínstares e adulto (Figura 3), sendo os ovos de coloração amarelada e depositados próximos a gemas recém-brotadas. As ninfas se alimentam de seiva e secretam cera nas folhas, permitindo o posterior crescimento de fungos, e os adultos são capazes de se alimentar de folhas jovens e desenvolvidas (PARRA *et al.*, 2010; HALL *et al.*, 2012).

Nesse ciclo, a bactéria é adquirida por ninfas (4° e 5° instar) e adultos através da seiva do floema de plantas infectadas, permitindo a transmissão para mudas sadias através do mesmo meio (BELASQUE JUNIOR *et al.*, 2010). Além disso, a aquisição apresenta maior eficiência na fase ninfal (INOUE *et al.*, 2009).

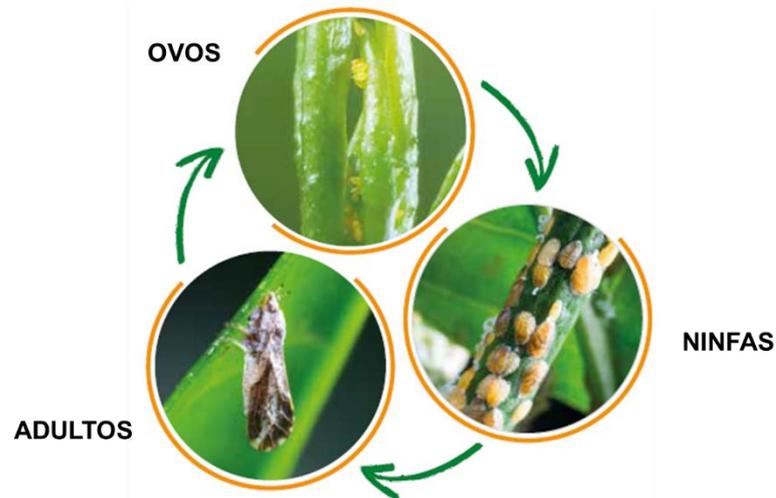


Figura 3 – Ciclo de vida do inseto vetor

Fonte: Adaptado de Manual de psílideo *Diaphorina citri* – Fundecitrus, 2018.

2.4 Peptidases

As peptidases, também conhecidas como proteases ou proteinases (RAWLINGS *et al.*, 2007), são enzimas proteolíticas que catalisam a degradação de proteínas. Atuam em diversos processos biológicos e fisiológicos (PAGE & CERA, 2008), como digestão, inflamação, ativação de pro-enzimas (OLIVEIRA; XAVIER-FILHO; SALES, 2003), processamento de informações celulares, regulação, modulação e amplificação da sinalização, entre outros (LÓPEZ-OTÍN & BOND, 2008). Sua ação decorre da hidrólise de ligações peptídicas para fornecimento de aminoácidos para a dieta (WOLFSON & MURDOCK, 1990) e estão presentes em todos os organismos, desde bactérias a eucariotos superiores, compondo cerca de 2% do total de proteínas (VERMELHO *et al.*, 2008).

Essas enzimas são divididas em classes de acordo com seu mecanismo catalítico, no resíduo de aminoácido presente no sítio catalítico e na ancestralidade (PAGE & CERA, 2008), sendo sete tipos: aspartil peptidases, cisteíno peptidases, glutamil peptidases, asparagino peptidases, metalo peptidases, serino peptidases,

treonino peptidases (RAWLINGS; BARRETT; FINN, 2015), além de dois novos grupos para sítios desconhecidos e mistos (RAWLINGS, 2020).

2.4.1 Cisteíno-peptidases

As cisteíno-peptidases possuem um resíduo de cisteína em seu sítio ativo, estando presentes em plantas, animais, bactérias, vírus, parasitas e insetos. Entre as mais conhecidas, destacam-se a papaína, as catepsinas, as calpaínas, a ficina e a bromelina. Essa classe atua em diversos processos fisiológicos dos organismos, como crescimento, desenvolvimento, mobilização de proteínas de reserva, sinalização celular, resposta a estresse biótico e abiótico, senescência e apoptose (WILKESMAN, 2017), além de atuar no processo digestivo de nematoides, artrópodes e insetos (OLIVEIRA; XAVIER-FILHO; SALES, 2003), principalmente das ordens Coleoptera, Diptera, Hemiptera e Thysanoptera (JONGSMA & BEEKWILDER, 2011).

A papaína é a enzima modelo da família C1, sendo necessário o grupo tiol da cisteína para exercer sua atividade, além dos resíduos Cys-25 e His-159 no sítio catalítico, sendo conservados em todos os membros. O mecanismo geral de ação (Figura 4) dessa família consiste em uma série de etapas, iniciando pela ligação não covalente da enzima livre com o substrato, resultando no intermediário tetraédrico. Em seguida, ocorre a acilação da peptidase com formação e liberação do primeiro produto enzimático, o grupo amino $R'NH_2$. Na etapa seguinte, a acil-enzima reage com uma molécula de água, levando à deacilação e formação de um segundo produto ($RCOOH$). Quando liberado, a enzima é regenerada (STORER & MÉNARD, 1994).

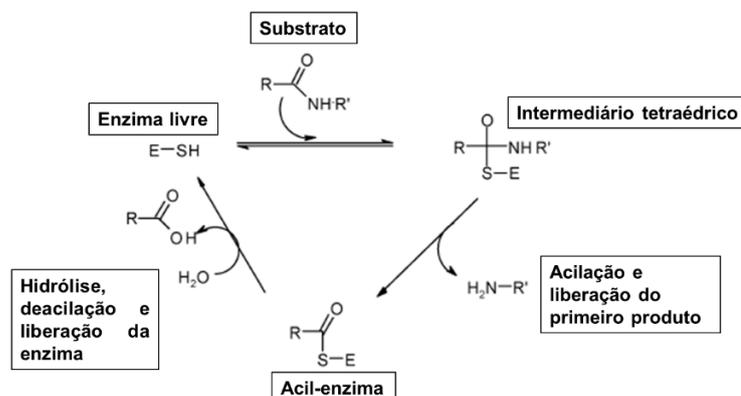


Figura 4 – Representação do mecanismo de ação de cisteíno peptidases
Fonte: Adaptado de Fricker, 2010.

Visto que os insetos dependem diretamente de enzimas para o fornecimento de nutrientes, o conhecimento do tipo de protease presente no intestino é essencial para entender a interação com inibidores de protease, sendo o alvo de diversos estudos acerca do crescimento e desenvolvimento dos mesmos (WOLFSON & MURDOCK, 1990).

2.5 Cistatinas

As cistatinas são inibidores de cisteíno-peptidases e atuam de forma reversível, competindo com o substrato pelo sítio catalítico da enzima (BARRETT, 1987), sendo denominados fitocistatinas se forem de origem vegetal (VIDAL, 2003). A superfamília das cistatinas possui três motivos conservados, presentes em todos os membros: o motivo central, contendo glutamina, valina e glicina (Q-x-V-x-G, sendo x qualquer aminoácido); um dipeptídeo prolina-triptofano (PW) ou leucina-triptofano (LW) na porção C-terminal; e uma glicina (G) na região N-terminal. Essas estruturas participam no processo de inibição das enzimas alvo por meio da formação de *loops* que se ligam ao sítio ativo e conferem estabilidade a essa estrutura (TURK & BODE, 1991; BENCHABANE *et al.*, 2010).

As cistatinas coevoluíram com as cisteíno-peptidases e protegem as células de proteólises ao regular processos fisiológicos, como reprodução, deposição e mobilização de proteínas de reserva (TURK; BODE, 1991; BENCHABANE *et al.*, 2010). Também estão ativas em momentos de estresse abiótico, assim como na defesa contra herbívoros e insetos. Os artrópodes utilizam de cisteíno-peptidases no processo de herbivoria, caracterizando essa classe de proteínas como potenciais alvos para estratégias que visem o controle de pragas e patógenos. A inibição das cisteíno-peptidases, ocasionada pela interação peptidase-cistatina, representa uma alternativa importante, podendo resultar no controle populacional sem maiores danos ambientais, além de substituir inseticidas (CASARETTO & CORCUERA, 1995; BENCHABANE *et al.*, 2010).

Para investigar se existe uma possível interação entre as cisteíno-peptidases do inseto *Diaphorina citri* e as cistatinas, existem três abordagens a serem utilizadas: realização de ensaios *in vitro* a partir da extração das enzimas do intestino do inseto e incubação das enzimas com as cistatinas para verificar ação inibitória;

adição de cistatinas em dietas artificiais para *Diaphorina citri* e observação acerca da interferência no inseto; e desenvolvimento de plantas transgênicas super expressando as cistatinas, visando avaliar o crescimento e desenvolvimento do inseto (BROADWAY, 1996).

Considerando testar a viabilidade de aplicação de cistatinas no controle do inseto *Diaphorina citri*, foi proposto nesse trabalho a utilização do método descrito por Russell e Pelz-Stelinski (2015), que desenvolveram uma dieta artificial para *D. citri*, permitindo o uso desse procedimento para a realização de estudos laboratoriais com a finalidade de analisar a sobrevivência do inseto em dietas contendo diferentes compostos. Nesta dieta, observa-se alta tolerância do psílideo à pressão osmótica, representada pela presença da sacarose, sendo uma simulação da composição da seiva, visando entender o mecanismo de sobrevivência no ambiente restrito.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade de cistatinas recombinantes de citros – CclemCPI-1, CclemCPI-3 e CsinCPI-2 – no desenvolvimento do inseto *Diaphorina citri* através de dieta artificial.

3.2 Objetivos Específicos

- Expressão heteróloga das proteínas recombinantes em sistema bacteriano – *Escherichia coli*;
- Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade;
- Avaliação da atividade das proteínas em dieta artificial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Expressão heteróloga das proteínas recombinantes em *Escherichia coli*

A partir das sequências das cistatinas (Tabela 1) subclonadas em vetor de expressão (pET28a_CclemCPI-1, pET28a_CclemCPI-3 e pET28a_CsinCPI-2),

transformou-se células quimiocompetentes de *E. coli* Rosetta™ (DE3) (Novagen) pelo método de choque térmico (SAMBROOK *et al.*, 1989). As colônias transformadas foram selecionadas em meio LB ágar contendo os antibióticos canamicina (25 µg/mL) e cloranfenicol (25 µg/mL). Em seguida, fez-se um pré-inóculo de 7,5 mL em meio LB líquido contendo os mesmos antibióticos a partir de uma colônia isolada, incubado a 37°C e agitação de 250 rpm por 16 h. Posteriormente, essa cultura foi diluída em 500 mL de meio LB líquido fresco, respeitando a proporção de 1:100, e submetida às mesmas condições anteriores até se atingir a D.O de 0,4 a 0,6 no comprimento de onda de 600 nm. Após isso, adicionou-se IPTG na concentração final de 0,4 mM para indução da expressão das proteínas, que ocorreu durante 4 h. Por fim, as células foram precipitadas por centrifugação e coletadas.

Tabela 1 - Sequência que codifica as cistatinas utilizadas

Sequência codante das cistatinas	
CclemCPI-1	ATGGCGAAATTAGCAAGAGCTTTGATATTGAGCCTCCTCTTGTT GTCCATCACAGCATCTGTAAATGGGTATGATCGTTTAGTGGGA GGGAGATCAGAGGTGAAGGACGTGAAGAAGAATAAGGAAGTG CAAGAGCTGGGAAAATTCTCTGTAGAGGAATTCAATCGCAGCC AGCAGAGGCAAGGCAAGGTAATCCGCAACGTGCGCCTTTGGAC GGCTGAGATTTTCGCAGGTCCTTGAGGCGCAGAAACAGGTGGT TTCTGGGATTAATATTATTTAACAATTGAGGCCACCACTGGTG AAAATGGGGAAATACAGATGTTTGATTCAATTGTAGTGATCAAA CCATGGCTTCACTCTAAGGAATTGCTTAAATTTGCCCTTCCGA GTGA
CclemCPI-3	ATGGCCAAATTCACCAATCCCTTGATTTTCAATTAATACTCTCTCT CTGCTTCTGTTTCTGATCATATCTGCGACGGCAAATTCTGAATT TTGCGACGATAAAATGGCCTTGCTTGGCGGAGTACAGGAATCC CGAGGTGCCGAAAACAGCAATGAAATTGAAAGCCTCGCTCGAT TCGCCATCGAAGAACACAACAAAAAAGAGAATGCTTTGCTGGA GTTTGTGAAAGTGGTGAAGGCGCAAGAGCAGGTGGTTGCTGG TACCATGCACCATCTAACAGTGGAGGCTATTGATGCTGGTACG AAGAAGCTATATGAAGCGAAAGTGTGGGTCAAGCCATGGTTGA ATTTTAAGGATTTGCAGGAATTTAAGCACGTTGGTGATTCCCCG GCCTCTTTCACCTCTTCAGATCTTGGTGTTAAGAAAGATGGTCA

	<p>TTGCCCTGGATGGCAGGCAGTTCCCGTACATGATCCTCAAGTC CAGGATGCAGCCAATCATGCTATCCAAACCATTTCAGCAAAGGT CCA ACTCCCTCTTCCCTTATGTACTTCAGGAGATTGTTTCATGCA AAAGCTGAGGTGATTGAGGATTTTGC GAAATTTGCCATGCTTCT GAAAGTGAAGAGGGGAGAAAAAGAGGAGAAGCTCAATGTTGAA GTACACAAGAAGGAGGGCACATTCCATCTCAATCAAATGCAAC AAGATCAAGAGTGA</p>
CsinCPI-2	<p>CATATGGCTACTGTTGGTGGTGTACGTGAAGTTGAAGCTACTG CTAACAATCAAGAAATCGTTAACCTGGCACGTTTCGCAGTGGAT GAACACAACAAGAAACAGA ACTCCAACCTGCAATTTGTTAAAGT TGTAAGCGCTAAACAGCAGGTGGTGTCCGGTACTCTGTACGAC ATCACTCTGGAGGCCGTGGAAGGTGGTCAGAAGAAGCTGTTC GAAGCGAAAGTTTGGGAGAAGCCGTGGATGCAGTTCAAAGAAC TGAAAGAGTTCAACACCGTTGCACAGTCTCACTCCAGCACCGC TTAAGAATTC</p>

4.2 Purificação das proteínas por cromatografia de afinidade

A purificação iniciou-se com a ressuspensão das células coletadas anteriormente em tampão (NaH_2PO_4 50 mM, Tris-base 10mM, NaCl 100 mM, pH 8,0) para lise por ultrassonicação, utilizando o sonicador Fisher Scientific – Sonic Dismembrator Model 500 com amplitude de 20%, em ciclo de 6 pulsos de 1 minuto e intervalos de 30 segundos. Em seguida, o lisado foi centrifugado a 7000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi filtrado em bomba a vácuo, usando membrana com poros de 0,45 μm .

O sobrenadante contendo as proteínas foi utilizado para purificação por cromatografia de afinidade em colunas Econo-Pac® Chromatography (BioRad) contendo 3 mL de resina de níquel Ni-NTA Superflow (QIAGEN) e as proteínas foram eluídas a partir de concentrações crescentes de imidazol – 10 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 250 mM, 500 mM, 750 mM e 1 M.

4.3 Análise das proteínas em SDS-PAGE

Retirou-se alíquotas das frações da purificação, que foram preparadas e analisadas em SDS-PAGE 15%, de acordo com Laemmli (1970).

4.4 Diálise e quantificação de proteínas

As frações consideradas puras foram submetidas à diálise para retirada do imidazol. Para isso, utilizou-se membranas semipermeáveis SnakeSkin Pleated Dialysis Tubing MWCO:3.500 (Thermo Fischer Scientific) e tampão PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1,8 mM, pH 7,4), mantendo agitação a 4°C e trocas frequentes de tampão.

A quantificação das proteínas foi feita utilizando o kit Pierce™ BCA Protein Assay (Thermo Fischer Scientific) conforme as instruções do fabricante.

4.5 Liofilização de proteínas

As proteínas dialisadas e quantificadas foram liofilizadas no liofilizador MicroModulyo-115 (Thermo Fisher Scientific), utilizando frascos de vidro (FO5658000). Para isso, inicialmente, congelou-se as proteínas em ultrafreezer (-80°C) e em nitrogênio líquido. Em seguida, os frascos foram acoplados ao equipamento, mantendo-o ligado até que a solução esteja seca.

4.6 Ensaio de atividade em dieta artificial

Para o ensaio, preparou-se a solução de sacarose 15% contendo corantes verde e amarelo (Assorted Food Color & Egg Dye – McCormick®) nas concentrações de 0,1 e 0,4%, respectivamente. Em seguida, essa solução foi utilizada para ressuspender as proteínas liofilizadas, de forma a obter concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL (Figura 5). Para o controle, utilizou-se apenas a solução sem a proteína.

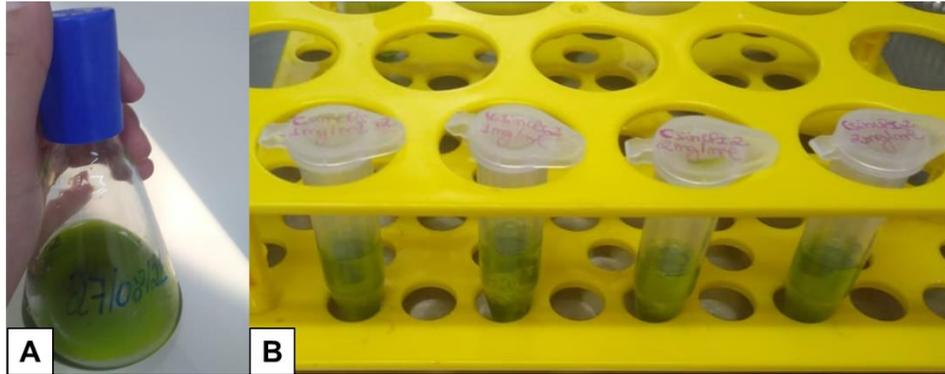


Figura 5 – Preparo da solução utilizada na dieta

A: Solução de sacarose 15% contendo os corantes verde e amarelo; B: Preparo das dietas utilizadas no ensaio, contendo as proteínas.

Fonte: Elaborado pela autora.

Para o preparo do sistema do ensaio (Figura 6), utilizou-se tubos plásticos com uma camada esticada de parafilme (Parafilm® M) no topo, seguido pela adição de 250 μ L da dieta e uma segunda camada de parafilme, formando um sachê de distribuição uniforme. Posteriormente, adicionou-se 10 indivíduos adultos de aproximadamente 5-8 dias de idade em cada tubo, sendo 10 réplicas por tratamento. Os insetos foram mantidos em ambiente controlado de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 50-60% e fotoperíodo de 14 h de luz e 10 h de escuro, com troca da dieta após 48 h, e monitorados diariamente, durante cinco dias, observando a quantidade de psilídeos vivos, na dieta e mortos.

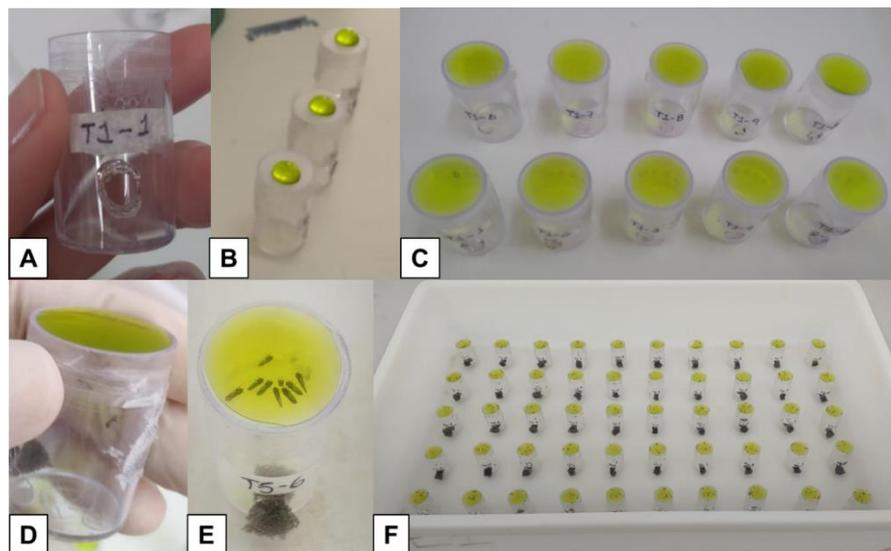


Figura 6 – Preparo do sistema de ensaio

A: Tubo utilizado para cada réplica; B e C: Montagem do sachê uniforme no topo do tubo, contendo a dieta entre as camadas; D e E: Réplica contendo os insetos; F: Representação do ensaio como um todo.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os ensaios de atividade em dieta artificial foram realizados em colaboração com o Fundo de Defesa da Citricultura (Fundecitrus), em Araraquara, com o auxílio do analista em pesquisa científica Fabricio José Jaciani e do auxiliar de pesquisa Rafael Brandão Garcia.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Expressão e purificação das proteínas

Os diferentes organismos apresentam preferência para um determinado conjunto de códons que codificam os aminoácidos (IKEMURA, 1981). Dessa forma, a expressão heteróloga pode ser afetada pela preferência de um códon em baixa quantidade, levando à terminação prematura, *frameshifting* e incorporação errada de aminoácidos (KURLAND & GALLANT, 1996). Portanto, para evitar esses problemas, a linhagem Rosetta™ foi desenhada para otimização da expressão, principalmente de proteínas eucarióticas, por bactérias devido à presença de um plasmídeo contendo códons raros, sendo resistente ao antibiótico cloranfenicol (NOVY *et al.*, 2001). Além disso, possui uma cópia do gene da T7 RNA polimerase no genoma, sob controle do promotor *lacUV5*, e o fragmento do gene *lacI*, sendo induzível pelo IPTG (STUDIER & MOFFATT, 1986).

O vetor pET28a (Figura 7), por sua vez, possui alguns fragmentos importantes para expressão heteróloga em sua sequência: promotor *lac T7*, repressor *lacI*, *tag* de seis histidinas, T7 terminador, RBS – *ribosome binding site*, MCS – *multiple cloning site* e diversas regiões de reconhecimento de enzimas de restrição.

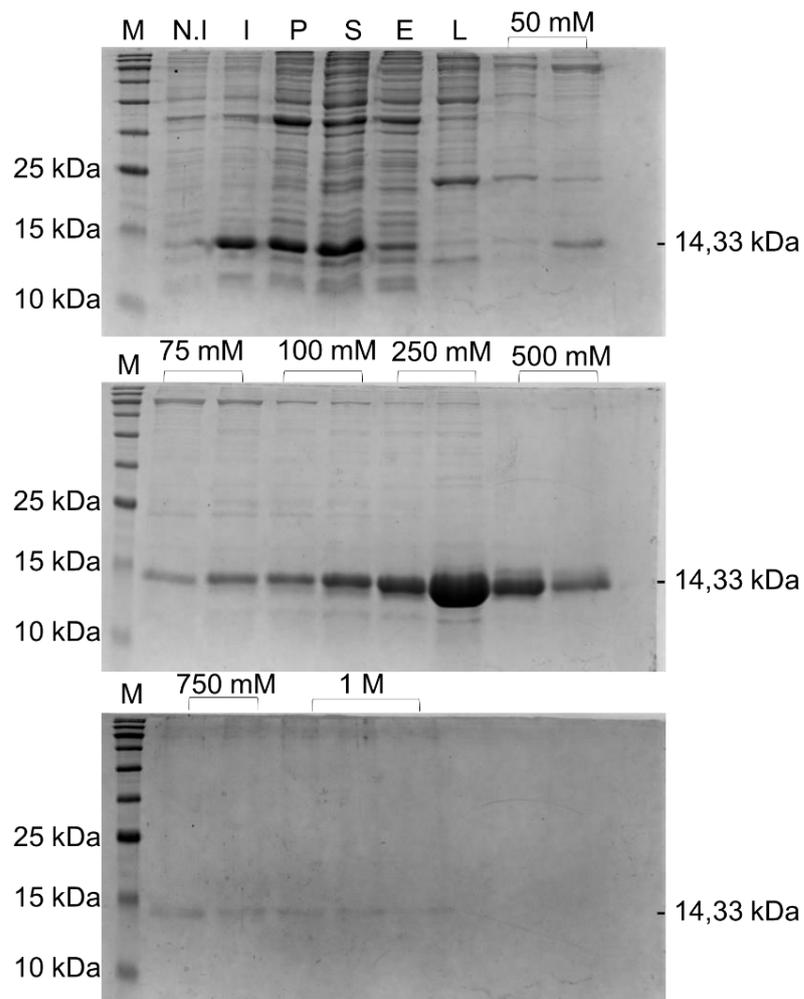


Figura 8 – Análise da purificação de CclemCPI-1 em SDS-PAGE 15%

M: Marcador de peso molecular BlueClassic Prestained Protein Marker – Jena Bioscience; N.I: amostra não induzida; I: amostra induzida; P: *pellet*, representando a fração insolúvel; S: sobrenadante, representando a fração solúvel; E: eluato; L: lavagem; 50 mM a 1M: frações crescentes de imidazol.

Fonte: Elaborada pela autora.

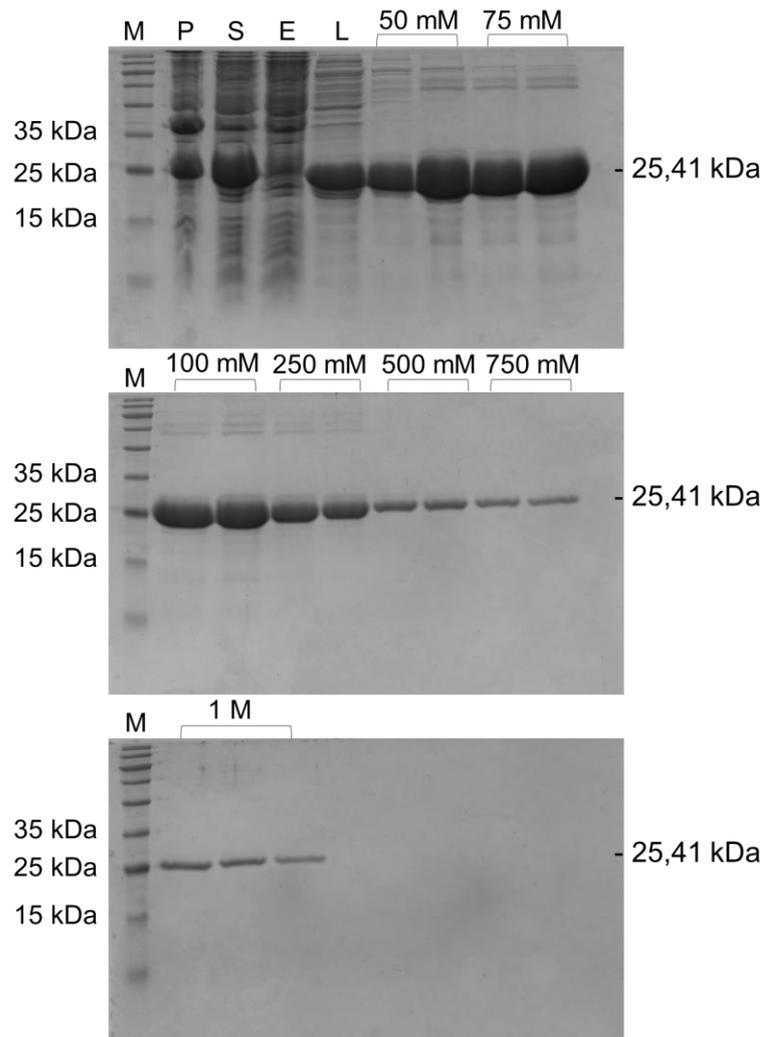


Figura 9 – Análise da purificação de CclemCPI-3 em SDS-PAGE 15%

M: Marcador de peso molecular BlueClassic Prestained Protein Marker – Jena Bioscience; P: *pellet*, representando a fração insolúvel; S: sobrenadante, representando a fração solúvel; E: eluato; L: lavagem; 50 mM a 1M: frações crescentes de imidazol.

Fonte: Elaborada pela autora.

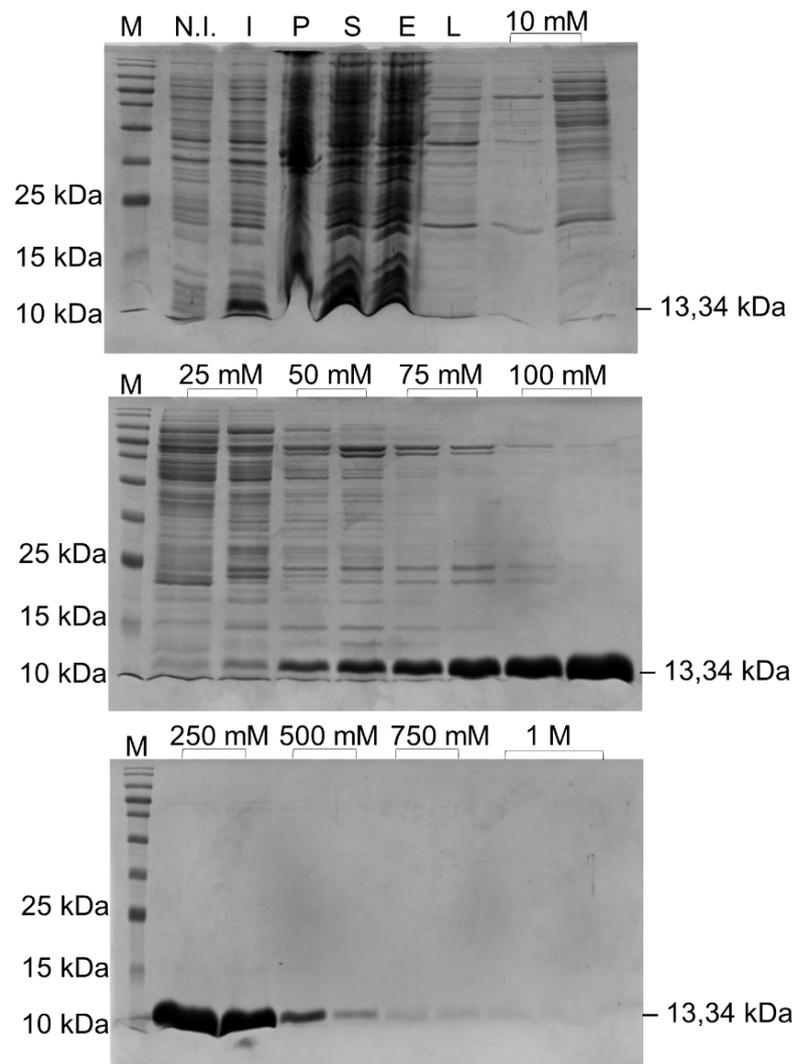


Figura 10 – Análise da purificação de CsinCPI-2 em SDS-PAGE 15%

M: Marcador de peso molecular BlueClassic Prestained Protein Marker – Jena Bioscience; N.I: amostra não induzida; I: amostra induzida; P: *pellet*, representando a fração insolúvel; S: sobrenadante, representando a fração solúvel; E: eluato; L: lavagem; 10 mM a 1M: frações crescentes de imidazol.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na purificação, a amostra denominada *pellet* representa a fração insolúvel, enquanto o eluato corresponde ao que foi coletado do sobrenadante, após passagem pela coluna, sendo uma forma de avaliar se há problemas na ligação à resina. A lavagem é utilizada para retirar o excesso de proteínas com baixa afinidade, principalmente bacterianas. Por fim, as concentrações crescentes de imidazol eluem a proteína, atuando como um competidor pelos sítios contendo íons níquel da resina.

Para otimização do processo, a coluna foi equilibrada com baixas concentrações de imidazol (25 mM), reduzindo a ligação de contaminantes bacterianos e aumentando a pureza da proteína de interesse. Portanto, as cistatinas

foram eluídas em diferentes concentrações: 250 mM para CclemCPI-1; 100 e 250 mM para CclemCPI-3; 100 e 250 mM para CsinCPI-2.

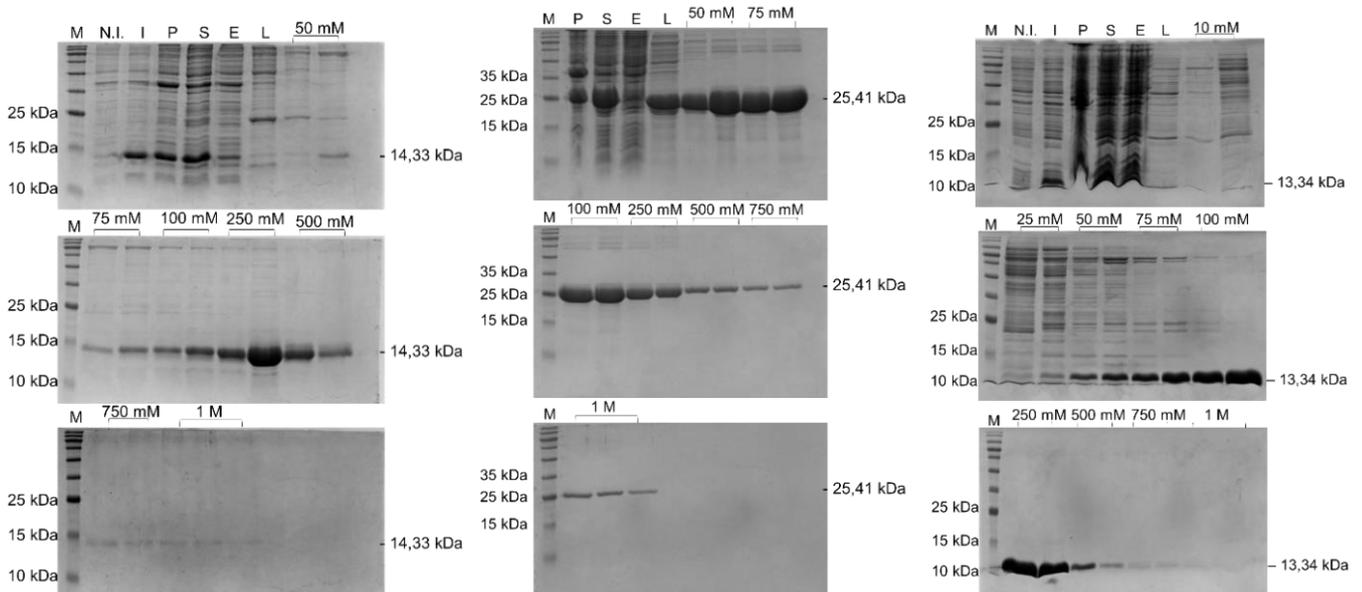


Figura 11 – Comparativo do rendimento das cistatinas

As proteínas recombinantes expressas apresentam diferentes rendimentos de acordo com a quantidade de frações puras obtidas na purificação.

Fonte: Elaborada pela autora.

Comparando o rendimento das proteínas (Figura 11), observa-se visualmente a diferença obtida por litro de indução, tendo maior concentração para CclemCPI-3. Além disso, o valor é diferente conforme a quantidade de frações puras, sendo em média 4,46 mg/L, 14,32 mg/L e 9,58 mg/L para CclemCPI-1, CclemCPI-3 e CsinCPI-2, respectivamente.

5.2 Ensaio de atividade das cistatinas

Os corantes utilizados nas cores verde e amarelo são descritas na literatura como atrativas, atuando como pistas visuais e, provavelmente, associadas à coloração de novas brotações. Além disso, também permitem monitorar visualmente se o inseto está se alimentando (Figura 12), apresentando abdome com coloração esverdeada (Figura 13) em caso positivo (SÉTAMOU & CZOKAJLO, 2009; WENNINGER; STELINSKI; HALL, 2009).

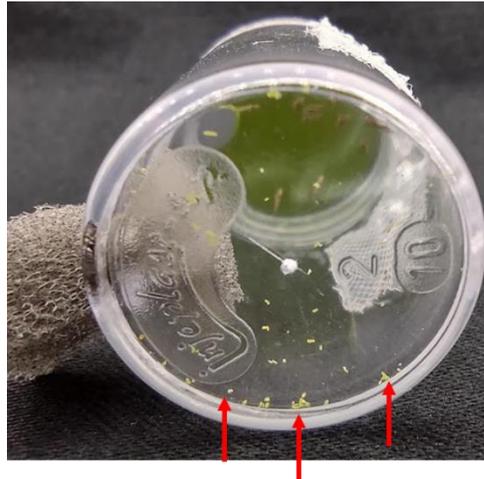


Figura 12 – Secreções dos insetos alimentados por dieta artificial contendo cistatinas
Os insetos que se alimentaram no experimento produziram secreções de coloração esverdeada, indicados pelas setas vermelhas, consequentes dos corantes utilizados na dieta, sendo um indicativo de alimentação.
Fonte: Elaborada pela autora.



Figura 13 – Insetos coletados ao término experimento
Os insetos que se alimentam apresentam abdome de coloração esverdeada, indicado pelas setas vermelhas, devido ao corante adicionado à dieta, sendo um método de monitoramento da alimentação.
Fonte: Elaborado pela autora.

Por se tratar de um bioensaio, um fator a ser considerado é o fato do inseto *D. citri* ser bastante exigente quanto às condições ambientais, sendo sensíveis a mudanças na temperatura (BASSANEZI *et al.*, 2010; GASPAROTO *et al.*, 2012) e na inconsistência da espessura do parafilme (HALL *et al.*, 2010), por exemplo. Assim, a dieta pode não ser atrativa para o inseto, mas a situação pode ser revertida com a otimização dessas condições.

Desta forma, como resultado, obteve-se os dados da Tabela 2, representando o comportamento dos psíldeos durante o experimento e classificando-os entre vivos (dispersos na réplica, sem se alimentar), na dieta (que estão se alimentando) e mortos. Observa-se que houve aumento da mortalidade ao longo dos dias (Tabela 3 e Gráfico 1), indicando possível efeito da proteína, principalmente quando comparado com o controle. Também era esperado maior mortalidade na dosagem de 2 mg/mL, sendo resultado direto do aumento da concentração.

Essas proteínas, apesar de estarem agrupadas em uma mesma família e apresentarem motivos conservados, possuem sequências distintas e, portanto, a capacidade de inibição é variável, sobretudo quando avaliado com diferentes substratos.

Tabela 2 - Dados do ensaio da dieta artificial contendo cistatinas recombinantes

(continua)

Tempo (horas)	Repetição	Tratamento																				
		Controle			CclemCPI-1 (1 mg/mL)			CclemCPI-1 (2 mg/mL)			CclemCPI-3 (1 mg/mL)			CclemCPI-3 (2 mg/mL)			CsinCPI-2 (1 mg/mL)			CsinCPI-2 (2 mg/mL)		
		D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M
24	1	6	4	0	4	6	0	7	3	0	4	6	0	8	1	1	4	6	0	5	5	0
	2	7	2	1	*			9	1	0	4	6	0	6	4	0	7	3	0	8	2	0
	3	6	4	0	7	3	0	3	7	0	8	2	0	8	2	0	5	5	0	8	2	0
	4	7	3	0	7	3	0	8	2	0	6	4	0	7	3	0	4	6	0	4	5	1
	5	5	5	0	5	5	0	3	7	0	8	2	0	6	4	0	7	3	0	9	1	0
	6	8	2	0	5	4	1	6	4	0	5	5	0	4	6	0	5	4	1	7	3	0
	7	9	1	0	1	9	0	3	7	0	4	6	0	9	1	0	4	6	0	4	6	0
	8	5	5	0	7	3	0	8	2	0	6	4	0	3	7	0	6	4	0	8	1	1
	9	6	4	0	5**	4	0	8	2	0	8	2	0	5	5	0	6	4	0	7	3	0
	10	9	1	0	8	2	0	7	3	0	7	3	0	7	3	0	2	7	1	7	3	0

D = dieta, representando os insetos que estão se alimentando; V = vivos, representando os insetos vivos no ensaio, mas que não estão se alimentando; M = mortos, insetos que morreram durante o experimento. Cada repetição contém 10 insetos, sendo 10 repetições por tratamento, totalizando 100 indivíduos.

* = perda da repetição 2 do tratamento CclemCPI-1 (1 mg/mL);

** = escape de 1 inseto da repetição 9 do tratamento CclemCPI-1 (1 mg/mL);

*** = troca a dieta.

Tabela 2 - Dados do ensaio da dieta artificial contendo cistatinas recombinantes

(continua)

Tempo (horas)	Repetição	Tratamento																				
		Controle			CclemCPI-1 (1 mg/mL)			CclemCPI-1 (2 mg/mL)			CclemCPI-3 (1 mg/mL)			CclemCPI-3 (2 mg/mL)			CsinCPI-2 (1 mg/mL)			CsinCPI-2 (2 mg/mL)		
		D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M
48 ***	1	3	7	0	4	5	1	7	3	0	2	8	0	3	6	1	6	4	0	6	4	0
	2	3	6	1				4	5	1	5	5	0	5	5	0	3	6	1	5	5	0
	3	6	4	0	1	9	0	2	6	2	5	4	1	7	3	0	5	4	1	9	1	0
	4	1	8	1	6	4	0	5	5	0	6	4	0	6	4	0	3	7	0	7	2	1
	5	4	5	1	3	6	1	5	5	0	8	2	0	8	2	0	6	4	0	3	7	0
	6	5	5	0	4	4	2	5	3	2	5	4	1	7	3	0	8	1	1	4	6	0
	7	5	5	0	2	8	0	8	1	1	6	4	0	6	4	0	4	6	0	7	3	0
	8	3	7	0	5	4	1	3	5	2	6	4	0	5	5	0	5	5	0	6	3	1
	9	5	5	0	9	0	0	7	2	1	8	2	0	5	5	0	4	6	0	5	5	0
	10	9	1	0	3	6	1	1	6	3	8	2	0	4	6	0	6	2	2	7	3	0
72	1	7	3	0	7	2	1	3	3	4	6	4	0	7	2	1	8	2	0	8	2	0
	2	8	1	1				5	1	4	7	3	0	6	4	0	6	3	1	6	4	0
	3	7	3	0	7	3	0	3	3	4	7	2	1	3	7	0	7	2	1	8	2	0
	4	5	3	2	8	2	0	3	5	2	7	2	1	7	3	0	6	3	1	8	1	1
	5	7	2	1	3	4	3	6	2	2	6	4	0	8	2	0	5	5	0	9	0	1
	6	8	1	1	3	3	4	2	1	7	6	3	1	8	2	0	8	1	1	9	1	0
	7	5	5	0	8	1	1	7	2	1	10	0	0	10	0	0	6	4	0	6	4	0
	8	7	1	2	9	0	1	5	1	4	8	2	0	8	1	1	5	5	0	7	1	2
	9	6	3	1	8	0	1	6	3	1	5	5	0	7	3	0	7	3	0	9	1	0
	10	6	4	0	7	1	2	5	0	5	4	6	0	7	3	0	6	2	2	7	3	0
96	1	6	4	0	7	2	1	5	1	4	7	3	0	6	2	2	6	4	0	6	4	0
	2	6	2	2				5	1	4	8	2	0	9	1	0	7	2	1	8	2	0
	3	9	0	1	3	6	1	4	0	6	5	4	1	10	0	0	5	4	1	9	1	0
	4	6	1	3	6	4	0	5	3	2	9	0	1	8	2	0	6	3	1	5	3	2
	5	7	2	1	3	3	4	5	3	2	10	0	0	9	1	0	6	4	0	9	0	1
	6	9	0	1	6	0	4	1	1	8	6	2	2	6	3	1	2	7	1	9	1	0
	7	10	0	0	8	1	1	7	1	2	9	1	0	10	0	0	8	2	0	8	1	1
	8	7	1	2	8	0	2	5	1	4	7	2	1	7	2	1	5	5	0	6	2	2
	9	6	2	2	7	1	1	4	4	2	9	0	1	9	1	0	6	4	0	6	4	0
	10	8	2	0	7	1	2	3	2	5	8	2	0	9	1	0	7	1	2	7	3	0

D = dieta, representando os insetos que estão se alimentando; V = vivos, representando os insetos vivos no ensaio, mas que não estão se alimentando; M = mortos, insetos que morreram durante o experimento. Cada repetição contém 10 insetos, sendo 10 repetições por tratamento, totalizando 100 indivíduos.

* = perda da repetição 2 do tratamento CclemCPI-1 (1 mg/mL);

** = escape de 1 inseto da repetição 9 do tratamento CclemCPI-1 (1 mg/mL);

*** = troca a dieta.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 - Dados do ensaio da dieta artificial contendo cistatinas recombinantes

(conclusão)

Tempo (horas)	Repetição	Tratamento																				
		Controle			CclemCPI-1 (1 mg/mL)			CclemCPI-1 (2 mg/mL)			CclemCPI-3 (1 mg/mL)			CclemCPI-3 (2 mg/mL)			CsinCPI-2 (1 mg/mL)			CsinCPI-2 (2 mg/mL)		
		D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V	M
120	1	3	6	1	4	4	2	4	1	5	4	3	3	8	0	2	9	1	0	5	5	0
	2	3	6	1				3	2	5	5	5	0	8	2	0	9	0	1	10	0	0
	3	6	3	1	6	0	4	3	1	6	5	4	1	7	3	0	7	2	1	7	3	0
	4	3	5	2	5	5	0	4	2	4	5	4	1	7	3	0	9	0	1	6	2	2
	5	3	6	1	3	2	5	6	2	2	5	5	0	8	2	0	6	4	0	7	2	1
	6	8	1	1	4	2	4	1	0	9	1	0	9	3	5	2	4	5	1	5	5	0
	7	3	7	0	4	4	2	5	1	4	7	3	0	9	1	0	7	2	1	8	1	1
	8	5	2	3	4	3	3	4	2	4	5	4	1	6	2	2	4	6	0	5	3	2
	9	6	2	2	6	2	1	7	0	3	2	7	1	8	2	0	4	5	1	2	6	2
	10	3	7	0	3	4	3	2	2	6	8	2	0	7	3	0	6	2	2	7	3	0

D = dieta, representando os insetos que estão se alimentando; V = vivos, representando os insetos vivos no ensaio, mas que não estão se alimentando; M = mortos, insetos que morreram durante o experimento. Cada repetição contém 10 insetos, sendo 10 repetições por tratamento, totalizando 100 indivíduos.

* = perda da repetição 2 do tratamento CclemCPI-1 (1 mg/mL);

** = escape de 1 inseto da repetição 9 do tratamento CclemCPI-1 (1 mg/mL);

*** = troca a dieta.

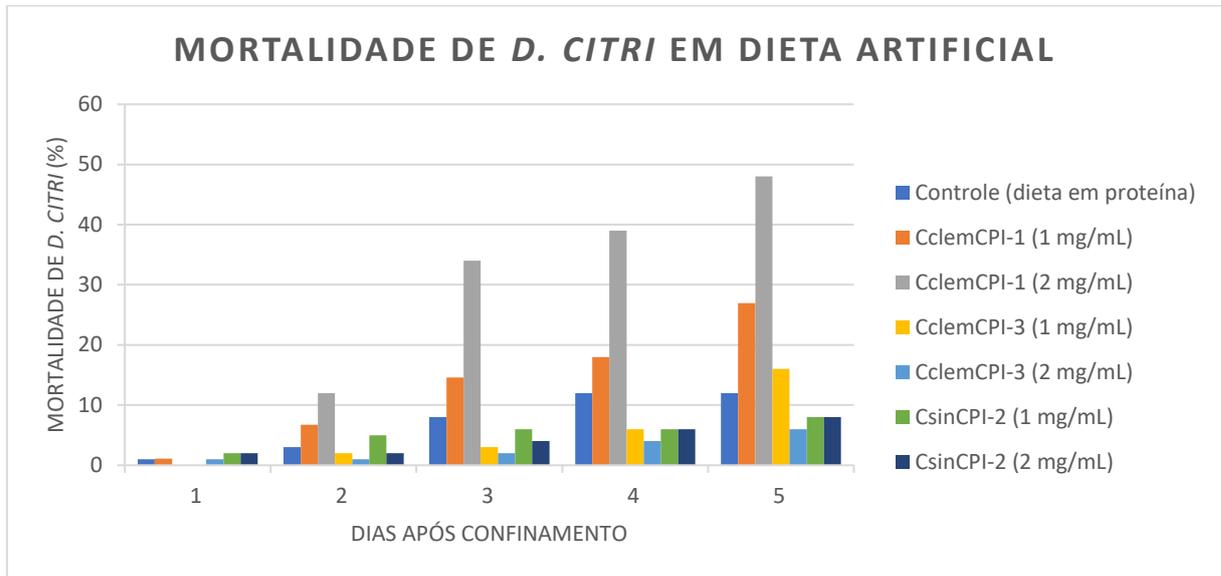
Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 - Mortalidade dos insetos durante o experimento

Tratamentos	Mortalidade (%)				
	Dias após confinamento				
	1	2	3	4	5
Controle (dieta sem proteína)	1	3	8	12	12
CclemCPI-1 (1 mg/mL)	1,12	6,74	14,61	17,98	26,97
CclemCPI-1 (2 mg/mL)	0	12	34	39	48
CclemCPI-3 (1 mg/mL)	0	2	3	6	16
CclemCPI-3 (2 mg/mL)	1	1	2	4	6
CsinCPI-2 (1 mg/mL)	2	5	6	6	8
CsinCPI-2 (2 mg/mL)	2	2	4	6	8

Fonte: Elaborado pela autora.

Gráfico 1 - Mortalidade de *D. citri* ao longo do experimento



Representação gráfica da mortalidade observada durante cinco dias, com aumento gradual, principalmente para os tratamentos contendo CclemCPI-1.

Fonte: Elaborada pela autora.

Na classificação das proteases, as catepsinas são um grupo de enzimas de origem animal, sendo denominadas B e L aquelas que contêm um resíduo de cisteína no sítio catalítico (MARÍ & FERNANDEZ-CHECA, 2014) e catepsina do tipo B e L, quando identificadas em insetos (TERRA & FERREIRA, 2012). Essas catepsinas humanas apresentam 30% de similaridade com insetos e, portanto, provavelmente apresentam semelhanças estruturais e funcionais (BETON *et al.*, 2012), com predominância no trato digestivo (KRUSE *et al.*, 2017).

Os dados obtidos indicam resultados preliminares quanto aos efeitos das cistatinas, sendo bastante promissor para CclemCPI-1, com alta taxa de mortalidade, principalmente com a dose de 2 mg/mL. A caracterização de uma catepsina do tipo B em *D. citri* mostrou a presença majoritária no intestino em comparação a outros tecidos, sugerindo atividade digestiva (FERRARA *et al.*, 2015). Assim, testes de atividades desenvolvidos por Schneider e colaboradores (2020) mostraram que a cistatina CclemCPI-1 apresentou forte inibição da catepsina B humana, sendo um potencial alvo para controle do HLB, corroborando com os resultados obtidos.

No caso da CclemCPI-3, os resultados não apresentaram o padrão esperado de aumento dos efeitos inibitórios em maior concentração, causados por prováveis erros nos testes quanto à quantificação das proteínas, indicando

necessidade de repetição e padronização do experimento, visando novas investigações para uma conclusão assertiva.

Para CsinCPI-2, não pareceu haver efeitos no ensaio realizado. No entanto, a caracterização de uma catepsina do tipo L de *D. citri*, por Ferrara e colaboradores (2020), mostrou a expressão em todos os tecidos, indicando diversas funções, com maior frequência no intestino. Em teste de inibição, mostrou-se fortemente inibida pela cistatina CsinCPI-2, sendo um potencial alvo para controle, seja diretamente na mortalidade ou em outros processos fisiológicos. Dessa forma, a repetição do experimento se faz necessário.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos nos experimentos mostram-se promissores para uma possível forma de controle do psílídeo *Diaphorina citri* e da disseminação da doença Huanglongbing, visto que as cistatinas avaliadas são originárias de citros e, portanto, seria uma estratégia específica e com maior eficácia para o combate de uma doença manifestada por essas plantas.

Os ensaios realizados em dieta artificial apresentaram mortalidade de 26,97% e 48% para a cistatina CclemCPI-1 nas concentrações de 1 mg/mL e 2 mg/mL, respectivamente. Assim, há indícios de inibição de proteases presente no trato digestivo do inseto, visto que a única diferença em relação ao controle é a presença da proteína, apesar de os mecanismos dessa interação ainda serem desconhecidos, sendo alvo de estudos posteriores. Para as demais cistatinas, os dados obtidos não foram condizentes com o esperado, sendo necessário a repetição do experimento para novas conclusões.

Desta forma, novos ensaios serão realizados, visando a padronização e confirmação dos resultados, além de testes incluindo potenciais novas cistatinas e utilização das proteínas em solução, tendo maior controle da quantidade. Após a confirmação desses ensaios, é possível elaborar estratégias de superexpressão dos inibidores de protease pelas plantas como alternativa para o controle de pragas, sendo uma alternativa menos danosa ao meio ambiente, substituindo os produtos químicos utilizados atualmente.

REFERÊNCIAS

- BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; BELASQUE JÚNIOR, J.; SPÓSITO, M. B.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.. Epidemiologia do huanglongbing e suas implicações para o manejo da doença. **Citrus Research & Technology**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 11-23, 2010.
- BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; MIRANDA, M. P.; WULFF, N. A.; VOLPE, H. X. L.; AYRES, A. J.. Overview of citrus huanglongbing spread and management strategies in Brazil. **Tropical Plant Pathology**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 251-264, 6 maio 2020.
- BELASQUE JUNIOR, J.; YAMAMOTO, P. T.; MIRANDA, M. P.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J. M.. Controle do huanglongbing no estado de São Paulo, Brasil. **Citrus Research & Technology**, [S.L.], v. 31, n. 1, p. 53-64, 2010.
- BENCHABANE, M.; SCHLÜTER, Ur.; VORSTER, J.; GOULET, M.C.; MICHAUD, D.. Plant cystatins. **Biochimie**, [S.L.], v. 92, n. 11, p. 1657-1666, nov. 2010.
- BERGAMIN FILHO, A. *et al.*. Relationship between insecticide sprays and Huanglongbing progress in a citrus orchard in São Paulo, Brazil. In: INTERNATIONAL RESEARCH CONFERENCE ON HUANGLONGBING, 2008. Orlando. **Proceedings of the International Research Conference on Huanglongbing**. Orlando: Plant Management Network, 2009. p. 282-284.
- BETON, D.; GUZZO, C. R.; RIBEIRO, A. F.; FARAH, C. S.; TERRA, W. R.. The 3D structure and function of digestive cathepsin L-like proteinases of *Tenebrio molitor* larval midgut. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 42, n. 9, p. 655-664, set. 2012.
- BOVÉ, J. M.. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. **Journal Of Plant Pathology**, [s.l.], v. 88, n. 1, p.7-37, mar. 2006.
- BROADWAY, R. M.. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives Of Insect Biochemistry And Physiology**, [S.L.], v. 32, n. 1, p. 39-53, 1996.
- CANALE, M. C.; KOMADA, K. M. A.; LOPES, J. R. S.. Latency and incubation of 'Candidatus *Liberibacter asiaticus*' in citrus after vector inoculation. **Tropical Plant Pathology**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. 320-326, 19 nov. 2019.
- CASARETTO, J. A.; CORCUERA, L. J.. Plant proteinase inhibitors: a defensive response against insects. (Review). **Biological Research**, [s.l.], v. 28, n. 4, p.239-249, dez. 1995.
- CITRUSBR. Associação Nacional dos Exportadores de Sucos Cítricos. **Exportações de Suco**. 2020. Disponível em: <<https://citrusbr.com/estatisticas/exportacoes/>>. Acesso em: 10 fev. 2023.
- COLETTA-FILHO, H. D.; TARGON, M. L. P. N.; TAKITA, M. A.; NEGRI, J. D. de; POMPEU, J.; MACHADO, M. A.; AMARAL, A. M. do; MULLER, G. W.. First Report of the Causal Agent of Huanglongbing ("Candidatus *Liberibacter asiaticus*") in Brazil. **Plant Disease**, [S.L.], v. 88, n. 12, p. 1382-1382, dez. 2004.
- DA GRAÇA, J. V.; KORSTEN, L.. Citrus Huanglongbing: Review, Present status and Future Strategies. **Diseases Of Fruits And Vegetables Volume I**, [s.l.], p.229-245, 2004.
- EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Base de Dados dos Produtos**. 2020. Disponível em:

<http://www.cnpmf.embrapa.br/Base de Dados/index_pdf/index_pdf.htm>. Acesso em: 25 jan. 2023.

FDOC. Florida Department Of Citrus. **Citrus Greening Infographic**. Disponível em: <<https://www.floridacitrus.org/newsroom/citrus-411/citrus-greening/citrus-greening-infographic/>>. Acesso em: 26 jan. 2023.

FERRARA, T. F. S.; SCHNEIDER, V. K.; KISHI, L. T.; CARMONA, A. K.; ALVES, M. F. M.; BELASQUE-JUNIOR, J.; ROSA, J. C.; HUNTER, W. B.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOARES-COSTA, A.. Characterization of a Recombinant Cathepsin B-Like Cysteine Peptidase from *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: Liviidae). **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 12, p. 1-18, 30 dez. 2015.

FERRARA, T. F. S.; SCHNEIDER, V. K.; LIMA, P. S.; BRONZE, F. S.; MACHADO, M. F. M.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOARES-COSTA, A.; CARMONA, A. K.. Gene expression studies and molecular characterization of a cathepsin L-like from the Asian citrus psyllid *Diaphorina citri*, vector of Huanglongbing. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 158, p. 375-383, set. 2020.

FONSECA, F. P. P. *et al.*. Recombinant expression, localization and in vitro inhibition of midgut cysteine peptidase (SI-CathL) from sugarcane weevil, *Sphenophorus levis*. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.58-69, jan. 2012.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. **MANUAL DE PSILÍDEO *Diaphorina citri*: MEDIDAS ESSENCIAIS DE CONTROLE**. Araraquara: Fundecitrus, 2018. 16 p.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. **Greening atinge 20,87% das laranjeiras do cinturão citrícola de SP e MG**. 2020. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/noticias/integra/greening-atinge-2087-das-laranjeiras-do-cinturao-citricola-de-sp-e-mg/944>>. Acesso em: 10 fev. 2023.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. **Levantamento da Incidência das Doenças dos Citros: Greening, CVC e Cancro Cítrico no Cinturão Citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro**. 2022a. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/levantamentos/Levantamento%20de%20doencas%202022_Relatorio%20completo.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2023.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. **Reestimativa de Safra de Laranja 2022/2023**. 2023. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/pdf/pes_relatorios/0223_Reestimativa_da_Safra_de_Laranja.pdf>. Acesso em: 26 jan. 2023.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. **Relatório de Atividades**. 2022b. Disponível em: <<https://www.fundecitrus.com.br/pdf/relatorios/2022.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2023.

FUNDECITRUS. Fundo de Defesa da Citricultura. **Revista Citricultor Edição 58**. 2022c. Disponível em: <https://www.fundecitrus.com.br/comunicacao/revista_detalhes/revista-citricultor---edicao-58/78>. Acesso em: 26 jan. 2023.

GABRIEL, D.; GOTTWALD, T. R.; LOPES, S. A.; WULFF, N. A.. Bacterial pathogens of citrus: citrus canker, citrus variegated chlorosis and huanglongbing. **The Genus Citrus**, [S.L.], p. 371-389, 2020.

GALLO, D. *et al.* **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GASPAROTO, M. C. G.; COLETTA-FILHO, H. D.; BASSANEZI, R. B.; LOPES, S. A.; LOURENÇO, S. A.; AMORIM, L.. Influence of temperature on infection and establishment of 'Candidatus Liberibacter americanus' and 'Candidatus Liberibacter asiaticus' in citrus plants. **Plant Pathology**, [S.L.], v. 61, n. 4, p. 658-664, 9 jan. 2012.

GIANOTTI, A. *et al.*. Inhibitory effect of the sugarcane cystatin CaneCPI-4 on cathepsins B and L and human breast cancer cell invasion. **Biological Chemistry**, [s.l.], v. 389, n. 4, p.447-453, 1 abr. 2008.

GIANOTTI, A. *et al.*. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expression And Purification**, [s.l.], v. 47, n. 2, p.483-489, jun. 2006.

GOTTWALD, T. R. Citrus canker and citrus huanglongbing, two exotic bacterial diseases threatening the citrus industries of the Western Hemisphere. **Outlooks on Pest Management**, [S.L.], v. 18, p. 274–279, out. 2007.

GOTTWALD, T. R.. Current Epidemiological Understanding of Citrus Huanglongbing. **Annual Review Of Phytopathology**, [s.l.], v. 48, n. 1, p.119-139, jul. 2010.

GOTTWALD, T. R.; GRAÇA, J. V; BASSANEZI, R. B.. Citrus Huanglongbing: the pathogen and its impact. **Plant Health Progress**, [S.L.], v. 8, n. 1, p. 1-36, jan. 2007.

HALBERT, S. E.; MANJUNATH, K. L.. ASIAN CITRUS PSYLLIDS (STERNORRHYNCHA: psyllidae) and greening disease of citrus. **Florida Entomologist**, [S.L.], v. 87, n. 3, p. 330-353, set. 2004.

HALL, D. G. *et al.*. Research Toward an Artificial Diet for Adult Asian Citrus Psyllid. **Annals Of The Entomological Society Of America**, [S.L.], v. 103, n. 4, p. 611-617, 1 jul. 2010.

HALL, D. G.; RICHARDSON, M. L.; AMMAR, E.D.; HALBERT, S. E.. Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, vector of citrus huanglongbing disease. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, [S.L.], v. 146, n. 2, p. 207-223, 7 dez. 2012.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. 2022. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/7832>>. Acesso em: 26 jan. 2023.

ICHINOSE, K.; MIYAZI, K.; MATSUHIRA, K.; YASUDA, K.; SADOYAMA, Y.; TUAN, D. H.; VAN BANG, D.. Unreliable pesticide control of the vector psyllid *Diaphorina citri* (Hemiptera: psyllidae) for the reduction of microorganism disease transmission. **Journal Of Environmental Science And Health, Part B**, [S.L.], v. 45, n. 5, p. 466-472, 4 jun. 2010.

IKEMURA, T.. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 146, n. 1, p. 1-21, fev. 1981.

INOUE, H.; OHNISHI, J.; ITO, T.; TOMIMURA, K.; MIYATA, S.; IWANAMI, T.; ASHIHARA, W.. Enhanced proliferation and efficient transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus* by adult *Diaphorina citri* after acquisition feeding in the nymphal stage. **Annals Of Applied Biology**, [S.L.], v. 155, n. 1, p. 29-36, ago. 2009.

JONGSMA, M. A.; BEEKWILDER, J.. Co-Evolution of Insect Proteases and Plant Protease Inhibitors. **Current Protein & Peptide Science**, [S.L.], v. 12, n. 5, p. 437-447, 1 ago. 2011.

KRUSE, A.; FATTAH-HOSSEINI, S.; SAHA, S.; JOHNSON, R.; WARWICK, E.; STURGEON, K.; MUELLER, L.; MACCOSS, M. J.; SHATTERS, R. G.; HECK, M. C.. Combining 'omics and microscopy to visualize interactions between the Asian citrus psyllid vector and the Huanglongbing pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* in the insect gut. **Plos One**, [S.L.], v. 12, n. 6, p. 1-28, 20 jun. 2017.

KURLAND, C.; GALLANT, J.. Errors of heterologous protein expression. **Current Opinion In Biotechnology**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 489-493, out. 1996.

LAEMMLI, V. K.. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LOPES, J. R. S. *et al.*. Psilídeo-asiático-dos-citros, *Diaphorina citri* Kuwayama. In: Pragas introdutivas no Brasil [S.l: s.n.], 2015.

LÓPEZ-OTÍN, C.; BOND, J. S.. Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 283, n. 45, p. 30433-30437, nov. 2008.

MARÍ, M.; FERNANDEZ-CHECA, J. C.. Damage Mediated by Dysfunction of Organelles and Cellular Systems: lysosomes. **Pathobiology Of Human Disease**, [S.L.], p. 97-107, 2014.

MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; POMPEU JUNIOR, J.. **CITROS: principais informações e recomendações de cultivo**. 2005. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/imagem_informacoestecnologicas/43.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2023.

MIGUEL, M. C.. **Produção Recombinante e Caracterização de Duas Cistatinas de Cana-de-Açúcar**. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado) - Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/5553/6416.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2023.

MIRANDA, M. P.. **MANUAL DE PSILÍDEO *Diaphorina citri*: MEDIDAS ESSENCIAIS DE CONTROLE**. Araraquara: Fundecitrus, 2018. 16 p.

NEVES, M. F. *et al.*. **O Retrato da Citricultura Brasileira**. 1. ed. Ribeirão Preto: 2010. v. 1. 137p.

NOVAGEN. Competent Cells: What a difference a strain makes. Disponível em: <https://www.merckmillipore.com/BR/pt/product/RosettaDE3-Competent-Cells-Novagen,EMD_BIO-70954>. Acesso em: 02 fev. 2023.

NOVAGEN. pET System Manual – TB055 8th Edition. 1999. Acesso em: 02 fev. 2023.

NOVY, R.; DROTT, D.; YAEGER, K.; MIERENDORF, R.. Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. **inNovations**, n. 12, p. 1–3, jun. 2001. Disponível em: <<http://wolfson.huji.ac.il/expression/rosetta.pdf>>. Acesso em 02 fev. 2023

BERGOLZER, P. C.; VON STANDEN, D. F.; BASSON, W. J. Greening Disease of Sweet Orange in South Africa. **International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)**, v. 3, p. 213-219, 1965.

OLIVEIRA, A. S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P.. Cysteine proteinases and cystatins. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 91-104, jan. 2003.

OLIVEIRA, J. P.; MAGLIARELLI, H. F.; PEREIRA, F. V. Sugarcane Cystatin CaneCPI-4 inhibits Melanoma Growth by Angiogenesis Disruption. **Journal Of Cancer Science & Therapy**, [s.l.], v. 03, n. 07, p.161-167, 2011.

PAGE, M. J.; CERA, E.. Serine peptidases: Classification, structure and function. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [s.l.], v. 65, n. 7-8, p.1220-1236, 9 fev. 2008.

PARRA, J. R. P. *et al.* Bioecologia do vetor *Diaphorina citri* e transmissão de bactérias associadas ao huanglongbing. **Citrus Research & Technology**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.37-51, 2010.

RAWLINGS, N. D.. Twenty-five years of nomenclature and classification of proteolytic enzymes. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Proteins And Proteomics**, [s.l.], v. 1868, n. 2, p.140345, fev. 2020.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J.; FINN, R.. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.D343-D350, 2 nov. 2016.

RIBEIRO, C. W. *et al.* Production of a His-tagged canecystatin in transgenic sugarcane and subsequent purification. **Biotechnology Progress**, [s.l.], v. 24, n. 5, p.1060-1066, set. 2008.

RUSSELL, C. W.; PELZ-STELINSKI, K. S.. Development of an artificial diet and feeding system for juvenile stages of the Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, [S.L.], v. 154, n. 2, p. 171-176, 10 jan. 2015.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory Manual**, vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1989.

SANTIAGO, A. C. *et al.* A New Sugarcane Cystatin Strongly Binds to Dental Enamel and Reduces Erosion. **Journal of Dental Research**, [s.l.], v. 96, n. 9, p.1051-1057, 2017.

SANTOS FILHO, H. P.; MAGALHÃES, A. F. J.; COELHO, Y. S. (Ed.). O produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. 217 p. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/101781/1/500perguntascitros.pdf>>. Acesso em: 26 jan. 2023.

SANTOS-SILVA, L. K. *et al.* Recombinant expression and biochemical characterization of sugarcane legumain. **Plant Physiology And Biochemistry**, [s.l.], v. 57, p.181-192, ago. 2012.

SCHNEIDER, V. K.; FERRARA, T. F. S.; ROCHA, S. V.; SANTOS-JUNIOR, C. D.; NEO-JUSTINO, D. M.; CUNHA, A. F.; SILVA, J. P. M. O.; TERSARIOL, I. L. S.; CARMONA, A. K.; HENRIQUE-SILVA, F.. Recombinant expression, characterization and phylogenetic studies of novels cystatins-like proteins of sweet orange (*Citrus sinensis*) and clementine (*Citrus clementina*). **International Journal Of Biological Macromolecules**, [S.L.], v. 152, p. 546-553, jun. 2020.

SÉTAMOU, M.; CZOKAJLO, D. 2009. Detection and monitoring trap for asian citrus psyllid, *Diaphorina citri* Kuwayama. Alpha Scents. Disponível em: <http://www.alphascents.com/docs/Monitoring_Trap_for_the_Asian_Citrus_Psyllid.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2022.

SINGERMAN, A.; ROGERS, M.. The Economic Challenges of Dealing with Citrus Greening: The Case of Florida. **Journal Of Integrated Pest Management**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-7, 1 jan. 2020.

SOARES-COSTA, A. *et al.*. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 296, n. 5, p.1194-1199, set. 2002.

SOARES-COSTA, A. *et al.*. Industrial PE-2 strain of *Saccharomyces cerevisiae*: from alcoholic fermentation to the production of recombinant proteins. **New Biotechnology**, [s.l.], v. 31, n. 1, p.90-97, jan. 2014.

SOARES-COSTA, A. *et al.*. Recombinant expression and characterization of a cysteine peptidase from *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **Genetics And Molecular Research**, [s.l.], v. 11, n. 4, p.4043-4057, 2012.

STORER, A. C.; MÉNARD, R.. Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. **Methods In Enzymology**, [S.L.], p. 486-500, 1994.

STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A.. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal Of Molecular Biology**, [S.L.], v. 189, n. 1, p. 113-130, maio 1986.

TALON, M.; WU, G. A.; GMITTER, F. G.; ROKHSAR, D. S.. The origin of citrus. **The Genus Citrus**, [S.L.], p. 9-31, 2020.

TEIXEIRA, D. C.; DANET, J. L.; EVEILLARD, S.; MARTINS, E. C.; JESUS JUNIOR, W. C.; YAMAMOTO, P. T.; LOPES, S. A.; BASSANEZI, R. B.; AYRES, A. J.; SAILLARD, C.. Citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' liberibacter species associated with the disease. **Molecular And Cellular Probes**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 173-179, jun. 2005a.

TEIXEIRA, D. C.; SAILLARD, C.; EVEILLARD, S.; DANET, J. L.; COSTA, P. I.; AYRES, A. J.; BOVÉ, J.. 'Candidatus Liberibacter americanus', associated with citrus huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. **International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology**, [S.L.], v. 55, n. 5, p. 1857-1862, 1 set. 2005b

TEIXEIRA, D. C.; WULFF, N. A.; MARTINS, E. C.; KITAJIMA, E. W.; BASSANEZI, R.; AYRES, A. J.; EVEILLARD, S.; SAILLARD, C.; BOVÉ, J. M.. A Phytoplasma Closely Related to the Pigeon Pea Witches'-Broom Phytoplasma (16Sr IX) Is Associated with Citrus Huanglongbing Symptoms in the State of São Paulo, Brazil. **Phytopathology**, [S.L.], v. 98, n. 9, p. 977-984, set. 2008.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.. Biochemistry and Molecular Biology of Digestion. **Insect Molecular Biology And Biochemistry**, [S.L.], p. 365-418, 2012.

TIWARI, S.; MANN, R. S.; ROGERS, M. E.; STELINSKI, L. L. Insecticide resistance in field populations of Asian citrus psyllid in Florida. **Pest Management Science**, [S.L.], v. 67, n. 10, p. 1258-1268, 2 maio 2011.

TURK, V.; BODE, W.. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **Febs Letters**, [S.L.], v. 285, n. 2, p. 213-219, 1 jul. 1991.

USDA. United States Department of Agriculture **Citrus: World Markets and Trade**. 2023. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/citrus.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2023.

USDA. United States Department of Agriculture **Florida Citrus Statistics 2020-2021**. Disponível em:

<https://www.nass.usda.gov/Statistics_by_State/Florida/Publications/Citrus/Citrus_Statistics/2020-21/fcs2021b.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2023.

USDA. United States Department of Agriculture. **Citrus: World Markets and Trade**. 2021. Disponível em: <<https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/w66343603/b8516k98g/2514ph35q/citrus.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2023.

VALADARES, N. F. *et al.*. Molecular determinants of improved cathepsin B inhibition by new cystatins obtained by DNA shuffling. **Bmc Structural Biology**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.30-39, 2010.

VERMELHO, A. B. *et al.*. ENZIMAS PROTEOLÍTICAS: APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L.. Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado. [s.l.]: Interciencia, 2008. p. 269-285.

VIDAL, M. S.. **Potencial Biotecnológico das Cistatinas**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 27 p.

WENNINGER, E. J.; STELINSKI, L. L.; HALL, D. G.. Roles of Olfactory Cues, Visual Cues, and Mating Status in Orientation of *Diaphorina citri* Kuwayama (Hemiptera: psyllidae) to four different host plants. **Environmental Entomology**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 225-234, 1 fev. 2009.

WILKESMAN, J.. Cysteine Protease Zymography: brief review. **Zymography**, [S.L.], p. 25-31, 2017.

WOLFSON, J. L.; MURDOCK, L. L.. Diversity in digestive proteinase activity among insects. **Journal Of Chemical Ecology**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.1089-1102, abr. 1990.