

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Desireé Soares da Silva

“Efeito do inibidor de tripsina de sementes de *Adenantha pavonina* sobre os lepidópteros *Anticarsia gemmatalis* e *Anagasta kuehniella*”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) DESIREÉ SOARES DA SILVA e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de **Mestre em Biologia Funcional e Molecular**, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo
Co-Orientador: Prof. Dr. Goran Nesic

Campinas, 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si38e	<p>Silva, Desireé Soares da Efeito do inibidor de tripsina de sementes de <i>Adenantha pavonina</i> sobre os lepidópteros <i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Anagasta kuehniella</i> / Desireé Soares da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.</p> <p>Orientadores: Maria Lígia Rodrigues Macedo, Goran Neshich. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Inibidores de tripsina. 2. Lepidóptero. 3. <i>Anticarsia gemmatalis</i>. 4. <i>Anagasta kuehniella</i>. 5. Interação inseto-planta. I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. II. Neshich, Goran. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(rcdt/ib)</p>
--------------	--

Título em inglês: The effects of the trypsin inhibitor from *Adenantha pavonina* seeds on the lepidopteros *Anticarsia gemmatalis* and *Anagasta kuehniella*.

Palavras-chave em inglês: Trypsin inhibitors; Lepidoptero; *Anticarsia gemmatalis*; *Anagasta kuehniella*; Insect-plant interaction.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo, Sérgio Marangoni, Ilka Maria Vasconcelos.

Data da defesa: 19/02/2010.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 19 de Fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo


Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni


Assinatura

Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos


Assinatura

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Ricardo Aparício

Assinatura

A Deus por me ajudar nessa trajetória me fortalecendo nos momentos de angústia e concedendo tranqüilidade e perseverança necessária para a realização deste projeto.

A minha querida mãe Nilce, que sempre esteve do meu lado apoiando todas as minhas decisões e nunca medindo esforços para que eu atingisse os meus objetivos. Amo você.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo, pela oportunidade oferecida, orientação, ensinamentos e principalmente pela grande amizade e respeito. Obrigada!

Aos professores Dr. Sérgio Marangoni, Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck e a Dra. Gláucia Coelho de Mello pela participação no exame de qualificação.

Aos Professores Ilka Maria Vasconcelos, Sérgio Marangoni, Ricardo Aparício e José Tadeu Abreu de Oliveira, por participarem da banca examinadora desta dissertação, valorizando assim o meu trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra e Neide Graciano Zério do Departamento de Entomologia/ESALq-USP, pela participação nesse trabalho.

Aos meus queridos amigos que contribuíram de forma direta ou indireta na realização desse trabalho. Obrigada.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela colaboração e ensinamentos que enriqueceram o meu trabalho.

A todo pessoal do Laboratório de química de proteínas (LAQUIP) e em especial ao Paulo Baldasso por todo apoio e ajuda nos momentos de dificuldades.

A minha querida amiga Vanessa pela amizade, companheirismo e apoio em todos os momentos difíceis. Obrigada pela amizade!

A toda minha família pelo amor, dedicação e cooperação.

As Agências de Fomento: Capes, CNPq, FINEP e FUNDECT.

ÍNDICE

ABREVIACÕES	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
I - INTRODUÇÃO	1
1 - Proteínas tóxicas de plantas	3
2 - Inibidores de proteinases de plantas	3
3 - Características gerais dos inibidores de proteinases de plantas	6
4 - Classes de inibidores de proteinases	7
5 - Morfofisiologia da digestão de insetos	8
5.1 - Enzimas digestivas de insetos	10
6 - Adaptações dos insetos aos inibidores de proteinases	11
7 - Biotecnologia vegetal	12
II - OBJETIVOS	15
III - MATERIAL	16
1 - Espécie vegetal	16
2 - Insetos (<i>Anticarsia gemmatalis</i> e <i>Anagasta kuehniella</i>)	18
IV - MÉTODOS	20
1- Extração e purificação do inibidor de <i>Adenantha pavonina</i> (ApTI)	20
1.1 - Obtenção do extrato bruto	20
1.2 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75	21
1.3 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose	21
1.4- Cromatografia de afinidade em Sepharose-Tripsina	21
2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS	22
3 - Quantificação de proteína	22
4 - Preparações dos intestinos médio: Ensaio <i>in vitro</i>	22
5 - Bioensaio: Ensaio <i>in vivo</i>	22
6 - Efeito de ApTI na sobrevivência, peso e parâmetros nutricionais de larvas de 4º instar de <i>A. gemmatalis</i> e <i>A. kuehniella</i>	23
7 - Efeito de ApTI no desenvolvimento de <i>A. kuehniella</i>	24
8 - Obtenção das enzimas do fluído intestinal das larvas de <i>A. gemmatalis</i> e <i>A.</i>	24

<i>kuehniella</i>	
9 - Preparação das fezes	25
10 - Determinação da atividade enzimática do tipo tripsina	25
11 – Avaliação de inibição das proteinases larvais após a ingestão de ApTI	26
12 - Análise eletroforética das enzimas das larvas de <i>A. gemmatalis</i> e <i>A. kuehniella</i>	26
13 - Análise estatística	27
V - RESULTADOS	28
1 - Purificação do inibidor ApTI de sementes de <i>A. pavonina</i>	28
2 - Eficiência <i>in vitro</i> de ApTI	29
3 - Efeito de ApTI na sobrevivência das larvas de 4º instar de <i>A. gemmatalis</i> e <i>A. kuehniella</i>	30
4 - Efeito de ApTI no peso das larvas de 4º instar de <i>A. gemmatalis</i> e <i>A. kuehniella</i>	32
5 - Análise do consumo e utilização de alimento	35
6 - Parâmetros nutricionais	39
7 - Ação de ApTI na atividade enzimática de <i>A. gemmatalis</i> e <i>A. kuehniella</i>	40
8 - Inibição da atividade trípica das larvas após a ingestão de ApTI	44
9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS contendo 0,1% de gelatina	46
10 - Efeito de ApTI no desenvolvimento de <i>A. kuehniella</i>	48
VI - DISCUSSÃO	52
VII - CONCLUSÕES	58
VIII - REFERÊNCIA	59

ABREVIACÕES

- AD** - digestibilidade aproximada
- AeTI**- inibidor de tripsina de *Archidendron ellipticum*
- BAPNA** - *N*- α Benzoyl-D-L-Arginine p-Nitroanilide
- Bt** - *Bacillus thuringiensis*
- CaTI** - inibidor de tripsina de grão-de-bico
- CpTI** - inibidor de tripsina de feijão
- CM** - custo metabólico
- DEAE** - dietilaminoetil
- EB** - extrato bruto
- ECD** - eficiência de conversão do alimento digerido
- ECI** - eficiência de conversão do alimento ingerido
- IM** - intestino médio
- IP** - inibidor de proteinase
- PAGE** - eletroforese em gel de poliacrilamida
- ApTI** - inibidor de tripsina de *Adenantha pavonina*
- RIP** - proteína inativadora de ribossomo
- SDS** - dodecil sulfato de sódio
- SKTI** - inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz
- TI** - inibidor de tripsina
- TLCK** - *N*- α -tosyl-L-lysine chromomethyl ketone
- TRIS** - hidroximetil aminometano

RESUMO

As sementes são ricas fontes de inibidores de proteinases, que prejudicam sua qualidade nutricional, reduzindo a digestibilidade das proteínas e sua absorção. Neste estudo, um inibidor de tripsina (ApTI) foi purificado a partir de sementes de *Adenantha pavonina* e testado seu efeito no crescimento e desenvolvimento de dois lepidópteros. Larvas de *Anagasta kuehniella* alimentadas com ApTI 1% mostraram redução de 50% na sobrevivência e no peso médio. Larvas de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com dieta contendo ApTI 0,5% apresentaram diminuição de 31% na sobrevivência e de 22% no peso médio. O tempo de desenvolvimento larval e pupal de *Anagasta kuehniella* alimentadas com a dieta contendo ApTI 1% foi maior, enquanto a porcentagem de adultos sobreviventes diminuiu em relação ao grupo controle. A avaliação nutricional de ApTI sobre o desenvolvimento larval de *A. kuehniella* mostrou redução na eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e alimento digerido (ECD), e aumento na digestibilidade aproximada (AD) e no custo metabólico (CM). Em relação as larvas de *A. gemmatalis*, não houve efeito na (ECI), porém foi observado redução na (ECD) e aumento na (AD) e no (CM). Para examinar o efeito *in vivo* de ApTI sobre os insetos, as atividades das proteinases intestinais das larvas que se alimentaram com dietas livres do inibidor e contendo o inibidor a 0,25 - 1% foram comparadas através de ensaios enzimáticos e eletroforese em gel de atividade enzimática. Larvas de quarto instar de *A. kuehniella* alimentadas com dieta contendo ApTI 1% apresentaram diminuição na atividade trípica do intestino e manutenção dessa nas fezes. Larvas de *A. gemmatalis* alimentadas em dieta contendo ApTI 0,5% mostraram diminuição da atividade trípica do intestino e das fezes. Estes resultados sugerem que ApTI possui efeitos anti-metabólicos quando ingeridos por *A. kuehniella* e *A. gemmatalis*.

ABSTRACT

Seeds are a major source of proteinase inhibitors, which cause nutrition quality damage and reduce the absorption and digestibility of proteins. In this study, a trypsin inhibitor (ApTI) was purified from *Adenanthera pavonina* seeds and their effect on growth and development tested in two Lepidoptera. *Anagasta kuehniella* larvae were fed with ApTI 1% showing a significant decrease in survival and larval weight (50%). *A. gemmatalis* fed with 0.5% ApTI showed a survival of 31% and decrease in weight of 22%, when compared with the control group. Larval and pupal developmental time of *Anagasta kuehniella* larvae, fed on an ApTI diet at 1% was significantly longer, and the percentage of surviving adults decreased. The nutritional effect of ApTI on *A. kuehniella* larval development was to decrease the conversion of ingested food (ECI) and digested food (ECD) efficiency, and increase estimated digestibility (AD) and metabolic cost (CM). ApTI had no effect on *A. gemmatalis* conversion of ingested food efficiency. However, a decrease in the conversion of digested food efficiency (ECD) and increase in estimated digestibility (AD) and metabolic cost (CM) were observed. Enzymatic assays and electrophoreses were performed in order to evaluate the *in vivo* ApTI effect of larval intestinal proteinase activities between those that were not fed with the inhibitor and those fed with inhibitor (0.25 - 1%). *A. kuehniella* four instars larvae fed with 1% ApTI showed a reduction in intestinal tryptic activity and maintenance of feces tryptic activity. *A. gemmatalis* fed with 0.5% ApTI suffered a reduction in intestinal and feces tryptic activities. These results suggest that ApTI presents considerable anti-metabolic effects in *A. kuehniella* and *A. gemmatalis*.

I - INTRODUÇÃO

A população mundial vem registrando, através dos anos, um crescimento bastante significativo. Segundos dados da FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação), no final da década de 60, eram cerca de 3,3 bilhões de pessoas no planeta, passando para 4,0 bilhões no final dos anos 70 e para 4,8 bilhões no final dos anos 80. No início deste milênio, a população atingiu 6,2 bilhões, sendo que as estimativas para a atualidade indicam 6,6 bilhões. As estimativas apontam ainda para o ano de 2015 uma população de 7,2 bilhões, para 2030, 8,1 bilhões, chegando a 8,9 bilhões em 2050 (<https://www.fao.org.br/>). A preocupação passa a ser com respeito à produção de alimentos e fibras para atender a essa demanda. Segundo as estatísticas, a produção mundial de cereais, em 2005, foi cerca de 2,22 bilhões de toneladas. A demanda estimada para 2025 é de 3,14 bilhões de toneladas, o que significa uma produção adicional necessária de 920 milhões de toneladas (SCOLARI, 2007).

Com a explosão populacional e redução na disponibilidade de terras para cultivo em países pobres, há uma tendência em substituir a proteína animal do alimento por proteína de origem vegetal, a qual possui um custo menor. As proteínas podem corresponder a mais de 40% do peso seco das sementes de alguns legumes. Porém, a produtividade na agricultura pode ser reduzida em torno de 45% pela perda, antes ou depois da colheita devido ao ataque de uma variedade de pragas, como os insetos, nematóides e fungos, doenças causadas por vírus e bactérias, e competição por ervas daninhas (OERKE *et al.*, 1994; CARLINI *et al.*, 2002). Durante o armazenamento fungos podem atacar sementes de diversas culturas (SCHUCH *et al.*, 2006). No caso da soja a perda anual causada por fungos e bactérias pode representar 20% (<http://www.cnpso.embrapa.br>). O controle químico de pragas de culturas agrícolas é atormentado com problemas como a resistência a inseticidas e a contaminação ambiental (CLARK & YAMAGUCHI, 2002, LI *et al.*, 2003, 2008). Estratégias alternativas à utilização de inseticidas convencionais necessitam ser desenvolvidas, dentre elas destaca-se a utilização de inibidores vegetais de enzimas digestivas.

Os inibidores de proteinases (IPs) são geralmente encontrados como componentes constitutivos dos tecidos de armazenamento, tais como, sementes e tubérculos ou expressas em resposta ao ataque de pragas e agentes patogênicos (RYAN, 1990). São capazes de inibir as enzimas proteolíticas, competindo com os substratos pelo sítio ativo das enzimas de diferentes fontes, incluindo proteinases digestivas de mamíferos e insetos, bem como de bactérias e enzimas fúngicas (CLEMENTE & DOMONEY, 2006).

Em sementes, os IPs mantêm processos fisiológicos, tais como: regulação dos níveis de proteinases endógenas (CHYE *et al.*, 2006), proteínas de armazenamento (MANDAL *et al.*, 2002), estabilidade das enzimas durante a fase de dessecação (LAM *et al.*, 1999), proteção contra pragas (HAQ *et al.*, 2004) e microorganismos invasores (MOSOLOV & VALUEVA, 2006). Os IPs também participam na regulação da morte celular programada (SOLOMON *et al.*, 1999) e foi demonstrado que seus níveis de expressão aumentam em resposta a vários estresses abióticos (CASARETTO *et al.*, 2004) e estresses bióticos, principalmente na defesa contra insetos pragas (DE VOS *et al.*, 2006). Além disso, os IPs também desempenham um papel vital no tratamento de patologias humanas, tais como inflamação, hemorragia (OLIVA *et al.*, 2000) e câncer (KENNEDY, 1998). O provável papel dos inibidores na defesa vegetal foi investigado em 1947, quando MICKEL & STANDISH observaram que as larvas de certos insetos não eram capazes de se desenvolverem normalmente sobre produtos de soja (HAQ *et al.*, 2004).

Apesar de inúmeros estudos *in vitro* identificarem inibidores de proteinases em diferentes famílias de plantas e seus efeitos sobre as enzimas digestivas de insetos, os efeitos *in vivo* nem sempre correspondem com os testes *in vitro* (ABDEEN *et al.*, 2005; GIRARD *et al.*, 1998a; GIRI *et al.*, 1998; TELANG *et al.*, 2005). Um dos problemas da utilização de inibidores de proteinases na proteção de culturas, no entanto, é que algumas pragas não mostram os efeitos adversos esperados causados pela presença dos inibidores em suas dietas (PURCELL *et al.*, 1992).

BROADWAY & DUFFEY (1986), demonstraram que um aumento na atividade das proteinases do intestino é uma das estratégias dos insetos para lidar com a presença de inibidores de proteinases em suas dietas. Um olhar mais atento para a adaptação de insetos aos inibidores foi feita mais tarde usando *Spodoptera exigua* e inibidor de proteinase de batata (PPI) II (JONGSMA *et al.*, 1995). Eles observaram que as larvas de *S. exigua* são capazes de se adaptar aos inibidores de proteinases, induzindo atividade de proteinases do intestino que é insensível aos inibidores. Desde então, a adaptação a inibidores tem atraído o interesse de diversos pesquisadores, que visam à compreensão do mecanismo de adaptação, em última instância, conceber melhores estratégias para utilizar os inibidores de proteinases na proteção das culturas (BROADWAY & VILLANI, 1995; BOLTER & JONGSMA, 1995; BRITO *et al.*, 2001). Devido a esse fato, há a necessidade de testes que possam indicar os inibidores mais eficientes para cada praga (HAQ *et al.*, 2004).

1- Proteínas tóxicas de plantas

As plantas desenvolveram mecanismos complexos para se protegerem contra insetos e patógenos (HARTMANN, 2004). Os insetos devem contornar barreiras defensivas, a fim de colonizar com sucesso uma determinada planta hospedeira (LASKOWSKI & KATO, 1980).

No sistema de co-evolução da interação planta-inseto, as plantas são capazes de sintetizar uma gama de moléculas para defendê-las contra o ataque de insetos. Os inibidores ativos contra as enzimas proteolíticas de insetos estão entre essas moléculas (DE LEO *et al.*, 2001).

Os inibidores são de ocorrência muito comum, eles têm sido isolados e caracterizados de um grande número de organismos, incluindo animais, microorganismos e plantas (VALUEVA & MOSOLOV, 2004; CRISTELLER, 2005; HAQ *et al.*, 2004; SURUPAM, *et al.*, 2002; MOSOLOV & VALUEVA, 2005; MOSOLOV *et al.*, 2001), onde são encontrados inibidores para quase todos os tipos de enzimas proteolíticas (FAN & WU, 2005; SAMPAIO *et al.*, 1996).

Os Inibidores concentram-se principalmente nos órgãos de reserva, tais como sementes e tubérculos, mas já foram detectados nas partes aéreas das plantas (DE LEO *et al.*, 2002). Um número crescente de inibidores também é encontrado em tecidos que não são de reserva, tais como folhas, flores e raízes (BRZIN & KIDRIC, 1995; XU *et al.*, 2001; SIM & CHYE, 2004).

Os tecidos das sementes podem acumular constitutivamente ou após indução uma ampla variedade de compostos de defesa que conferem resistência contra predadores fitófagos e infecção por vírus, bactérias, fungos, nematóides, etc. As proteínas de plantas mais conhecidas supostamente envolvidas no mecanismo de defesa de plantas são as lectinas, RIPs (Proteínas Inativadoras de Ribossomo) do tipo I e II, glicohidrolases, arcelinas (OSBORN *et al.*, 1988), quitinases (COHEN, 1993), canatoxinas (CARLINI & UDEDIBIE, 1997), formas modificadas de proteínas de reserva (SALES *et al.*, 2000) e os inibidores de enzimas proteolíticas – IPs (RYAN, 1990; CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; MACEDO *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2006).

Para um eficiente manejo de controle de pragas através do uso de inibidores, é imprescindível saber o tipo de enzima presente no intestino dos insetos e pragas (HAQ *et al.*, 2004).

2 - Inibidores de proteinases de plantas

Os inibidores de proteinases (IPs) são naturalmente produzidos pelas plantas e estão relacionados ao mecanismo de defesa delas a herbivoria. Seus níveis em folhas são extremamente

baixos e podem ser rapidamente elevados quando a planta é danificada pelo inseto ou mediante a liberação de elicitores (RAKWAL *et al.*, 2001). Além da resposta local, foi verificado que sinais específicos originários dos tecidos danificados são transportados via floema, acarretando aumento nos níveis de inibidores de proteinase por toda planta, caracterizando esta resposta como sistêmica (JONGSMA & BOLTER, 1997).

Alguns IPs foram encontrados e isolados de órgãos de armazenamento de plantas como sementes, tubérculos e endosperma (ZHANG *et al.*, 2008), onde são encontrados inibidores para quase todos os tipos de enzimas proteolíticas (SAMPAIO *et al.*, 1996; FAN & WU, 2005). A maioria dos inibidores de proteinases foi isolado e caracterizado a partir de sementes de leguminosas, Cucurbitaceae, Solanaceae, e Gramineae (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1987). Outras famílias onde inibidores de proteinases foram purificadas e caracterizados incluem as famílias Rutaceae (SHEE & SHARMA, 2007; SHEE *et al.*, 2007a, b) e Euphorbiaceae (SRITANYARAT *et al.*, 2006).

Os IPs geralmente não são diretamente tóxicos para herbívoros, mas reduzem a eficiência digestiva em utilizar proteínas de plantas para o crescimento e desenvolvimento. Diferentes insetos dependem de diversas classes de proteinases para sua digestão, dependendo do pH do intestino. Os lepidópteros são conhecidos por terem pH com níveis variando de 8 a 11 e empregam principalmente serino endopeptidases para a digestão. É bem estabelecido que os IPs específicos de serino endopeptidases podem assim, reduzir a taxa de crescimento e sobrevivência dos insetos lepidópteros (ABDEEN *et al.*, 2005; DE LEO *et al.*, 2001a; RANJEKAR *et al.*, 2003; ZAVALA *et al.*, 2004).

MICKEL & STANDISH (1947), observaram o papel de produtos da soja na proteção de culturas, onde o inibidor de tripsina de soja mostrou ser tóxico a larvas de *Tribolium confusum*. Após estes estudos preliminares, existem inúmeros exemplos de inibidores de proteinases ativos contra certas espécies de insetos (Tabela 1), tanto em ensaios *in-vitro* nos quais inibem as proteinases do intestino dos insetos, como *in-vivo*, utilizados em dietas artificiais (ASHOURI *et al.*, 1998; FRANCO *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2005).

Tabela 1- Inibidores vegetais testados contra insetos-praga

Inibidor	Inseto alvo	Referência
Inibidor de Feijão (CpTI)	<i>Lacanobia oleracea</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	GATEHOUSE <i>et al.</i> , 1999
Inibidor de tripsina de soja	<i>Lacanobia oleracea</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	GATEHOUSE <i>et al.</i> , 1999
Inibidor de tripsina de soja	<i>Diatraea sacharallis</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	POMPERMAYER <i>et al.</i> , 2001
Inibidor de tripsina de soja	<i>Spodoptera littoralis</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	MARCHETTI <i>et al.</i> , 2000
Inibidor de tripsina de <i>Leucaena leucocephala</i>	<i>Heliothis armigera</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	NANDEESHA & PRASAD <i>et al.</i> , 2001
Inibidor de cisteína de arroz	<i>Callosobruchus chinensis</i> (Coleoptera: Bruchidae)	KURODA <i>et al.</i> , 1996
Inibidor de cisteína de arroz	<i>Riptortus clavatus</i> (Heteroptera: Coreidae)	KURODA <i>et al.</i> , 1996
Inibidor de cisteína de Soja	<i>Callosobruchus maculatus</i> (Coleoptera: Bruchidae)	KOIWA <i>et al.</i> , 1998
Inibidor de tripsina de <i>Dimorphandra mollis</i>	<i>Callosobruchus maculatus</i> (Coleoptera: Bruchidae)	MACEDO <i>et al.</i> , 2002
Inibidor de tripsina de <i>Peltophorum dubium</i>	<i>Anagasta kuehniella</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	MACEDO <i>et al.</i> , 2003
Inibidor de tripsina de <i>Adenanthera pavonina</i>	<i>Callosobruchus maculatus</i> (Coleoptera: Bruchidae)	MACEDO <i>et al.</i> , 2004
Inibidor de <i>Momordica charantia</i>	<i>Heliothis armigera</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	TELANG <i>et al.</i> , 2003
Inibidor de tripsina de <i>Platimonia foliolosa</i>	<i>Anagasta kuehniella</i> (Lepidoptera: Pyralidae)	RAMOS <i>et al.</i> , 2008
Inibidor de cisteína de arroz	<i>Phaedon cochleariae</i> (Coleoptera:Chrysomelidae)	GIRARD <i>et al.</i> , 1998 ^a
Inibidor de Bowman-Birk	<i>Phaedon cochleariae</i> (Coleoptera:Chrysomelidae)	GIRARD <i>et al.</i> , 1998a

Adaptado de KUBO, 2007.

Os inibidores de proteinases por serem produtos primários, se tornam excelentes candidatos para a engenharia genética da resistência de plantas a insetos (BOULTER, 1993). Genes de inibidores de plantas são particularmente promissores, tendo sido primeiramente demonstrado por HILDER *et al.* (1987) através da transferência de um gene de inibidor de proteinase de *Vigna unguiculata* para plantas de fumo, o qual conferiu resistência a uma ampla variedade de insetos, incluindo Lepidópteros como *Heliothis* e *Spodoptera*, Coleópteros como *Diabrotica* e *Anthonomus*, e Ortópteros como *Locusta migratoria*. Após esses estudos anteriores demonstrando sucesso na resistência de plantas através da engenharia genética, diversos outros IPs de plantas têm sido estudados. Entretanto, para se obter sucesso com a utilização de IPs é necessário conhecer o perfil digestório do inseto, saber quais tipos enzimáticos estão presentes.

3 - Características gerais dos inibidores de proteinases de plantas

As informações científicas sobre a composição química de sementes tropicais são úteis para a compreensão de sua fisiologia e obtenção de novos produtos a partir de reservas estocadas como as proteínas, que correspondem em média de 20 a 30% do peso seco das sementes de leguminosas, embora existam exceções como as sementes de soja que podem chegar a 40% (VITALE & BOLLINI, 1995).

Dentre as várias classes funcionais das proteínas encontradas nas sementes de leguminosas, destacam-se os inibidores de proteinases. Essas moléculas compreendem de 1 a 15% do conteúdo de proteínas totais e são consideradas metabólitos importantes, podendo atuar no mecanismo de defesa contra insetos e patógenos, como fonte de aminoácidos sulfurados na regulação de proteinases endógenas e como sinais de respostas às condições ambientais (CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; BHATTACHARYYA *et al.*, 2006; RAMESHWARAM & NADIMPALLI, 2008; WITITSUWANNAKUL *et al.*, 2008; KONAREV *et al.*, 2008).

Os inibidores proteolíticos são proteínas que interagem específica e reversivelmente com diferentes enzimas proteolíticas, promovendo sua inibição por meio da competição com o substrato pelo sítio ativo da enzima (RICHARDSON, 1991; LASKOWSKI JR. & QASIM, 2000; LINGARAJU & GOWDA, 2008). Desta forma, essas proteínas são classificadas de acordo com a sua especificidade de interação e podem afetar a atividade das serinoproteinases, cisteinoproteinases, asparticoproteinases e metaloproteinases, que compreendem as grandes classes de enzimas proteolíticas (RICHARDSON, 1991; TREMACOLDI & PASCHOLATI, 2004).

A massa molecular dos IPs varia entre 6 e 50 kDa e a grande maioria deles apresenta entre 70 e 90 resíduos de aminoácidos. Aqueles de massa molecular relativamente alta apresentam-se na forma polimérica, associados em dímeros ou tetrâmeros, cujos monômeros possuem uma massa molecular de aproximadamente 10 kDa (RICHARDSON, 1991; BLANCO-LABRA *et al.*, 1995).

Esses inibidores são considerados moléculas estáveis, podendo apresentar variações de temperatura e de pH e à proteólise por proteinases diferentes daquelas não inibidas por eles. Esta estabilidade tem sido atribuída em parte às pontes dissulfeto e outras interações não covalentes (BELITZ & WEDER, 1990).

4 - Classes de inibidores de proteinases

Atualmente, 10 famílias de IPs de plantas são reconhecidas com base na estrutura primária da proteína (LASKOWSKI & KATO, 1980; RICHARDSON, 1991; DE LEO *et al.*, 2002). O mais conhecido grupo dos inibidores de enzima de sementes são os que afetam as atividades de serinoproteinases como a tripsina, quimotripsina e subtilisina (RICHARDSON, 1991). Os inibidores de serinoproteinases de plantas são agrupados em famílias distintas: Kunitz, Bowman-Birk, batata I e II, abóbora, superfamília cereal, rafi 1-2 e taumatina-proteínas relacionadas à patogênese (RICHARDSON, 1991).

Os inibidores de serinoproteinases são encontrados no reino vegetal e têm sido descritos em várias espécies vegetais. O número conhecido e parcialmente caracterizado de inibidores é enorme, representando a classe mais estudada (HAQ *et al.*, 2004). Seus papéis fisiológicos incluem a regulação de proteinases endógenas durante a dormência das sementes, mobilização de proteínas de reserva e proteção contra enzimas proteolíticas de parasitas e insetos (HAQ *et al.*, 2004).

Sementes de leguminosas são particularmente ricas em IPs do tipo Kunitz e Bowman Birk, sendo as duas famílias melhores caracterizadas. Essas famílias diferem principalmente na massa molecular, conteúdo de ligações dissulfetos, estrutura tridimensional e estabilidade ao calor e a agentes desnaturantes (TELES *et al.*, 2004).

Os inibidores tipo Kunitz são proteínas de aproximadamente 20 kDa que contêm quatro resíduos de cisteína formando duas pontes dissulfeto e possuem 1 único sítio reativo (um resíduo de arginina), localizado em uma das alças da proteína (RICHARDSON, 1991). Inibidores do tipo

Bowman Birk, por outro lado, possuem massa molecular em torno de 8-10 kDa, com alto teor de cisteína e 2 sítios reativos (RICHARDSON, 1991).

Inibidores de cisteinoproteinases, denominadas de cistatinas ou fitocistatinas, é a segunda maior classe de inibidores identificadas e estudadas em plantas. Fontes desses inibidores são: feijão (FERNANDES *et al.*, 1993), batata (WALDRON *et al.*, 1993), repolho (LIM *et al.*, 1996), cenoura (OJIMA *et al.*, 1997) arroz (ABE *et al.*, 1987), trigo (KURODA *et al.*, 2001), milho (ABE *et al.*, 1995), soja (MISAKA *et al.*, 1996). Plantas expressando inibidores desse tipo apresentam excelentes resultados, provavelmente pelo fato de que a maioria dos insetos possui essas proteinases em seu sistema digestivo (HAQ *et al.*, 2004).

Inibidores de asparticoproteinases são relativamente menos estudados, provavelmente, isso é devido a sua rara ocorrência. Tubérculos de batata possuem um inibidor de asparticoproteinase, denominado Catepsina D (MARES *et al.*, 1989; FAN & WU, 2005), que compartilha considerável similaridade na seqüência de aminoácidos com o inibidor de tripsina de soja SKTI. Catepsina D é o único inibidor de asparticoproteinase bem caracterizado de origem protéica.

Inibidores de metaloproteinases em plantas são representados pela família de inibidores metalo-carboxipeptidases em tomate (RANCOUR & RYAN, 1968; FAN & WU, 2005) e batata (GRAHAM & RYAN, 1981; FAN & WU, 2005).

Estudos anteriores sobre o padrão de distribuição de IPs entre as sementes de árvores de leguminosas sugerem claramente uma relação evolutiva entre IPs e a família e as subfamílias das leguminosas (NORIOKA *et al.*, 1988, MACEDO *et al.*, 2000).

5 - Morfofisiologia da digestão de insetos

Os insetos utilizam seu sistema digestivo para extrair nutrientes e outras substâncias do alimento por eles consumido. A maior parte do alimento é ingerido na forma de macromoléculas e outras substâncias complexas, tais como proteínas, polissacarídeos, gorduras e ácidos nucléicos, que precisam ser quebradas por meio de reações hidrolíticas em moléculas menores, como aminoácidos, açúcares simples, etc), no processo digestivo, antes de serem usadas pelas células do corpo para obtenção de energia, crescimento ou reprodução (MEYER, 2006).

As enzimas digestivas dos insetos são as hidrolases, que mostram semelhanças gerais com enzimas de mamíferos e estão de acordo com as reações que catalisam (APPLEBAUM, 1985; TERRA & FERREIRA 1994; TERRA *et al.*, 1996a).

A maioria dos estudos sobre os processos digestivos em insetos sugere que eles poderiam ser agrupados de acordo com o tipo de dieta ingerida. Esta hipótese é devido à ocorrência de diferentes proteinases digestivas no canal alimentar, que dependem principalmente da composição química da dieta ingerida. Conseqüentemente, a adaptação ao hábito alimentar é mais importante que as características filogenéticas, determinando assim os tipos e não as quantidades relativas das enzimas presentes no inseto (TERRA & FERREIRA, 1994).

A Figura 1 ilustra o canal alimentar de um lepidóptero, proposto por TERRA & FERREIRA (1994). O intestino anterior é constituído pela boca (onde são encontradas as glândulas salivares quando presentes em sua cavidade), faringe, esôfago e o papo. O proventrículo é um órgão de trituração em alguns insetos e, em muitos deles, atua como uma válvula que controla a entrada do alimento na porção do intestino médio, que é o local principal da digestão e absorção de nutrientes.

O intestino médio consiste de um tubo simples (ventrículo) que pode sofrer ramificações, dando origem ao ceco gástrico ou intestinal. Na maioria dos insetos, o intestino médio é revestido por uma estrutura quitinosa, a membrana peritrófica, que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico. Na região do esfíncter, separando o intestino médio do posterior, os órgãos de excreção que se ramificam lateralmente são os túbulos de Malpighi. O intestino posterior inclui o íleo e o reto, envolvidos na absorção de água e íons, terminando no ânus.

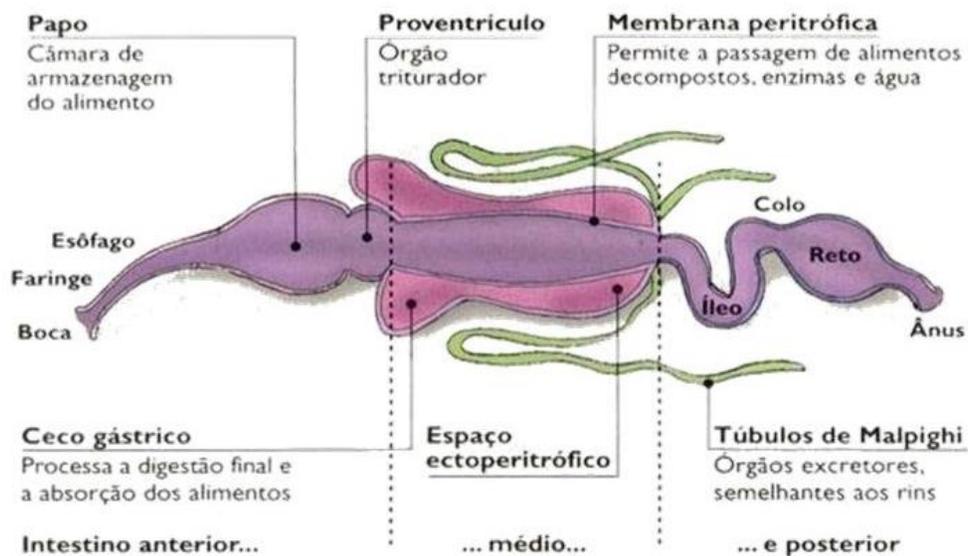


Figura 1 - Diagrama geral de intestino de inseto lepidóptero (adaptado de TERRA & FERREIRA, 1994).

A membrana peritrófica é uma estrutura anatômica em torno do bolo alimentar na maioria dos insetos, com a notável exceção dos Hemiptera e Thysanoptera, que têm no lugar uma membrana de lipídio (KITAJIMA, 1975; LANE & HARRISON, 1979).

As principais funções atribuídas à membrana peritrófica são: proteção contra danos mecânicos, uma barreira física contra microorganismos, compartimentalização dos eventos digestivos atuando como uma barreira de seletividade para enzimas digestivas e produtos da digestão e no mecanismo de conservação enzimática (PETERS, 1992; LEHANE, 1997; TERRA, 2001).

Segundo TERRA & FERREIRA (1994), vários estudos vêm sendo realizados na ânsia de determinar os valores de pH nas diferentes regiões da estrutura digestiva, confirmando a correlação entre o pH ótimo da enzima e pH do lúmen de insetos, pois as variações de pH afetam a atividade das enzimas digestivas.

Enquanto a maioria dos lepidópteros e insetos dípteros possui intestino médio alcalino e uso de serino proteinases para degradar proteínas do alimento, muitos insetos coleópteros têm intestino médio ligeiramente ácido e utilizam proteinases digestivas como sua principal enzima (MURDOCK *et al.*, 1987; TERRA & FERREIRA, 1994).

A compartimentalização das enzimas é outra propriedade importante. Aquelas envolvidas na digestão inicial são encontradas no espaço endoperitrófico, o qual é envolvido pela membrana peritrófica (TERRA & FERREIRA, 1994). Portanto, a integridade desta membrana quando afetada pode interferir no processo de digestão e absorção de nutrientes e, conseqüentemente, causar danos no desenvolvimento do inseto (SHEWRY & LUCAS, 1997; HABIBI *et al.*, 2000; PAES *et al.*, 2000).

5.1 - Enzimas digestivas de insetos

Proteinases digestivas de insetos podem ser classificadas como serinoproteinases, cisteinoproteinases, asparticoproteinases e metaloproteinases (TERRA & FERREIRA, 1994). Elas catalisam a liberação de peptídeos e aminoácidos das proteínas da dieta alimentar de insetos, para satisfazer suas necessidades nutricionais e são classificadas de acordo com seu mecanismo de catálise e o aminoácido presente no centro ativo: (1) Serinoproteinase, com uma serina e histidina; (2) Cisteinoproteinase, com uma cisteína; (3) Asparticoproteinase, com o aspartato, e (4) Metaloproteinase, com um íon metálico (Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+}) (NEURATH, 1984; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002).

As duas principais classes de proteinases no aparelho digestivo de insetos fitófagos são as serinoproteinases e cisteinoproteinases (MURDOCK *et al.*, 1987). Muitos lepidópteros têm as serinoproteinases como principais enzimas digestivas, enquanto que em espécies de coleópteros têm uma ampla variedade de proteinases dominante no intestino (BOULTER, 1993, CHRISTELLER *et al.*, PURCELL *et al.*, 1992).

Dentre as serinoproteinases, destacam-se as tripsinas e quimotripsinas, que são importantes enzimas digestivas presentes praticamente em todos os organismos vivos (GEOFFROY *et al.*, 1990). Para os insetos, elas são responsáveis por cerca de 95% da proteólise (JOHNSTON, 1995).

As enzimas do tipo tripsina clivam cadeias protéicas, preferencialmente, na região carboxi-terminal de aminoácidos básicos como lisina ou arginina. Essas enzimas foram caracterizadas em diversas ordens de insetos de interesse econômico como Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera e Thysanura (TERRA & FERREIRA, 1994).

As quimotripsinas são enzimas que clivam cadeias protéicas, preferencialmente, em aminoácidos aromáticos, na região carboxi-terminal. As quimotripsinas, assim como as tripsinas, apresentam uma taxa similar de distribuição entre os insetos. Também apresentam algumas similaridades com as quimotripsinas dos vertebrados (WARD, 1975; JANY *et al.*, 1978 e 1983).

A especificidade das tripsinas de insetos contrasta, em algumas características, com aquelas dos vertebrados (LE MOS & TERRA, 1992; JOHNSTON *et al.*, 1995). As tripsinas dos insetos não necessitam da presença de íons cálcio para serem ativadas ou estabilizadas, ao contrário dos vertebrados. PURCELL *et al.* (1992) destacaram que as tripsinas dos insetos são sensíveis aos inibidores, enquanto as tripsinas dos vertebrados apresentam menos sensibilidade.

6 - Adaptações dos insetos aos inibidores de proteinases

Vários trabalhos têm demonstrado a utilização de inibidores de proteinases como uma estratégia eficiente no controle de pragas (DUAN *et al.*, 1996; GATEHOUSE *et al.*, 1997; HILDER *et al.*, 1987; MACEDO *et al.*, 2004; FAN & WU, 2005; PILON *et al.*, 2006). Entretanto, até o presente momento foram identificados três mecanismos capazes de proporcionar a aclimação dos insetos aos inibidores de suas plantas hospedeiras.

O primeiro mecanismo consiste em um aumento da expressão da enzima inibida. BROADWAY & DUFFEY (1986) mostraram que não há redução da atividade proteolítica das enzimas digestivas de *Spodoptera exigua* e *Heliothis zea*, o que ocorre é a superprodução da

enzima sensível ao inibidor de proteinase. Resultados semelhantes foram obtidos por MCMANUS & BURGESS (1995) e BROADWAY (1997).

O segundo mecanismo utilizado pelos insetos é baseado na síntese e/ou secreção de proteinases menos sensíveis ao inibidor. BOLTER & JONGSMA (1995) observaram que *Leptinotarsa decemlineata*, quando criada em dieta à base de plantas de batata, apresentaram aumento de uma atividade trípica insensível ao inibidor de cerca de duas vezes quando comparadas aos insetos controle.

O terceiro mecanismo adaptativo consiste na inativação de inibidores das plantas pelas próprias proteinases presentes no lúmen intestinal dos insetos. GIRI *et al.* (1998) observaram que *Helicoverpa armigera*, além de ser capaz de produzir enzimas insensíveis ao inibidor, sintetizou proteinases capazes de degradar os inibidores de sementes de *Cicer arietinum*. O mesmo mecanismo foi encontrado por GIRARD *et al.* (1998) no trato digestivo de *Phaedon cochleariae*.

Considerando essas respostas dos insetos, a eficácia de um inibidor contra um determinado inseto está relacionada ao seu nível de expressão na planta, sua atividade em relação às proteinases do inseto e a capacidade do inseto alvo em superar suas ingestões (DE LEO *et al.*, 2001). Apesar dos inibidores não apresentarem a mesma eficiência para todos os insetos, BALDWIN & PRESTON (1999) propuseram que os inibidores são eficientes e participam da defesa direta das plantas, mas sua eficiência depende de um conjunto de fatores abióticos e de outros componentes de defesa secundários (produção de metabólitos). Na natureza, esse conjunto de fatores completaria a tolerância das plantas aos insetos.

7 - Biotecnologia vegetal

Para limitar os efeitos nocivos das moléculas sintéticas sobre o ambiente e a saúde humana, a engenharia genética de plantas tem sido proposta como uma das alternativas para criar plantas resistentes a insetos. Numerosas plantas transgênicas, expressando proteínas inseticidas de diversas origens, foram assim concebidas (GATEHOUSE & GATEHOUSE, 1998; JOUANIN *et al.*, 1998; CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002; RANJEKAR *et al.*, 2003).

Entre as proteínas que exibem efeitos inseticidas provenientes de plantas, inibidores de proteinases surgiram como uma estratégia interessante para o controle de pragas de insetos (REECK *et al.*, 1997; LAWRENCE E KOUNDAL, 2002). Vários inibidores de serino e cisteinoproteinases pertencentes a diferentes famílias foram expressos em plantas transgênicas para melhorar a sua resistência contra lepidópteros (HILDER *et al.*, 1987; DE LEO *et al.*, 2001;

FALCO E SILVA-FILHO, 2003) e coleópteros (LECARDONNEL *et al.*, 1999; ALFONSO-RUBI *et al.*, 2003).

Outra alternativa são as toxinas inseticidas produzidas em plantas transgênicas pela bactéria do solo *Bacillus thuringiensis* (Bt). Cepas de Bt mostram diferentes especificidades na atividade inseticida contra pragas e constituem um grande reservatório de genes que codificam proteínas inseticidas (BRAVO *et al.*, 2007). No entanto, nem todas as pragas são devidamente afetadas pelas toxinas Bt utilizadas no presente e, ainda, há uma necessidade de desenvolver soluções para problemas específicos, como a resistência a pragas sugadoras de seiva e pragas de produtos armazenados.

Os estudos dos efeitos de inibidores de proteinases adicionados a dietas de insetos começaram nos anos de 1950, quando LIPKE *et al.* (1954) reportaram que uma fração protéica de soja inibia o crescimento e a atividade proteolítica *in vitro* de *Tribolium confusum*. RAMOS *et al.* (2008), quando alimentaram *Anagasta kuehniella* com dieta artificial contendo 0,7% do inibidor presente em sementes de *Plathymenia foliolosa*, observaram uma redução significativa na sobrevivência e no peso larval. MACEDO *et al.* (2003) mostraram que quando larvas de *Anagasta kuehniella* se alimentam de dietas artificiais contendo uma concentração de 1,6% de inibidor de tripsina de sementes de *Peltophorum dubium*, ocorreu uma redução de 66% do peso e de 56% na sobrevivência deste inseto.

Em 1987, HILDER e colaboradores obtiveram a primeira planta transgênica que expressava um gene de inibidor de proteinase. Eles construíram plantas de tabaco contendo o gene que codifica para o inibidor de proteinase serínica de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). Essas plantas que são susceptíveis ao inseto *Heliothis virescens* adquiriram altos níveis de resistência ao mesmo. Em estudos subsequentes, plantas resistentes foram obtidas contra os insetos *Lacanobia oleracea* e *Otiorhynchus sulcatus*. (GATEHOUSE & GATEHOUSE, 1998). Desde então, muitas outras plantas de interesse comercial foram transformadas com genes de inibidores de proteinases.

Ervilhas transgênicas expressando o inibidor de α -amilase α -AII foram altamente resistentes às pragas *C. maculatus* e *C. chinensis* (SHADE *et al.*, 1994) e *Bruchus pisorum* (Coleoptera: Bruchidae) (SCHROEDER *et al.*, 1995). Utilizando esse mesmo inibidor, ISHIMOTO *et al.* (1996) obtiveram feijões azuki resistentes a *C. chinensis*. DUAN *et al.* (1996) demonstraram que arroz transgênico, expressando o inibidor de proteinase II da batata, foi mais resistente à praga *Sesamia inferens* (Lepidoptera: Noctuidae) que o arroz não transgênico. Cana-

de-açúcar transgênica, contendo os inibidores de proteinase da soja (Kunitz; Bowman-Birk), foi resistente à praga *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae).

Neste contexto, o uso extensivo de inibidores de proteinases naturais pode tornar-se potencialmente um caminho promissor para aumentar a produção de proteínas recombinantes em sistemas de expressão de plantas.

II - OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral avaliar o efeito do inibidor do tipo Kunitz de sementes de *Adenantha pavonina* (ApTI) sobre o desenvolvimento de *Anagasta kuehniella* e *Anticarsia gemmatalis*. Assim, pretende-se:

- ✓ Incorporar a proteína (ApTI) isolada de sementes de *A. pavonina* em dietas artificiais e fornecê-las a *A. kuehniella* e *A. gemmatalis* como fonte de alimentação;
- ✓ Verificar os efeitos de ApTI no peso, sobrevivência e parâmetros nutricionais de larvas de 4º instar de *A. kuehniella* e *A. gemmatalis*;
- ✓ Avaliar a ocorrência de alterações no perfil enzimático digestório de *A. kuehniella* e *A. gemmatalis*;
- ✓ Avaliar os estágios de desenvolvimento de *A. kuehniella*, analisando a viabilidade larval e pupal, bem como a duração da fase larval, pupal e adulta das larvas;

III - MATERIAL

1 - Espécie vegetal

Sementes de *Adenanthera pavonina* (Mimosaceae), coletadas na cidade de Três Lagoas, Estado de Mato Grosso do Sul, foram utilizadas para extração do inibidor ApTI (MACEDO *et al.*, 2004). Essa espécie vegetal é encontrada naturalmente na Índia, porém foi introduzida em alguns países como: Porto Rico, Cuba, Jamaica, Venezuela, Costa Rica, Honduras, Estados Unidos e Brasil. Vulgarmente conhecida como Carolina, é uma planta decídua que alcança 6 - 15 metros de comprimento e 45 centímetros de diâmetro. É uma planta geralmente ereta, de cor marrom escuro e coroa espalhada. Suas flores são pequenas, de cor amarela com pontos marrom e perfumada. Cada flor possui forma de estrela com cinco pétalas. Suas sementes são duras de cor vermelha brilhante e geralmente usada como ornamento decorativo, historicamente a semente foi usada como medida de peso para jóias devido a sua pequena variação de peso (BURKILL, 1966) (Figura 2).

A madeira é durável, sendo útil para construir armários e produzir materiais decorativos (BENTHALL, 1946).

A. pavonina é da família das Leguminosas, plantas reconhecidas na literatura por possuírem uma grande quantidade de inibidores, sendo a maioria dos inibidores da família Kunitz (RICHARDSON *et al.*, 1991).



a



b



c



d

Figura 2 - *Adenanthera pavonina* (Carolina): (a) árvore, (b) frutos, (c) vagem e sementes e (d) sementes (Fotos de LORENZI, H. & KUBO, C.E.G).

2 - Insetos (*Anticarsia gemmatalis* e *Anagasta kuehniella*)

Ovos de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) foram fornecidos pelo setor de Biologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP). Os ovos de *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera Pyralidae) foram fornecidos pelo laboratório de purificação de proteínas e suas funções biológicas (LPPFB), do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

A lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Figura 3) é uma espécie de clima tropical e subtropical e ocorre desde o sul dos EUA até a Argentina (KING & SAUNDERS, 1985). Considerada a principal praga desfolhadora da soja nesses países, esta pode ocasionar reduções significativas na produção brasileira, com infestações desde Goiás e Mato Grosso até o Rio Grande do Sul (PAZZINE, 1990, PAZZINE; CORREA-FERREIRA, 1997). O adulto de *A. gemmatalis* é uma mariposa de coloração cinza, marrom ou bege e, na maioria das vezes, apresenta uma linha transversal na parte superior das asas. Os ovos são depositados isoladamente e com maior concentração no terço médio e inferior das plantas; o período embrionário é de aproximadamente, três dias e cada fêmea tem capacidade de colocar até 1000 ovos (BUENO, 2008). A fase larval tem duração de 12 a 15 dias e as lagartas em altas infestações podem causar danos de até 100% na área foliar consumida. A lagarta apresenta coloração esverdeada, com 5 estrias longitudinais brancas sobre o dorso (GALLO *et al.*, 2002). Em condições de alta população, ou escassez de alimento, a lagarta torna-se escura, mantendo as estrias brancas. Ao final da fase larval, a lagarta cessa a alimentação e passa à fase de pré-pupa que pode variar de um a dois dias. A lagarta pupa no solo, numa profundidade de até 2 cm, e apresenta coloração marrom escura e brilhante. A fase de pupa apresenta duração de nove a dez dias em temperatura de 25°C e, após esse período, ocorre à emergência das mariposas (BUENO, 2008).



Figura 3 - *Anticarsia gemmatalis*: (a) larva e (b) inseto adulto (Clemson University - USDA Cooperative Extension Slide Series, Bugwood.org).

Entre as diversas famílias pertencentes à ordem Lepidoptera que causam danos à agricultura uma delas é a Pyralidae, muito numerosa e de distribuição mundial. Seus integrantes são bastante pequenos e se comportam de maneira muito diversa, com grande capacidade adaptativa a diferentes ambientes. Dentre as diversas espécies, a *A. kuehniella* (Figura 4), conhecida como traça-da-farinha destaca-se como um dos principais predadores de produtos armazenados, tais como milho, trigo, arroz e amendoim (GALLO *et al.*, 2002).

Dependendo da temperatura e umidade, uma única fêmea pode estabelecer quase 600 ovos (COELHO *et al.*, 2007). A espécie requer ambiente fechado e de alta temperatura ao longo do ano para obter pleno desenvolvimento. Possui envergadura de asas de 20 a 25 mm e quando larvas chegam a medir 15 a 20 mm. As larvas apresentam coloração branca, às vezes rosada, com a parte posterior da cabeça marrom. A pupa mede em torno de 9 mm em forma de fuso, também de cor marrom, alojando-se num casulo. A temperatura favorável é de 26 °C e a temperatura limite para o desenvolvimento deste inseto é de 35 °C. Já a umidade relativa ideal é de 70%. O ciclo de vida total dura em torno de 3 a 4 meses. As larvas movem-se rapidamente, alimentando-se e lançando fios de seda, formando teias (GALLO *et al.*, 2002).



Figura 4 - *Anagasta kuehniella*: inseto adulto ([http:// megabio.com.br/ img/anagasta.gif](http://megabio.com.br/img/anagasta.gif)).

IV - MÉTODOS

1 - Extração e purificação do inibidor de *Adenantha pavonina* (ApTI)

O inibidor de *A. pavonina* (ApTI) é um inibidor do tipo Kunitz que inibe de forma competitiva enzimas do tipo tripsina, quimotripsina e papaína e apresenta massa molecular relativa de 19 kDa (MACEDO *et al.*, 2009). ApTI foi isolado através de métodos clássicos de purificação de proteínas, cromatografia de exclusão molecular, cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose - tripsina, segundo o método de RICHARDSON *et al.* (1986) com modificações (MACEDO *et al.*, 2004, 2009), descritas a seguir:

1.1 - Obtenção do extrato bruto

Sementes de *A. pavonina* sem tegumento foram moídas e peneiradas para se obter uma farinha de fina granulação, a qual foi submetida à delipidação com hexano. Cerca de 100 g de farinha delipidada foram agitadas com 1 litro de tampão fosfato de sódio monobásico 0,1M, pH 7,6, por 2 horas, e, em seguida centrifugada por 30 minutos a 10.000 x g. O sobrenadante foi submetido à precipitação com sulfato de amônio correspondendo a 0-40, 40-60, e 60-80% de saturação por 12 horas. Em seguida o material foi homogeneizado e centrifugado sob as mesmas condições. As três frações foram dissolvidas em água destilada, dialisadas e liofilizadas, obtendo-

se o chamado extrato bruto (EB), o qual foi armazenado a -20 °C para uso posterior. A fração correspondente a 40 - 60% de saturação com sulfato de amônio (precipitado II ou pico II) foi selecionada para o passo de purificação posterior.

1.2 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75

Amostras de 300 mg da fração 40-60% foram aplicadas em Sephadex G-75 (2,0 x 50 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio monobásico 0,1 M contendo NaCl 0,1 M, pH 7,6. Foram coletadas frações de 3,0 ml em fluxo de 40 ml/h, efetuando-se a leitura das mesmas em espectrofotômetro a 280 nm. Em seguida, foi realizado o ensaio antitriptico de acordo com ERLANGER *et al.* (1961).

1.3 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose

O pico com atividade antitriptica detectado no Pico II da Sephadex G-75, após ser dialisado e liofilizado, foi aplicado em coluna de troca iônica DEAE-Sepharose (2,5 x 20 cm), equilibrada previamente com tampão Tris/HCl 0,05 M, pH 8,0. Utilizando-se um gradiente salino (NaCl de 0 – 1 M) ocorreu a eluição, na qual frações de 3,0 mL foram coletadas em fluxo de 40 ml/h. O perfil cromatográfico foi determinado utilizando-se um comprimento de onda de 280 nm. A atividade antitriptica foi detectada no primeiro pico cromatográfico, denominado P1, o qual foi utilizado no passo posterior após diálise e liofilização.

1.4 - Cromatografia de afinidade em Sepharose - Tripsina.

A fração P1, proveniente do passo de purificação anterior, foi aplicada em coluna de Sepharose ativada com brometo de cianogênio e acoplada à enzima tripsina, de acordo com as recomendações do fabricante (GE). Esta resina foi equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,2 M com NaCl 0,1 M, pH 7,6 e colocada em coluna de vidro (2 x 5 cm). Foram coletadas frações de 3,0 ml/tubo, até que a absorvância permanecesse próximo de zero. Subsequentemente, o material retido foi eluído com HCl 0,1M em fluxo de 40 ml/hora, o qual se referia ao inibidor (ApTI) que foi detectado através de ensaios de atividade antitriptica, segundo a metodologia citada anteriormente.

2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS

Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS foi realizada conforme descrito por LAEMMLI (1970). As proteínas usadas como marcadores de massa molecular foram fosforilase (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor da tripsina de soja (20 kDa), e α -lactalbumina (14 kDa). As proteínas foram detectadas pela coloração com 0,1% Coomassie azul brilhante R-250.

3 - Quantificação de proteína

As concentrações de proteínas solúveis foram determinadas pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se albumina bovina como padrão.

4 - Preparação dos intestinos médio – Ensaio *in vitro*

Proteinases foram obtidas a partir do intestino médio de larvas de 4^o instar de acordo com Macedo *et al.* (1995). As larvas de 4^o instar foram imobilizadas em gelo e o intestino médio, juntamente com o seu conteúdo, removidos e armazenados em NaCl 0,15M e congelado a -20^o C. Os intestinos das larvas de *Corcyra cephalonica*, *Diatraea saccharalis*, *Aticarsia gemmatalis*, *Sitotroga cerealella*, *Spodoptera frugiperda* e *Anagasta kuehniella* foram homogeneizados em NaCl 0,15 M, centrifugados a 6.000 x g por 5 minutos à 4^o C, e os sobrenadantes foram armazenados para uso posterior nos ensaios bioquímicos como fonte das enzimas para os ensaios enzimáticos .

5 - Bioensaio - Ensaio *in vivo*

Para as larvas neonatas de *A. gemmatalis* e *A. kuehniella* foram oferecidas dietas artificiais segundo a metodologia de PARRA (1996). Na preparação das dietas foi utilizado, uma concentração do inibidor ApTI 0,5% para larvas de *A. gemmatalis* e 0,25 - 1% para larvas de *A. kuehniella*. Dietas isentas do inibidor foram usadas como tratamentos controle.

A. gemmatalis foi mantida em tubos de vidro de fundo chato, de 2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura, fechados com algodão hidrófugo e mantidos a 25 \pm 2 $^{\circ}$ C, UR 60 \pm 10%. Cada tratamento foi composto por 10 repetições, contendo 3 lagartas neonatas (n = 30).

Os insetos *A. kuehniella* foram mantidos em uma sala de criação a temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de 65 - 75% e fotofase de 14 horas. Cada tratamento foi composto por 15 repetições, contendo 5 lagartas neonatas ($n = 75$).



Figura 5 - Dieta artificial segundo a metodologia de PARRA (1996).

6 - Efeito de ApTI na sobrevivência, peso e parâmetros nutricionais de larvas de 4° instar de *A. gemmatalis* e *A. kuehniella*

Ao atingirem o 4° instar de desenvolvimento, os parâmetros de sobrevivência e peso médio das larvas foram determinados. Em relação aos índices nutricionais, quatro parâmetros foram analisados: Eficiência de Conversão do alimento Ingerido (ECI), Eficiência de Conversão do alimento Digerido (ECD), Custo Metabólico (CM) e Digestibilidade Aproximada (AD), todos se referem ao consumo e utilização do alimento, e foram calculados de acordo com PANIZZI & PARRA (1991), como se segue:

ECI – estima a percentagem do alimento ingerido que foi transformado em biomassa.

$$\text{ECI} = \frac{\text{B}}{\text{I}} \times 100$$

ECD – estima a percentagem do alimento digerido convertido em biomassa.

$$\text{ECD} = \frac{\text{B}}{\text{I}-\text{F}} \times 100$$

CM – é o inverso do ECD, representa a percentagem do alimento metabolizado em energia para manutenção dos processos vitais.

$$CM = 100 - ECD$$

AD – representa a percentagem do alimento ingerido que é efetivamente assimilado pelo inseto. É uma aproximação da tomada real de nutrientes através das paredes do intestino.

$$AD = \frac{I-F}{I} \times 100$$

Onde,

B = peso médio das larvas

I = alimento consumido

F = alimento não digerido + produtos de excreção

I-F = alimento assimilado

7 - Efeito de ApTI no desenvolvimento de *A. kuehniella*

Dietas contendo ApTI 0,25 - 1%, bem como dietas sem a presença do inibidor (dieta controle), foram utilizadas e os seguintes parâmetros avaliados: (1) Duração da fase larval, (2) Duração da fase pupal, (3) Emergência, (4) Sobrevivência durante o estágio adulto e (5) Tempo de eclosão dos ovos a formação de adultos. Para os cálculos, foi utilizado o índice de HOWE (1971).

8 - Obtenção das enzimas do fluido intestinal das larvas de *A. gemmatalis* e *A. kuehniella*

As larvas de 4º instar foram imobilizadas em gelo e dissecadas em NaCl 0,15 M. Os intestinos médio (Figura 6) foram removidos das larvas com a utilização de pinças, homogeneizados e centrifugados a 18.000 x g, por 30 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos (IM) foram imediatamente utilizados como fonte das enzimas e, quando necessário, armazenados a -20 °C.



Figura 6 - Dissecação do intestino médio das larvas 4^o instar de *A. gemmatalis*.

9 - Preparação das fezes

As fezes das larvas de 4^o instar de *A. gemmatalis* e *A. kuehniella*, alimentadas em dieta controle e dieta contendo ApTI 0,5% e 1%, respectivamente, após a separação, foram estocadas a - 20 °C. Para utilização nos ensaios, foram homogeneizadas em tampão Tris 0,1 M, pH 8,0, e centrifugadas a 17.000 x g por 10 minutos, a 4 °C. Os sobrenadantes foram imediatamente utilizados nos ensaios bioquímicos como fonte de enzimas.

10 - Determinação da atividade enzimática do tipo tripsina

A atividade de enzimas do tipo tripsina foi determinada pela hidrólise do substrato específico BApNA (*N*- α Benzoyl-D-L-Arginine p-Nitroanilide).

Para *A. gemmatalis*, intestino médio e fezes (4 μ g de proteína) das larvas alimentadas em dieta controle e dieta contendo ApTI 0,5% foram incubados por 10 minutos em tampão Tris 0,1 M, pH 8,0 e, em seguida, adicionados 10mM de substrato. O tempo de ensaio foi de 20 minutos a 37°C e as absorbâncias foram lidas a intervalos de 5 minutos. Para este ensaio, foram realizados 8 replicatas e a reação lida a 410 nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A atividade enzimática foi determinada em nmol BApNA hidrolisado/minuto/ μ g proteína.

Para *A. kuehniella*, intestino médio e fezes (5 μ g de proteína) das larvas alimentadas em dieta controle e dieta contendo ApTI 1% foram incubados com tampão Tris 0,1 M, pH 8,0 por 10 minutos antes da adição de 1 mM do substrato BApNA. Após a adição do substrato, a reação

ocorreu por 20 minutos a 37 °C e, posteriormente, foi parada com a adição de ácido acético (30%, v/v). A absorbância resultante foi determinada a 410 nm e a atividade enzimática determinada em nmol BApNA hidrolisado/minuto/ μ g proteína. Esse experimento foi realizado em triplicatas com seus apropriados brancos.

11 - Avaliação de inibição das proteinases larvais após a ingestão de ApTI

O efeito de ApTI sobre a atividade enzimática dos extratos de intestino médio das larvas foi determinado para verificar a sensibilidade das larvas ao inibidor após contato com o mesmo nas dietas artificiais e dessa forma inferir se houve uma aclimação dos insetos. Para *A. gemmatalis*, esse ensaio foi realizado utilizando-se tampão Tris 0,1 M pH 8,0, enzimas totais do intestino médio – IM (4 μ g) e ApTI (1,4 - 9,8 μ g). Após o período de incubação por 10 minutos, adicionou-se 10 mM de BApNA. A reação ocorreu por 20 minutos a 37 °C e o produto da hidrólise lido a 410 nm em um VERSA Max microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A atividade enzimática foi determinada em nmol BApNA hidrolisado/minuto/ μ g proteína. Esse experimento foi realizado em triplicatas com seus apropriados brancos.

Para *A. kuehniella*, o ensaio foi realizado com tampão Tris 0,1 M, pH 8,0, enzimas totais do intestino médio (5 μ g) e ApTI (1 – 4 μ g). Após o período de incubação por 10 minutos, adicionou-se BApNA à 1mM. A reação ocorreu a 37 °C por 20 minutos. O ensaio foi posteriormente interrompido com a adição de ácido acético (30%, v/v). A absorbância resultante foi determinada a 410 nm e a atividade enzimática determinada em nmol BApNA hidrolisado/minuto/ μ g proteína. Esse experimento foi realizado em triplicatas com seus apropriados brancos.

12 - Análise eletroforética das enzimas das larvas de *A. gemmatalis* e *A. kuehniella*

Eletroforese em SDS – PAGE (10%) contendo gelatina 0,1% foi realizada para análise da atividade enzimática do intestino médio (IM) e fezes das larvas de 4º instar alimentadas em dieta artificial controle e dieta artificial contendo ApTI 0,5% (*A. gemmatalis*) e 1 % (*A. kuehniella*).

Para analisar a atividade das enzimas do tipo tripsina, amostras de IM e fezes de *A. gemmatalis* (4 μ g proteína) e de *A. kuehniella* (5 μ g proteína), contendo 10 μ l de tampão Tris 0,05 M pH 8,0, foram incubados por 30 minutos a 37 °C. Para analisar a atividade das enzimas do

tipo tripsina, amostras foram incubadas com um inibidor específico – TLCK (10 ug) (N- α -tosyl-L-lysine choromethyl ketone) nas mesmas condições descritas acima. A corrida ocorreu a 5 °C, e em seguida, o gel foi lavado com solução 2,5 % de Triton X-100, por 30 minutos, sob agitação constante para remover o SDS. Posteriormente, o gel foi incubado em tampão Tris 0,05 M, pH 8,0, por 2 horas, para atividade enzimática. Para a coloração foi utilizado Comassie Brilliant Blue R-250.

13 - Análise estatística

Os dados obtidos com as diferentes etapas do bioensaio, assim como nos ensaios bioquímicos, foram submetidos ao teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (ANOVA).

V - RESULTADOS

1 - Purificação do inibidor ApTI de sementes de *A. pavonina*

O inibidor de tripsina (ApTI) foi purificado por extração em tampão fosfato de sódio monobásico 0,1M, pH 7,6, cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G- 75, troca iônica em DEAE-Sepharose e de afinidade em Sepharose-Tripsina. A Figura 7 ilustra o resultado da eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS, mostrando que ApTI possui uma única cadeia polipeptídica com massa molecular relativa de 19 kDa.

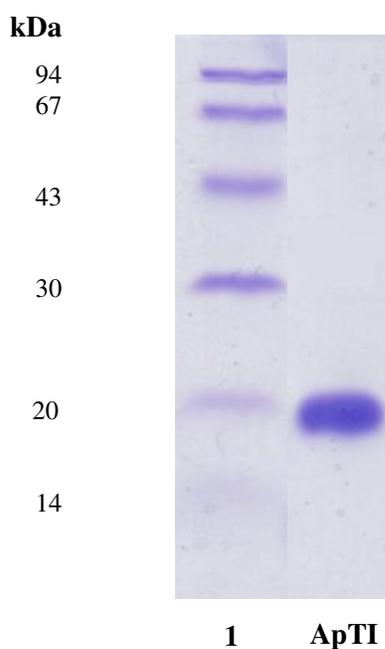


Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS. (1) Marcadores de massa molecular; (2) inibidor de tripsina de *Adenantha pavonina* (ApTI).

2 - Eficiência *in vitro* de ApTI

Esses resultados mostram a potência *in vitro* do ApTI (1 µg) contra a atividade triptica do intestino médio de larvas de seis diferentes espécies de lepidópteros. As análises iniciais indicaram que os níveis relativos de atividade triptica variaram nas seis espécies de lepidópteros quando comparados entre si. A atividade triptica de *S. cerealella* foi relativamente pouco afetada pelo ApTI, enquanto que as enzimas de *A. kuehniella*, *A. gemmatalis*, *C. cephalonica*, *S. frugiperda* e *D. saccharalis* foram fortemente inibidas pelo ApTI.

Tabela 2 - Atividade *in vitro* das enzimas do tipo tripsina do intestino médio de larvas de lepidópteros, relacionada com a habilidade de inibição do ApTI.

nM substrato hidrolizado/min		
Insetos	Tripsina	% TI
<i>Spodoptera frugiperda</i>	6.64	91.5
<i>Anagasta kuehniella</i>	5.34	79.4
<i>Diatraea saccharalis</i>	5.84	78.5
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	5.09	72.3
<i>Corcyra cephalonica</i>	5.55	60.3
<i>Sitotroga cerealella</i>	6.83	8.0

% TI indica a porcentagem de tripsina inibida por ApTI.

3 - Efeito de ApTI na sobrevivência das larvas de 4º instar de *A. gemmatalis* e *A. kuehniella*

As larvas de 4º instar de *A. gemmatalis* alimentadas com dietas artificiais contendo ApTI (0,5%) apresentaram diferenças significativas na sobrevivência em relação ao grupo controle. A taxa de sobrevivência das larvas que se desenvolveram em dietas sem inibidor foi de aproximadamente 100 %, enquanto aquelas alimentadas com dieta contendo ApTI obtiveram uma taxa de mortalidade em torno de 31% (Figura 8).

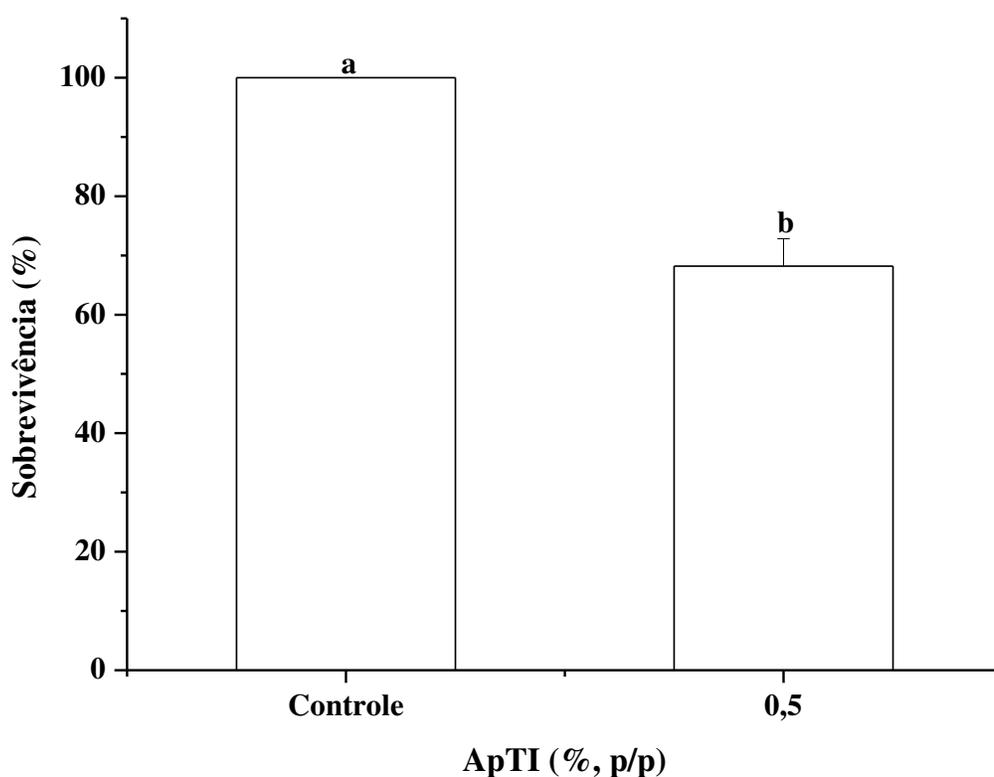


Figura 8 - Sobrevivência das larvas de 4º instar de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo ApTI 0,5%. Cada valor representa a média \pm SD (n = 30). Letras diferentes indicam diferenças significativas (P < 0,05) dos valores quando comparados entre si.

Em relação à sobrevivência larval de *A. kuehniella*, foram observados diferenças significativas na sobrevivência das larvas de 4º instar alimentadas com dieta artificial contendo ApTI. A taxa de sobrevivência das larvas alimentadas em dieta controle foi de aproximadamente 90%, enquanto que dieta contendo 1% de ApTI causou 50% de mortalidade (Figura 9).

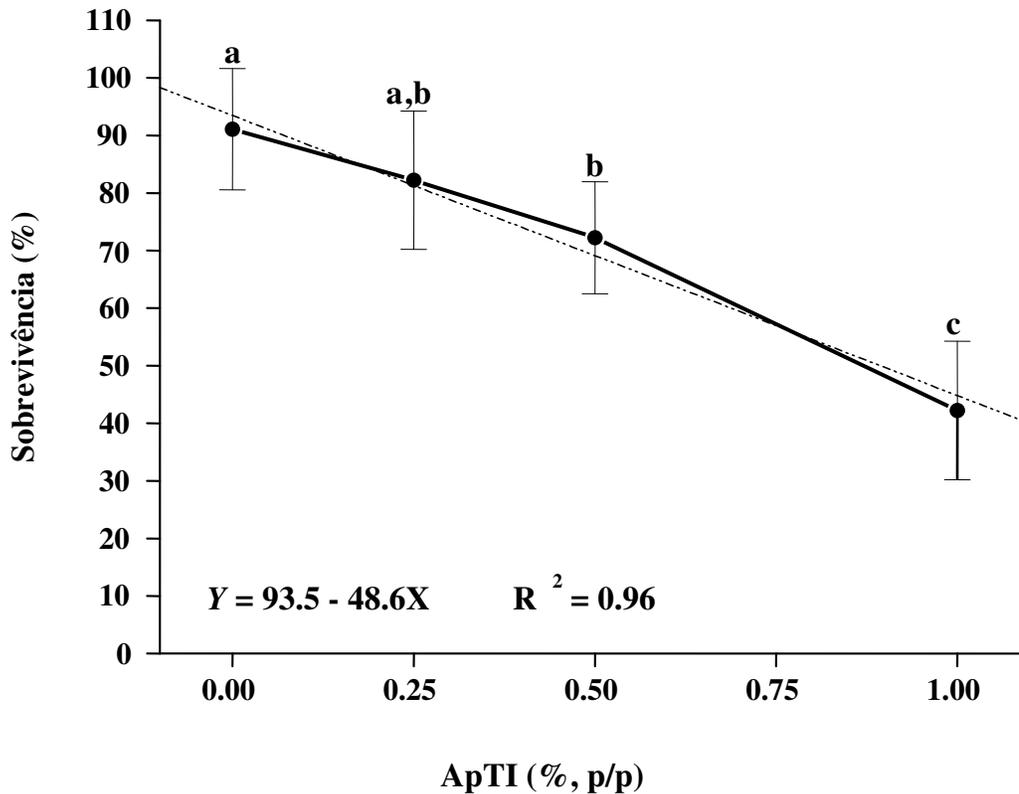


Figura 9 - Sobrevivência das larvas de 4º instar de *A. kuehniella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo ApTI 0,25 - 1%. Cada valor representa a média \pm SD de (n = 75). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si.

4 - Efeito de ApTI no peso das larvas de 4° instar de *A. gemmatalis* e *A. kuehniella*

Em relação ao peso médio das larvas de 4° instar foram observadas alterações significativas nos dois insetos.

As larvas de *A. gemmatalis* alimentadas em dieta contendo ApTI 0,5% sofreu uma redução de aproximadamente 22% no peso médio em relação as larvas alimentadas com dieta sem o inibidor (Figura 10).

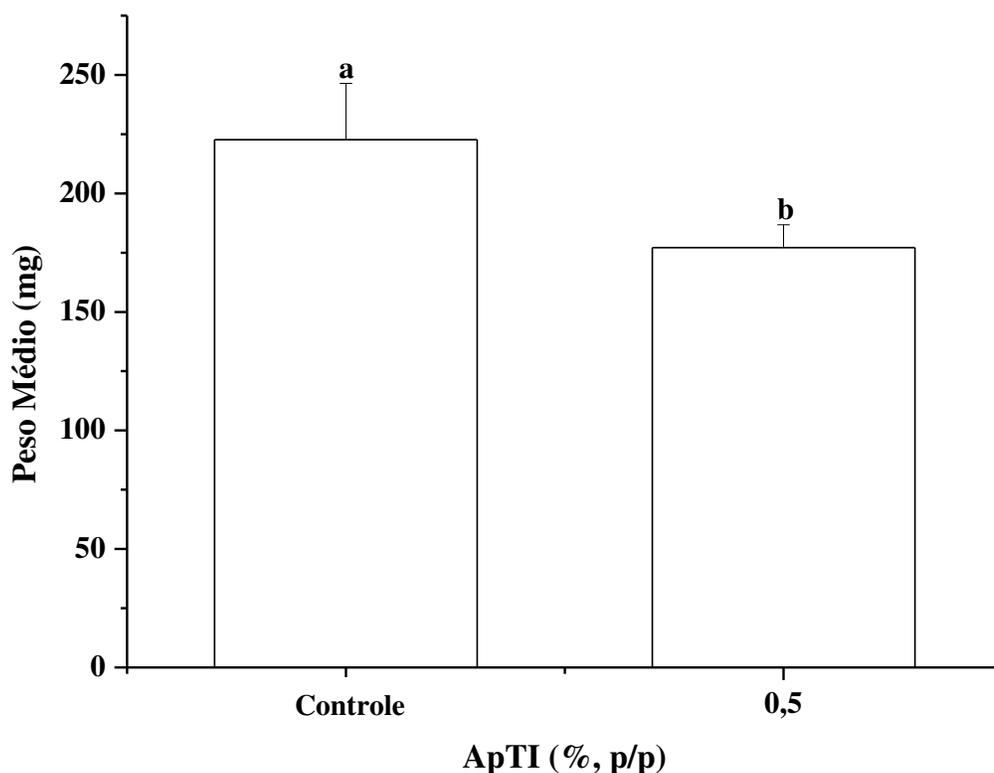


Figura 10 - Peso médio das larvas de 4° instar de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo ApTI 0,5%. Cada valor representa a média \pm SD (n = 30). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05\%$) dos valores quando comparados entre si.

As larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta contendo ApTI 1% sofreram uma redução de aproximadamente 50% no peso médio em relação às larvas alimentadas com dieta sem o inibidor (Figura 11).

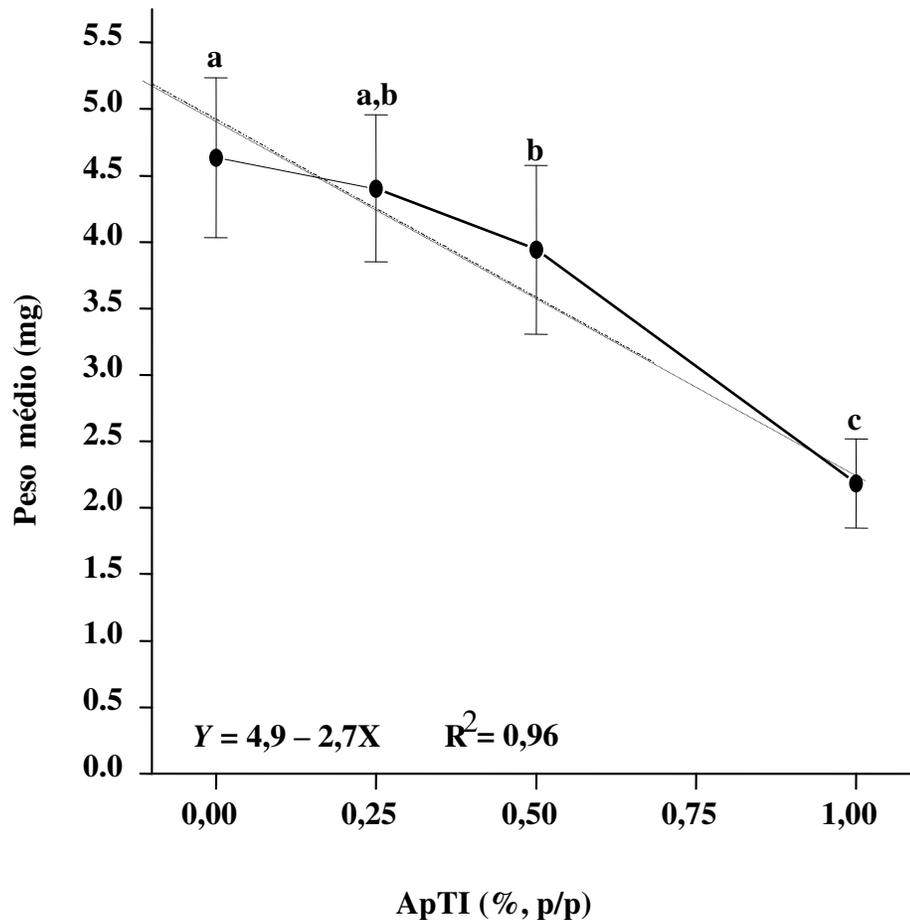


Figura 11 - Peso médio das larvas de 4º instar de *A. kuehniella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo ApTI 0,25 - 1%. Cada valor representa a média \pm SD (n = 75). Letras diferentes indicam diferenças significativas (P < 0,05%) dos valores quando comparados entre si.

Anticarsia gemmatalis



Anagasta kuehniella

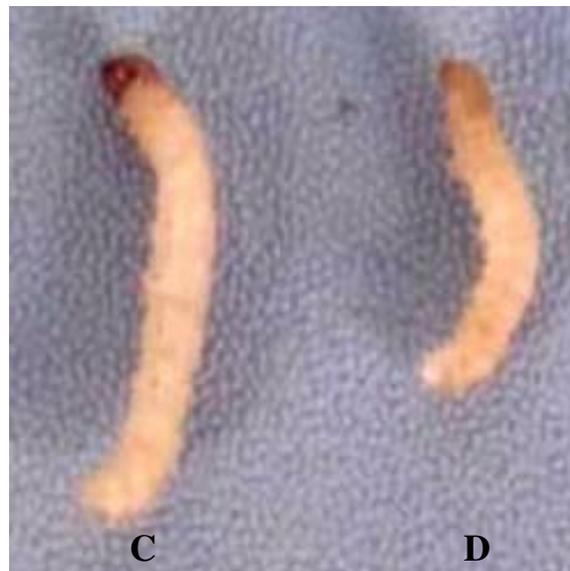


Figura 12 - Foto ilustrando o efeito do ApTI no peso das larvas de 4^o instar. (A) Larva de *A. gemmatalis* alimentada com dieta controle; (B) Larva alimentada com dieta contendo ApTI 0,5%; (C) Larva de *A. kuehniella* alimentada com dieta controle e (D) Larva alimentada com dieta contendo ApTI 1%.

5 - Análise do consumo de alimento

A adição de ApTI 0,5% na dieta de larvas de *A. gemmatalis* apresentou uma redução de 17% no consumo do alimento (Figura 13) e a excreção de fezes sofreu uma diminuição de 40% quando comparado ao alimentado com dieta controle (Figura 14).

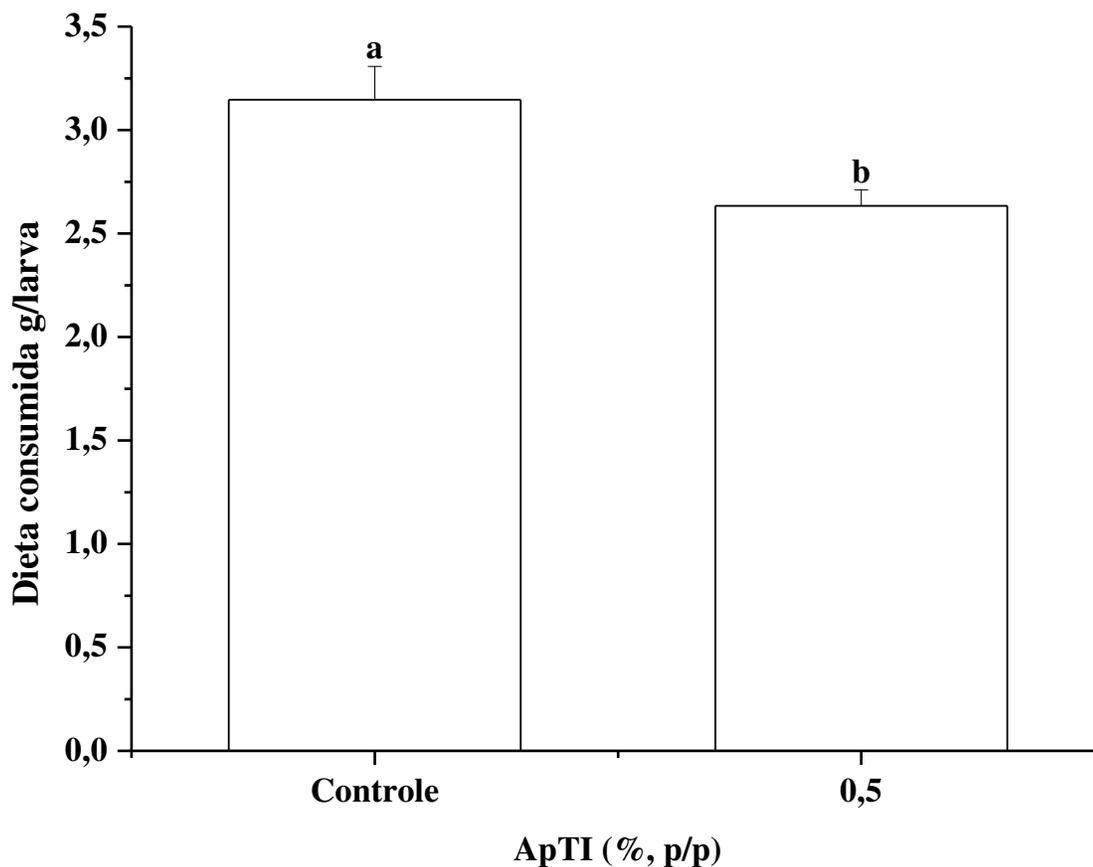


Figura 13 - Quantidade de dieta consumida pelas larvas de 4º instar de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo ApTI 0,5%. Cada valor representa a média \pm SD (n = 30). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05\%$) dos valores quando comparados entre si.

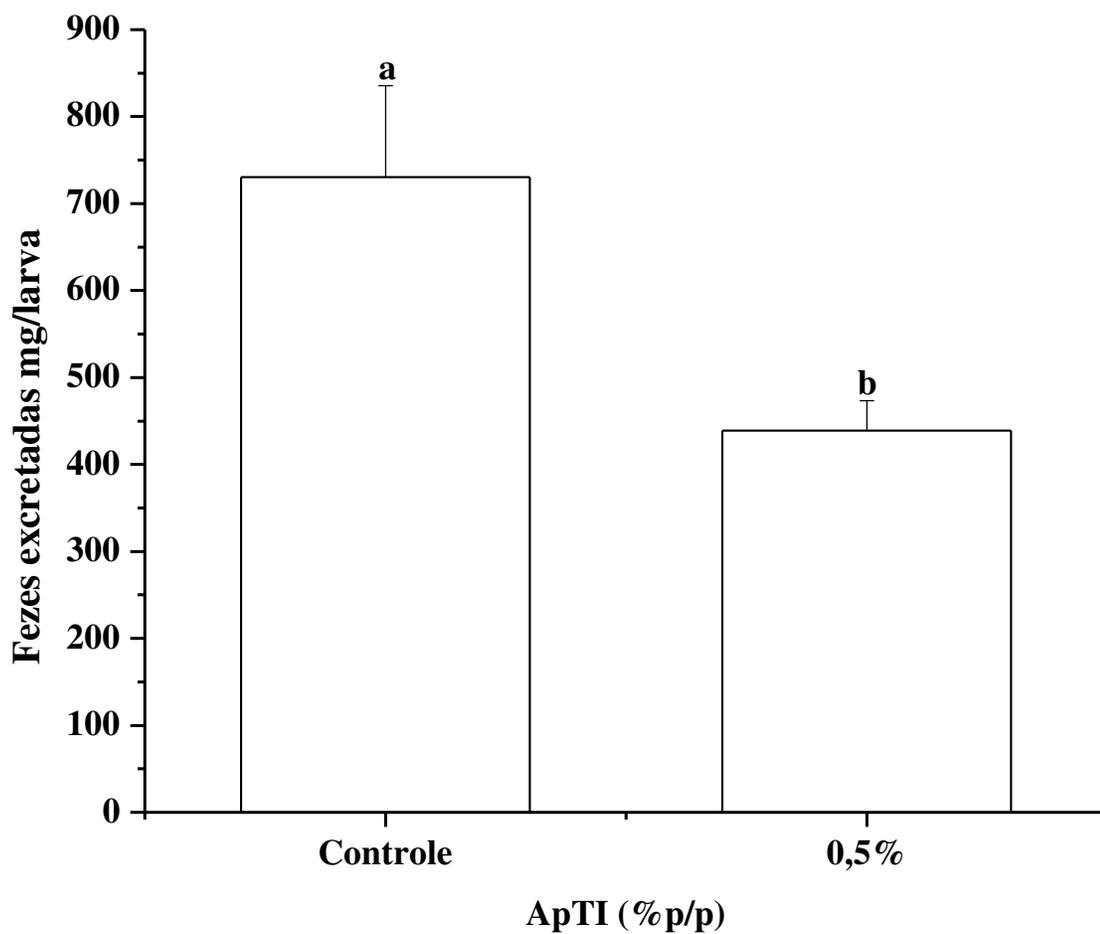


Figura 14 - Quantidade de fezes excretadas pelas larvas de 4º instar de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo ApTI 0,5%. Cada valor representa a média \pm SD (n = 30). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05\%$) dos valores quando comparados entre si.

As Figuras 15 e 16 mostram os efeitos de ApTI no consumo da dieta e na quantidade de fezes excretadas pelas larvas de *A. kuehniella*. Apesar de ApTI não ter causado efeito significativo no consumo da dieta (Figura 15), a excreção de fezes por larva sofreu uma diminuição de 50% quando comparada à aquela das larvas alimentadas com dieta controle (Figura 16).

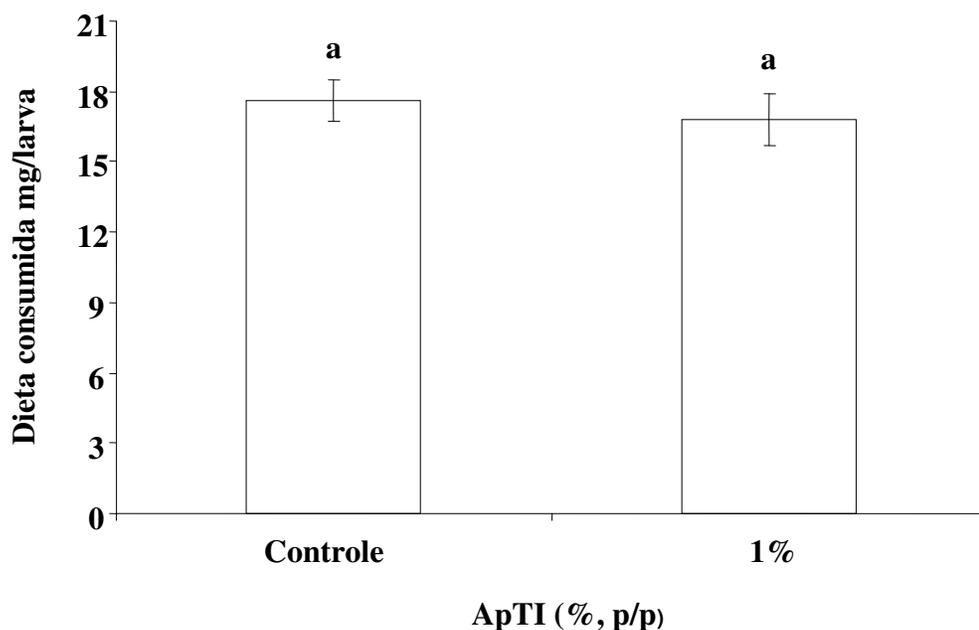


Figura 15 - Quantidade de dieta consumida pelas larvas de 4º instar de *A. kuehniella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo ApTI 1%. Cada valor representa a média \pm SD (n = 75). Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) dos valores quando comparados entre si.

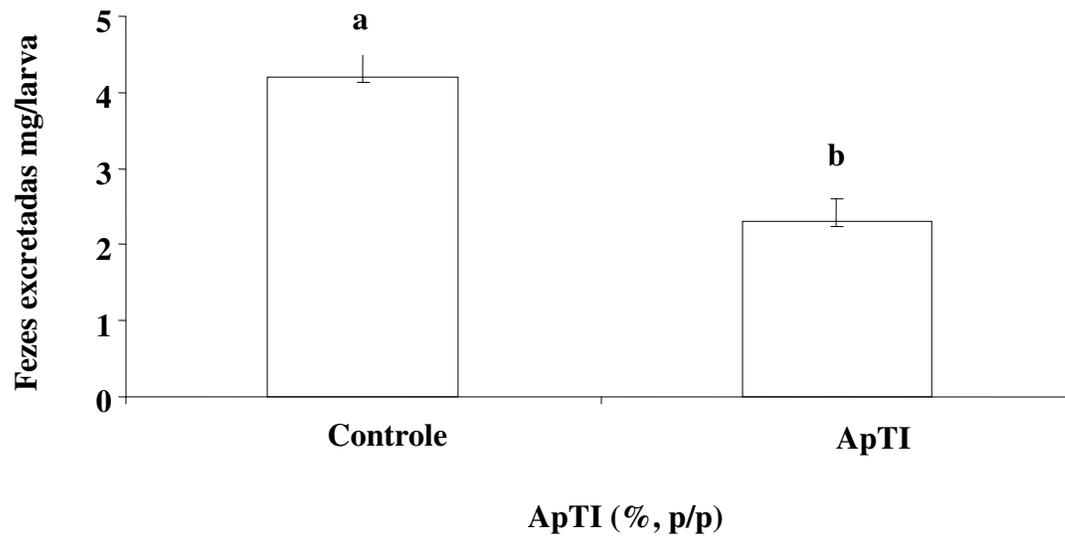


Figura 16 - Quantidade de fezes excretadas pelas larvas de 4° instar de *A. kuenhiella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo ApTI 1%. Cada valor representa a média \pm SD (n = 75). Letras diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05\%$) dos valores quando comparados entre si.

6 - Parâmetros nutricionais

Os índices nutricionais (Tabela 3) mostram que as larvas de *A. gemmatalis*, alimentadas com ApTI 0,5%, e as larvas de *A. kuehniella*, alimentadas com 1% de ApTI, sofreram a influência do inibidor na atividade metabólica quando comparadas às larvas alimentadas com dieta controle.

Índices nutricionais	<i>A. gemmatalis</i>		<i>A. kuehniella</i>	
	Controle	ApTI 0,5%	Controle	ApTI 1%
ECI (%)	22,4 ± 2,2a	21,9 ± 2,6a	26,8 ± 3,1a	20,6 ± 2,8b
ECD (%)	16,1 ± 0,5a	14,9 ± 0,6b	35,6 ± 5,3a	22,0 ± 4,1b
AD (%)	70,1 ± 5,4a	83,4 ± 1,0b	75,1 ± 6,2a	93,7 ± 7,4b
CM (%)	77,3 ± 6,2a	87,8 ± 3,4b	64,3 ± 5,6a	78,0 ± 8,6b

Tabela 3 - Eficiência de Conversão do alimento Ingerido (ECI), Eficiência de conversão do alimento Digerido (ECD), Custo Metabólico (CM), Digestibilidade Aparente (AD) das larvas de *A. gemmatalis* e *A. kuehniella* alimentadas com dietas artificiais contendo ApTI 0,5 e 1% respectivamente ou na sua ausência do inibidor. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) dos valores quando comparados entre si.

7 - Ação do ApTI na atividade enzimática de *A. gemmatalis* e *A. kuenhiella*

A determinação da atividade trípica foi realizada para avaliar as alterações no perfil enzimático digestivo dos insetos. Para larvas de *A. gemmatalis*, foram observados uma redução de 30% na atividade trípica do fluido do intestino médio (IM) das larvas alimentadas com dieta contendo ApTI 0,5% (Figura 17) de 40% na atividade trípica das fezes quando comparada aquelas das lagartas do controle (Figura 18).

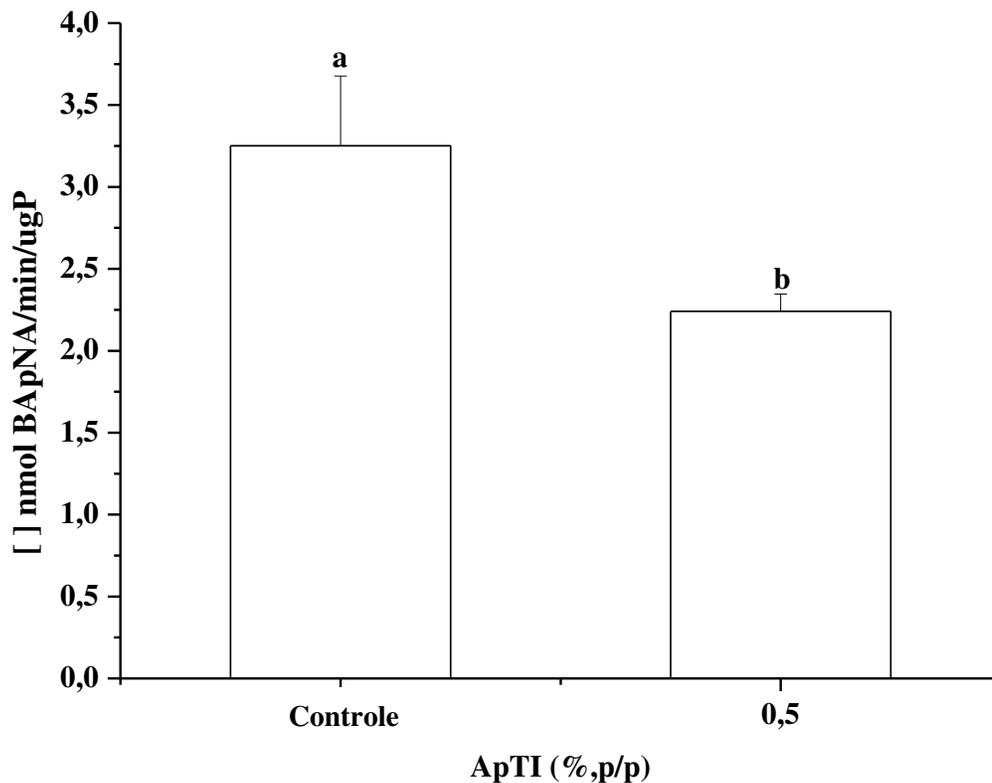


Figura 17 - Atividade trípica do intestino médio das larvas de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta controle e dieta contendo ApTI 0,5%. Foram utilizadas 8 replicatas para cada tratamento. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05\%$) dos valores quando comparados entre si.

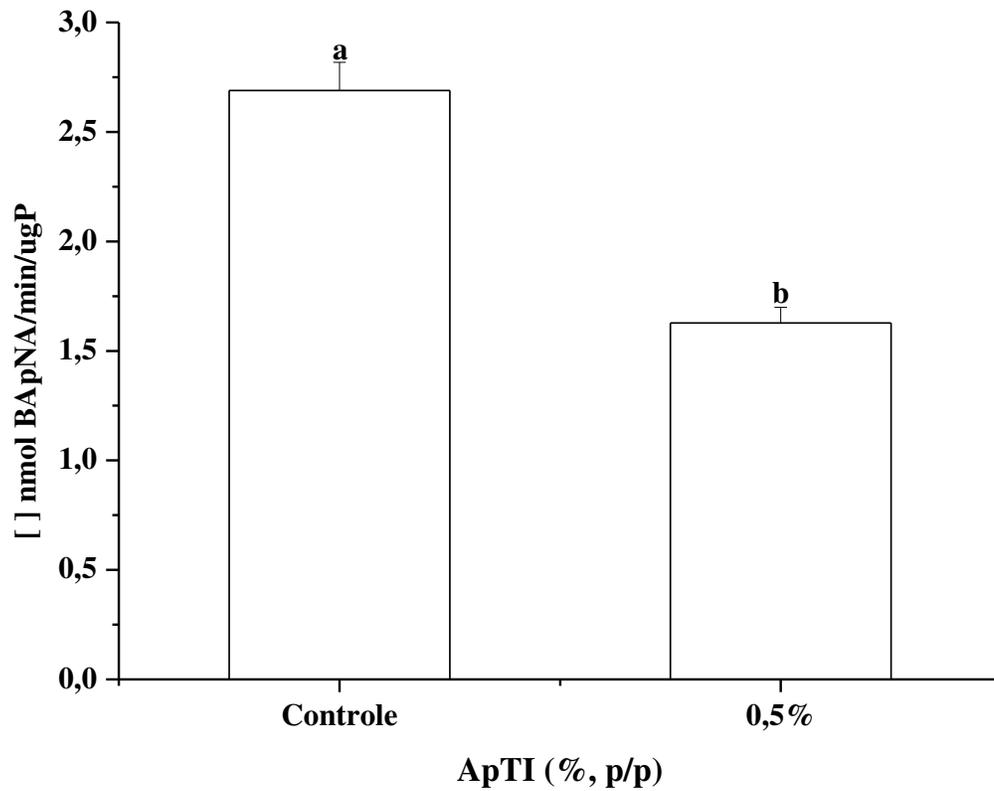


Figura 18 - Atividade trípica das fezes das larvas de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo ApTI 0,5%. Foram utilizadas 8 replicatas para cada tratamento. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05\%$) dos valores quando comparados entre si.

Para larvas de *A. kuenhiella* foi observado um aumento de 38% na atividade trípica do fluido do intestino médio daquelas alimentadas com dieta contendo ApTI 1% (Figura 19). Em relação à atividade trípica das fezes, nenhuma diferença foi observada (Figura 20).

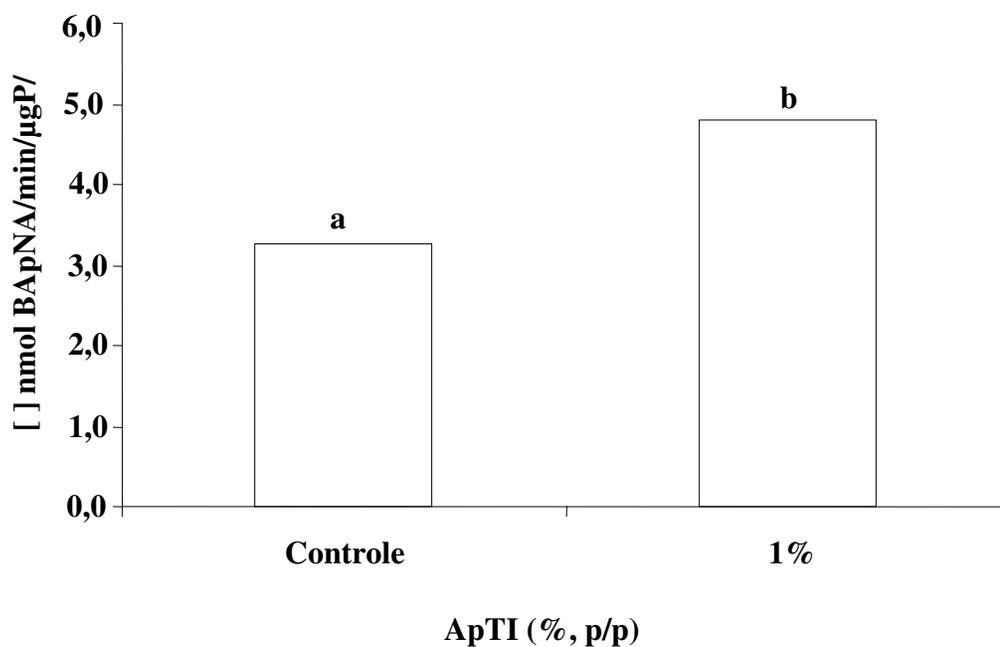


Figure 19 - Atividade trípica do intestino médio das larvas de *A. kuenhiella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo ApTI 1%. Foram utilizadas triplicatas para cada tratamento. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05\%$) dos valores quando comparados entre si.

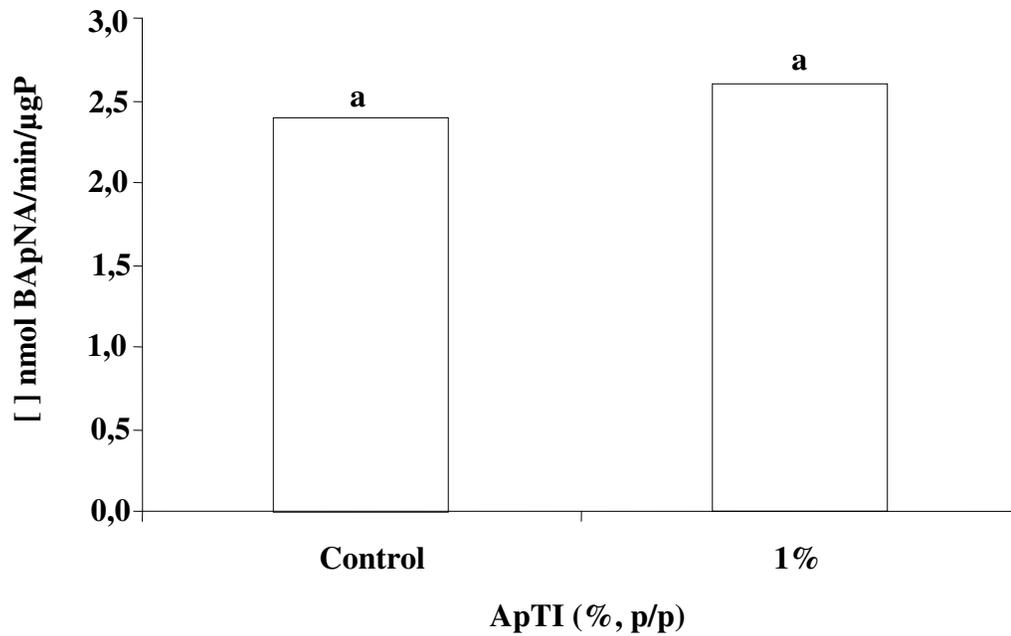


Figura 20 - Atividade trípica das fezes das larvas de *A. kuenhiella* alimentadas com dieta controle e dieta contendo ApTI 1%. Foram utilizadas triplicatas para cada tratamento. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si.

8 - Inibição da atividade trípica das larvas após a ingestão de ApTI

Nas Figuras 21 e 22, os fluidos intestinais (IM) das larvas de *A. gemmatalis* e *A. kuehniella*, respectivamente, alimentadas com dieta controle e com dieta contendo o inibidor, foram incubados com concentrações crescentes de ApTI, e a atividade trípica residual foi analisada através da hidrólise de BApNA. As proteinases intestinais de *A. gemmatalis* alimentados com ApTI 0,5% e as de *A. kuehniella* alimentadas com ApTI 1% continuaram sensíveis à ação do inibidor.

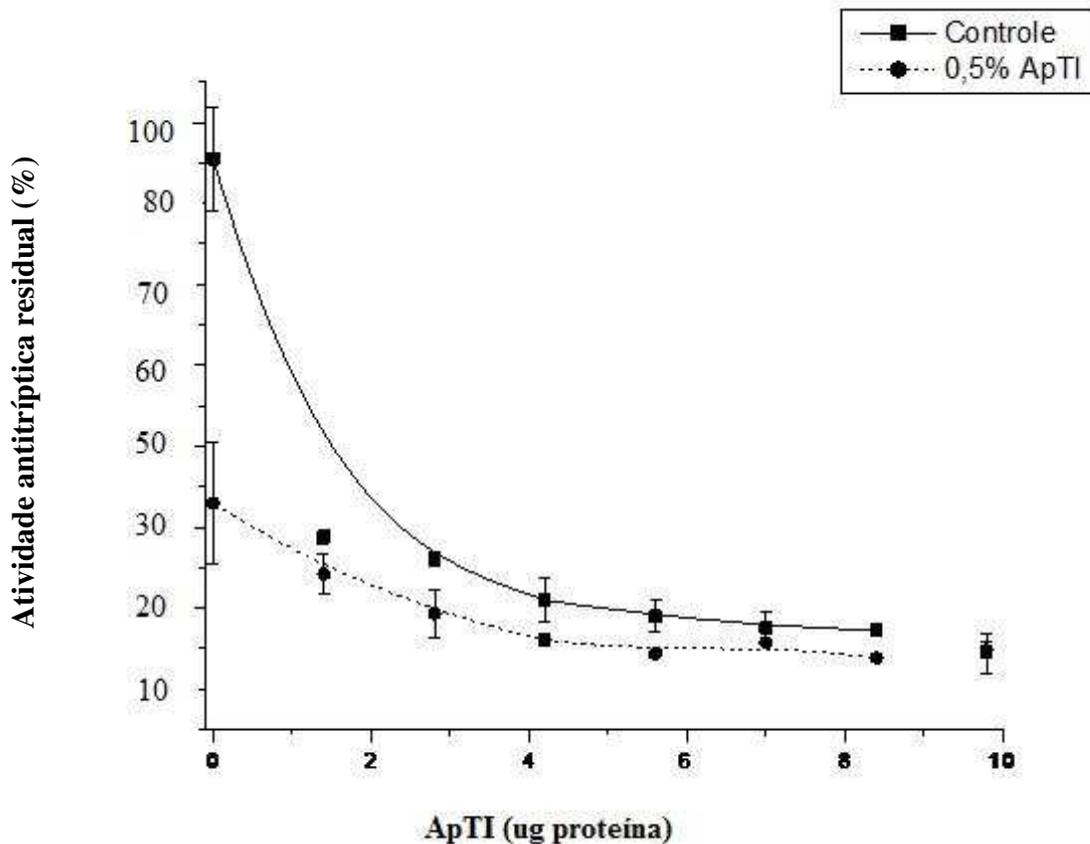


Figura 21 - Atividade antitriptica das larvas de *A. gemmatalis* alimentados com dieta controle e dieta contendo ApTI 0,5%. Alíquotas do intestino médio de larvas foram incubadas com concentrações crescentes de ApTI e a atividade foi determinada pela hidrólise do substrato BApNA.

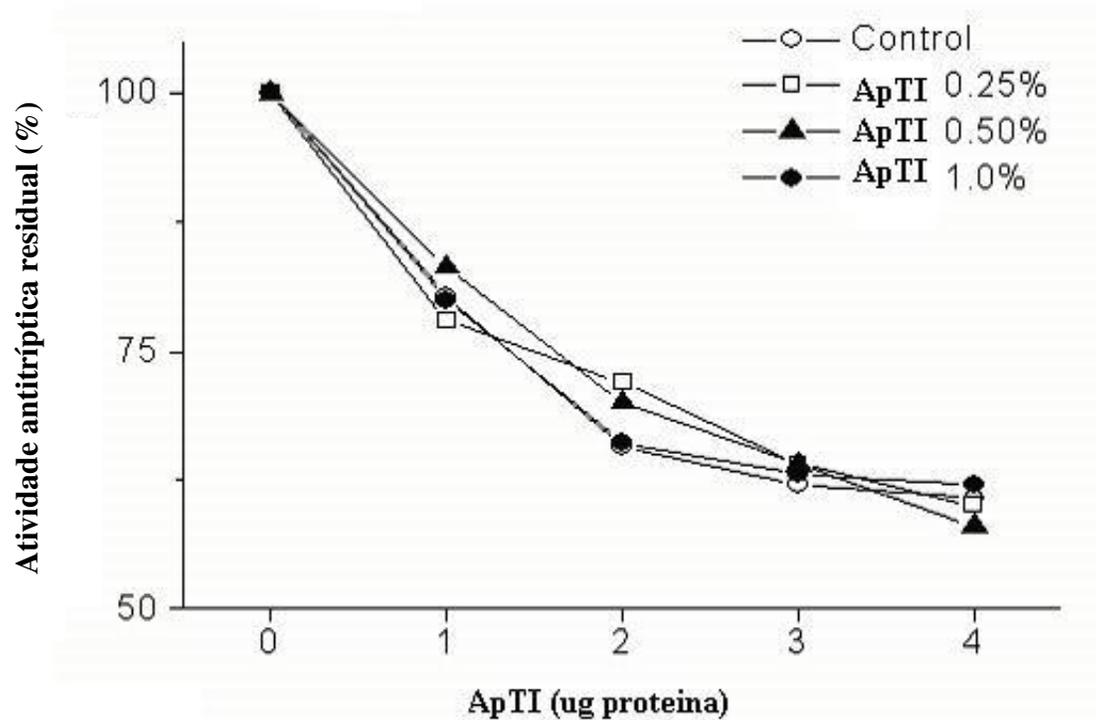


Figura 22 - Atividade antitriptica das larvas de *A. kuehniella* alimentados com dieta controle e dieta contendo ApTI 0,25 - 1%. Alíquotas do intestino médio de larvas foram incubadas com concentrações crescentes de ApTI e a atividade foi determinada pela hidrólise do substrato BApNA.

9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS contendo 0,1% de gelatina

A atividade das proteinases presentes no fluido do IM e as fezes dos insetos de 4º instar que foram alimentadas com dietas controle e contendo ApTI 0,5 e 1% para *A. gematallis* e *A. kuehniella*, respectivamente, foram verificadas em PAGE-SDS contendo gelatina a 0,1%.

A Figura 23 ilustra a atividade em gelatina das enzimas presentes no IM das larvas de *A. gematallis* alimentadas com dieta controle (linha 1). Quando as larvas foram alimentadas com ApTI 0,5%, a atividade trípica presente no IM (linha 2) e nas fezes sofreu uma redução (linha 6). Para visualização da atividade de enzimas do tipo tripsina, um inibidor sintético específico para tripsina, TLCK, foi incubado com as alíquotas do IM e das fezes. As linhas 3, 4, 7 e 8 mostram uma diminuição de atividade da enzima do tipo tripsina devido à presença de TLCK.

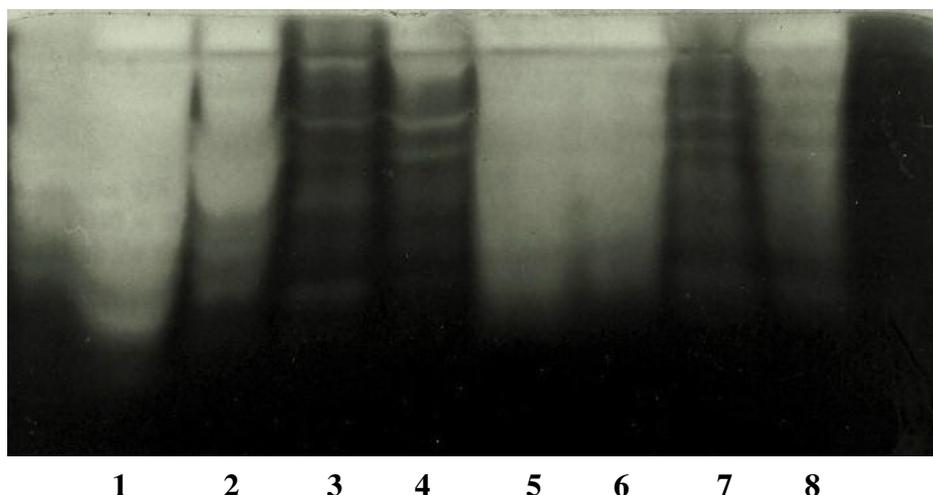


Figura 23 – PAGE-SDS (10%) com gelatina a 0,1% de amostras (4ug de proteína) do intestino médio (IM) e das fezes das larvas de *A. gematallis*. 1: IM das larvas alimentadas com dieta controle; 2: IM das larvas alimentadas com dieta contendo ApTI 0,5%; 3: IM do controle incubado com TLCK; 4: IM do ApTI 0,5% incubada com TLCK; 5: fezes das larvas alimentadas com dieta controle; 6: fezes das larvas alimentadas com dieta contendo ApTI 0,5%; 7: fezes das larvas do grupo controle incubado com TLCK e fezes das larvas alimentadas com dieta contendo ApTI 0,5% incubado com TLCK.

A Figura 24 ilustra a atividade em gel de acrilamida contendo gelatina das enzimas do tipo tripsina, de aproximadamente 24 kDa, presentes no IM das larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta controle (linha 1). Quando as larvas foram alimentadas com ApTI 1%, outra zona de atividade hidrolítica foi detectada no IM (linha 2) e a atividade nas fezes não sofreu alteração (linha 6). As linhas 3,4,7 e 8 mostram a ausência de atividade da enzima do tipo tripsina devido à presença de TLCK.

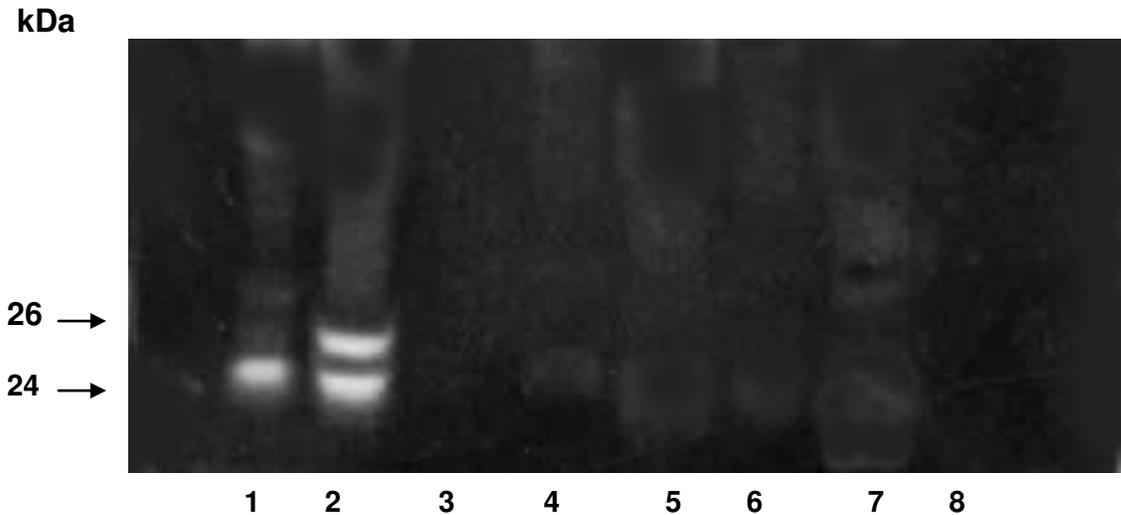


Figura 24 - PAGE-SDS (10%) com gelatina a 0,1% de amostras (5 ug de proteína) do intestino médio (IM) das fezes das larvas de *A. kuehniellar*. 1: IM das larvas alimentadas com dieta controle; 2: IM das larvas alimentadas em dieta contendo ApTI 1%; 3: IM do controle incubado com TLCK; 4: IM do ApTI 1% incubada com TLCK; 5: fezes das larvas alimentadas em dieta controle; 6: fezes das larvas alimentadas com dieta contendo ApTI 1%; 7: fezes do grupo controle incubado com TLCK; fezes do grupo alimentado com ApTI 1% incubados com TLCK. Setas: Atividade proteolítica na faixa de 24 kDa e 26 kDa.

10 - Efeito de ApTI no desenvolvimento de *A. kuehniella*

Esses experimentos foram realizados com intuito de avaliar a interferência do inibidor no desenvolvimento do inseto. O tempo de desenvolvimento larval e pupal das larvas alimentadas com dieta contendo ApTI 1% foi significativamente maior. O período larval foi prorrogado por 5 dias (Figura 25) e o período pupal por 10 dias (Figura 26), atrasando a pupação até por 20 dias, o que resultou em um longo período de desenvolvimento de larva a adulto. Como resultado, a taxa de emergência de insetos alimentados com ApTI 1% foi de apenas 28%, contrasta com a do controle de 80% (Figura 27). O tempo médio de desenvolvimento (em dias) foi bem maior na dieta contendo ApTI. O índice de HOWE foi de 0,0249 para a dieta artificial contendo ApTI, divergindo do valor de 0,0502 para a dieta artificial controle (Tabela 5), sugerindo que a primeira dieta não foi tão apropriada quanto a dieta sem o inibidor para o desenvolvimento de *A. kuehniella*.

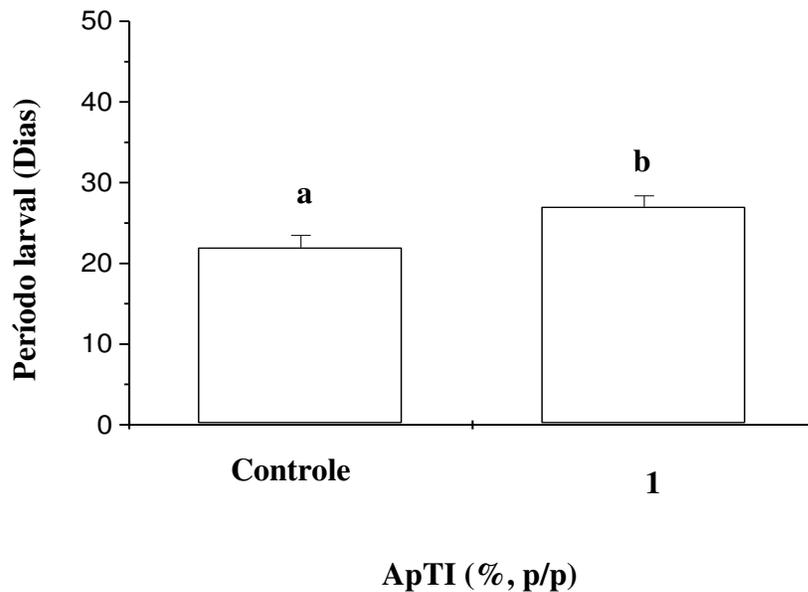


Figura 25 - Viabilidade larval de *A. kuehniella* alimentada com dieta controle e dieta contendo ApTI 1%. Cada valor representa a média \pm SD (n = 75), Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si.

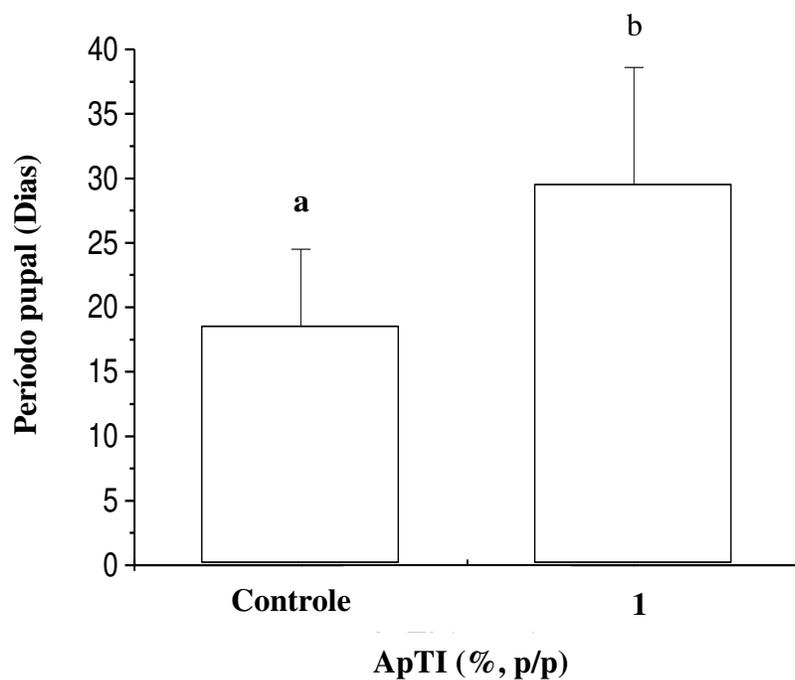


Figura 26 - Duração da fase pupal de *A. kuehniella* alimentada com dieta controle e dieta artificial contendo ApTI 1%. Cada valor representa a média \pm SD (n = 75). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si.

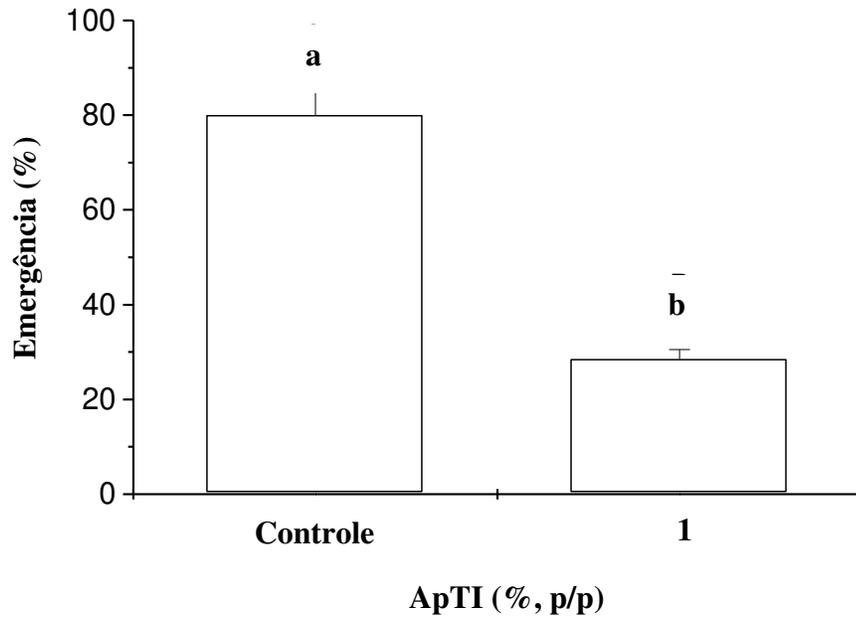


Figura 27 - Emergência de *A. kuehniella* alimentada com dieta controle e dieta artificial contendo ApTI 1%. Cada valor representa a média \pm SD (n = 75). Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si.

Tabela 5 - Efeito de ApTI 1% sobre o desenvolvimento de *A. kuenhiella*

Dieta^a	%S^b	T, dias^c	Log S^d/T
Controle	80,0 ± 8	37,9 ± 2.4	0,0502
ApTI	28,5 ± 4	58,4 ± 2.0	0,0249

Os valores são representados como media ±DP do número de experimentos. *P < 0.05 quando comparado ao controle correspondente (Student's t-test).

^a Ovos colocados sobre a dieta.

^b Sobrevivência durante o estágio adulto.

^c Tempo de eclosão dos ovos a formação de adultos.

^d Howe's index (1971).

VI - DISCUSSÃO

Em nosso estudo, a ação de um inibidor de tripsina de sementes de *Adenanthera pavonina* (ApTI) contra proteinases de diferentes lepidópteros foi analisada e os efeitos deste inibidor em larvas de *A. kuehniella* e *A. gemmatalis* foram observados. O estudo da atividade tóxica de ApTI foi verificado a partir da incorporação do inibidor purificado em dietas artificiais, com a finalidade de analisarmos os parâmetros de crescimento e desenvolvimento dos insetos. O inibidor foi utilizado na concentração de 0,5% em dieta artificial para *A. gemmatalis* e 1% em dieta artificial para *A. kuehniella*. Para efetivamente criar uma nova estratégia de controle de insetos com base em biocompostos (inibidores de enzimas, lectinas, quitinases, proteínas que se ligam a quitina e metabólitos secundários), seguida ou não por métodos de plantas transgênicas, é necessário conhecer a molécula alvo presente no sistema metabólico digestivo do inseto (SILVA *et al.*, 2006).

Os inibidores de proteinases (IPs) são encontrados amplamente em todo o reino vegetal, além de possuírem a função de regulação endógena, as atividades dos IPs também são direcionadas contra proteases exógenas, tipicamente as de insetos e microrganismos, tornando-os uma das estratégias de defesa das plantas contra pragas e patógenos (RYAN, 1990; VOLPICELLA *et al.*, 2009 ; FERRY *et al.*, 2005). Os IPs funcionam inibindo as proteinases do intestino médio dos insetos, atenuando a assimilação de nutrientes e afetando o desenvolvimento do inseto. Como uma estratégia de proteção das culturas, os genes que codificam os IPs de plantas têm sido utilizados para produzir plantas transgênicas resistentes (YANG *et al.*, 2009).

Os inibidores descobertos até agora são específicos para cada uma das quatro classes de enzimas proteolíticas e, com base no aminoácido ativo no seu sítio reativos, são classificados como inibidores de serinoproteinases, cisteinoproteinases, asparticoproteinases e inibidores de metaloproteinases (RICHARDSON, 1977). Entre estes, os inibidores de serinoproteinases são os mais estudados e têm sido isolados de sementes de diversas leguminosas (MACEDO & XAVIER-FILHO, 1992, MACEDO *et al.*, 2000, MELLO *et al.*, 2001, GARCIA *et al.*, 2004; BHATTACHARYYA *et al.*, 2006).

A estratégia de interferir na digestão e, conseqüentemente, afetar o estado nutricional do inseto, é amplamente discutida em plantas como um mecanismo de defesa contra as pragas e tem sido extensivamente revisada (GEORGE *et al.*, 2008). O complexo enzima-inibidor é muito estável e a inibição estequiométrica da enzima é alcançada. O inibidor não tem somente um efeito direto sobre o estado nutricional do inseto, ele também pode causar uma super produção de

enzimas digestivas, na tentativa de utilizar o alimento ingerido, resultando na limitação de aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas e, assim, redução no crescimento e desenvolvimento do inseto (RAMOS *et al.*, 2008).

As larvas fitófagas da maioria das espécies de lepidópteros analisadas até agora possuem os fluidos do intestino médio alcalino, com serinoproteinases e exopeptidases exercendo a maior parte da atividade proteolítica. O efeito de ApTI foi avaliado *in vitro* contra as proteinases de seis espécies de insetos-praga - *A. kuehniella*, *S. cereallela*, *S. frugiperda*, *D. saccharalis*, *A. gemmatalis* e *C. cephalonica*, todas pertencentes à ordem Lepidoptera, a fim de reforçar a hipótese geral de que os inibidores de serinoproteinases podem proteger as plantas contra insetos herbívoros.

As enzimas digestivas extraídas de larvas das seis espécies de lepidópteros foram inibidas em diferentes graus por ApTI. A atividade inibitória do ApTI foi ineficiente contra *S. cereallela* (Tabela 2). Resultado semelhante foi encontrado com PPTI (inibidor de tripsina de sementes de *Poecilante parviflora*), quando sua atividade inibitória foi testada contra as enzimas tripsina de *S. cereallela* (GARCIA *et al.*, 2007). A inibição substancial de proteinases do intestino de várias espécies de insetos em ensaios *in vitro*, sugere que o ApTI pode afetar o crescimento e/ou a sobrevivência desses insetos, quando incorporados em suas dietas.

Vários estudos têm demonstrado que os inibidores de proteinases são ativos contra enzimas de diferentes espécies de insetos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MOSOLOV *et al.*, 2001; RAHBÉ *et al.*, 2003). Com base nos estudos de inibição enzimática, ensaios de alimentação foram realizados para avaliar os potenciais efeitos inseticidas de ApTI. As concentrações de ApTI usadas (0,25-1%, p/p) corresponderam aos níveis expressos em sementes de leguminosas e foram similares as utilizadas em outros trabalhos (JONGSMAN E BOLTER, 1997; MACEDO *et al.*, 2004; RAMOS *et al.* 2008).

A. kuehniella é uma praga que se alimenta de uma ampla variedade de produtos estocados, tais como chocolate em pó, grãos secos, nozes, tabaco, coco e frutos secos. Sua ocorrência é observada na maioria das regiões temperadas e subtropicais do mundo (MACEDO *et al.*, 2003). Quando ApTI foi incorporado à dieta artificial de *A. kuehniella* a uma concentração de 1%, houve uma diminuição no ganho de peso e na sobrevivência larval em 50% (Figuras 9 e 11). Resultados similares foram obtidos por MACEDO *et al.* (2003), quando alimentaram larvas de *A. kuehniella* com dieta artificial contendo 1% do inibidor presente em *Peltophorum dubium*.

Anticarsia gemmatalis é uma das principais pragas desfolhadoras da cultura de soja (COURSEUIL *et al.* 1974, OLIVEIRA *et al.*, 1993). Para o controle dessa praga é utilizada uma

grande quantidade de inseticidas (KOGAN *et al.* 1977), tendo já sido estabelecidos tanto o elevado nível de dano econômico quanto a dificuldade da capacidade de recuperação da planta (OLIVEIRA *et al.* 1984).

As larvas de *A. gemmatalis* também foram afetadas pelo efeito do inibidor presente na dieta artificial na concentração de 0,5%, reduzindo o peso médio das larvas em 22% e a sobrevivência em 31% (Figuras 8 e 10). FRANCO *et al.* (2004) demonstraram que a presença de 500 μ M de SKTI na dieta oferecida a *Anthonomus grandis* causava uma diminuição de 75% no peso médio larval. RAMOS *et al.* (2008) demonstraram que 0,7% de inibidor de *Platymenia foliolosa* (PFIT) na dieta de *A. gemmatalis* reduziu significativamente a sobrevivência e o peso médio das larvas em 32,3% e 66,1%, respectivamente.

Os experimentos mostram que a incorporação de ApTI em dieta artificial não alterou a taxa de consumo, mas diminuiu a excreção de fezes das larvas de *A. kuehniella* por ca. 43% (Figuras 15 e 16). Para *A. gemmatalis*, houve uma redução de aproximadamente 17% no consumo de dieta e de 40% na quantidade de fezes excretadas (Figuras 13 e 14).

Os resultados obtidos nos ensaios *in vivo* refletem nos valores dos índices nutricionais (Tabela 3). O índice de eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) representa a habilidade do inseto em transformar o alimento ingerido em biomassa. Uma diminuição do ECI indica que uma maior quantidade de alimento está sendo utilizada para energia e pouco está sendo convertido em biomassa (KOUL *et al.*, 2003).

O índice de eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) é a estimativa da conversão do alimento que foi assimilado, ou seja, ECD diminui à medida que o alimento digerido é metabolizado para gerar energia (WHEELER & ISMAN, 2001).

Os resultados mostram que o ECI e ECD diminuíram quando um 1% de ApTI foi incorporado na dieta de *A. kuehniella*, significando, portanto, que nesta condição uma menor quantidade de alimento foi utilizada para a produção de biomassa, justificando menos peso larval e menor produção de fezes nos insetos. Resultados semelhantes foram observados por Ramos *et al.* (2009) quando incorporaram 0,7% de inibidor de *P. foliolosa* em dieta artificial de *A. kuehniella*. O valor da digestibilidade aproximada (AD) para as larvas de *A. kuehniella* foi aumentado ao longo do experimento, sugerindo que durante este tratamento, a dieta ficou por um tempo maior no intestino do inseto para permitir a desintoxicação causada pela proteína ApTI. A maior (AD) ajudaria a satisfazer a crescente demanda de nutrientes (NATHAN *et al.*, 2005a, b) e compensar a deficiência na conversão alimentar (redução do ECI e ECD), talvez por

desvio de energia para a produção de biomassa em desintoxicação (NATHAN & KALAIVANI, 2005). O custo metabólico (CM) dessa dieta foi maior que o da dieta controle, pois provavelmente uma quantidade maior de energia proveniente da dieta tenha sido utilizada no processo de degradação do inibidor presente e manutenção dos processos vitais do inseto.

Na dieta artificial de *A. gemmatalis*, contendo ApTI 0,5%, o índice de eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) não mostrou diferença significativa e a eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) foi menor. O custo metabólico (CM) do grupo teste foi maior do que o controle, pois provavelmente uma quantidade maior de energia tenha sido utilizada no processo de degradação do inibidor. A digestibilidade aparente (AD) também foi maior na dieta contendo ApTI 0,5. Comportamento similar foi observado por (MORDUE (LUNTZ) & BLACKWELL. (1993), RAMOS *et al.* (2008) e COELHO *et al.* (2007).

Em lepidópteros, a proteólise digestiva é predominantemente realizada por serinoproteinases, que tem máxima atividade em pH alcalino. Estas proteinases são tripsina, quimiotripsina e elastase. Apesar das enzimas tipo tripsina do intestino médio estarem presentes na maioria das espécies de lepidópteros, existe uma variação nos perfis das enzimas digestivas entre as diferentes espécies. A inibição da atividade enzimática dos insetos interfere no crescimento e na absorção de nutrientes. Estes inibidores podem também causar uma super produção de enzimas digestivas, tentativa de sobrepujar a ação do inibidor sobre o alimento ingerido, resultando limitação de aminoácidos essenciais para a síntese protéica e, portanto, redução do crescimento e desenvolvimento do inseto (GATEHOUSE *et al.*, 2000, 2009).

O uso dos inibidores de proteinases para proteger a planta contra insetos-praga é, porém, complicado dado a capacidade dos insetos em contornar estas defesas vegetais. Evidências bioquímicas e moleculares indicam que alguns insetos podem adaptar-se à presença de inibidores de proteinases superexpressando proteinases digestivas (LOPES *et al.*, 2004). Outros se adaptam aos inibidores de proteinases aumentando a atividade digestivas (PAULILLO *et al.*, 2000; BRITO *et al.*, 2001) e outros ainda seletivamente induzem inibidores de proteases insensíveis (CLOUTIER *et al.*, 2000).

Nossos resultados sugerem que *A. kuehniella* não se adaptou ao inibidor, pelo menos até o quarto instar da primeira geração. As larvas de 4º instar, mantidas em dieta contendo ApTI 1%, mostraram aumento na atividade da tripsina no intestino médio e manutenção dessa atividade nas fezes (Figuras 19, 20 e 24). O aumento na atividade tríptica pode ser confirmado com o aparecimento de uma banda de proteína (~ 26 kDa), sugerindo a síntese de uma nova iso/enzima

em resposta ao efeito do ApTI da dieta. No entanto, esta iso/enzima é provavelmente uma serinoproteinase sensível ao ApTI, porque as larvas alimentadas com dieta contendo o inibidor continuaram com o desenvolvimento prejudicado.

Foi constatado no intestino médio das larvas de *A. gemmatalis* que a atividade das enzimas do tipo tripsina foi reduzida devido à presença do inibidor na concentração de 0,5%, já que a produção de nmol de BApNA hidrolisado foi menor (Figura 17). Uma diminuição na atividade trípica das fezes também foi observado (Figura 18). Esses resultados foram confirmados por PAGE-SDS contendo gelatina (Figura 23). PURCELL *et al.* (1992) observaram que SKTI, um inibidor de soja, capaz de inibir a atividade proteolítica de vários lepidópteros, tais como *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Choristoneura occidentalis* e coleópteros como o gorgulho do algodão *Anthonomus grandis*. BATTACHARYYA *et al.* (2007) demonstraram que um inibidor de tripsina de *Archidendron ellipticum* (AeTI) diminuiu significativamente a atividade de enzimas tripsina-like de larvas de *Spodoptera litura*, depois de alimentadas com uma dieta contendo 150 μ M desse inibidor.

Conclui-se que ApTI apresenta efeito tóxico sobre as larvas de *A. kuehniella* e *A. gemmatalis*, uma vez que este inibidor pode bloquear as enzimas envolvidas na digestão destes insetos (Figura 21 e 22). Os resultados das figuras 21 e 22 sugerem que as enzimas das larvas alimentadas com ApTI continuam sensíveis à ação do inibidor quando incubado no ensaio.

A atividade em gelatina das enzimas do intestino médio e das fezes de larvas alimentadas com dietas artificiais (Figura 23 e 24), além de reforçar os resultados mostrados nas Figuras, 17, 18, 19 e 20, confirma a atividade de enzimas do tipo tripsina. Resultados semelhantes foram obtidos por RAMOS *et al.* (2008); COELHO *et al.* (2007).

O efeito de ApTI no desenvolvimento de *A. kuehniella* foi avaliado com o intuito de verificar se o inibidor interfere nos estágios de desenvolvimento do inseto. Em relação ao efeito de ApTI 1% no desenvolvimento de *A. kuehniella*, pode ser verificado que o tempo de desenvolvimento larval e pupal com a dieta contendo o inibidor foi significativamente maior em relação aos verificados com a dieta controle. O período larval foi prorrogado por 5 dias (Figuras 25) e o período pupal 10 dias mais longo (figura 26), atrasando, assim, a pupação em até 20 dias, o que resultou em um longo período de desenvolvimento de larva a adulto. Como resultado, a taxa de adultos sobreviventes (emergência) comparado a do grupo controle diminuiu 80% (Figura 27). O percentual de sobreviventes adultos (% S) diminuiu 62%, o tempo médio de desenvolvimento em dias foi bem maior na dieta contendo ApTI. O índice de Howe foi de 0,0249 para a dieta contendo ApTI, contrastando com o valor de 0,0502 para a dieta controle (Tabela 4),

sugerindo que a dieta com ApTI não foi adequada como a dieta sem o inibidor para o desenvolvimento de *A. kuehniella*.

Diante dos resultados verificados, pode ser concluído que o inibidor de tripsina da família Kunitz de sementes de *A. pavonina*, é tóxico para *A. kuehniella* e *A. gemmatilis*, podendo, no futuro, ser utilizado como um método alternativo ao combate destes insetos praga, através do uso da Biotecnologia Vegetal.

VII – CONCLUSÃO

- ✓ ApTI reduziu significativamente a sobrevivência e o peso das larvas de *A. kuehniella* e *A. gemmatalis*;
- ✓ ApTI alterou o perfil da atividade proteolítica dos fluidos do intestino médio das larvas de *A. kuehniella* e *A. gemmatalis*;
- ✓ Os índices nutricionais apresentaram taxas diferentes, redução no ECI e ECD e aumento de CM e AD em *A. kuehniella* ;
- ✓ Os índices nutricionais para *A. gemmatalis* apresentaram redução no ECD e aumento de CM e AD;
- ✓ Enzimas do intestino médio de *A. kuehniella* e *A. gemmatalis* expostas novamente ao inibidor, continuam sensíveis ao ApTI;
- ✓ ApTI alterou o desenvolvimento de *A. kuehniella*;

VIII – REFERÊNCIAS

- ABDEEN, A.; VIRGÓS, A.; OLIVELLA, E; VILLANUEVA, J; AVILÉS, X.; GABARRA, R; PRAT, S. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**. v. 57, p. 189 - 202. 2005.
- ABE, K.; EMORI, Y; KONDO, H; SUZUKI, K.; ARAI, S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. **Journal of Biological Chemistry**. v. 262, p. 16793-16797. 1987.
- ABE, M; ABE, K.; DOMOTO, C; ARAI, S. Two distinct species of corn cystatin in corn kernels. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 59, p. 756-758. 1995.
- ALFONSO-RUBI', J; ORTEGO, F; CASTAN'ERA, P; CARBONERO, P; DI 'AZ,I. Transgenic expression of trypsin inhibitor CMe from barley in indica and japonica rice, confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*. **Transgenic Research**. v. 12, p. 23 - 31. 2003.
- APPLEBAUM, S. W. Biochemistry of Digestion. In: **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Farmacology**, eds., Kerkut, G. A. & GILBERT, L. I. New York. v. 4, p.279- 311.1985.
- ASHOURI, A; OVERNEY, S; MICHAUD, D; CLOUTIER, C. Fitness and feeding are affected in the two-spotted stinkbug, *Perillus bioculatus*, by the cysteine proteinase inhibitor, oryzacystatin I. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 38, p. 74-83. 1998.
- BALDWIN, I.T. & PRESTON, C.A. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. **Planta**. v. 208, p. 137 - 145. 1999.
- BELITZ, H.D. & WEDER, J.K.P. Protein inhibitor of hydrolases in plant foodstuffs. **Food Rev. Int.** v.6, p. 151-211. 1990.

- BHATTACHARYYA, A.; MAZUMDAR, S.; LEIGHTON, S.M. BABU, C.R.. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization, and kinetic properties. **Phytochemistry**. v. 67, p. 232-241. 2006.
- BHATTACHARYYA, A; SUDESHNA, M.L.B; BABU, C.R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v.145, p. 669 - 677. 2007.
- BLANCO-LABRA, A; CHAGOLLA-LOPEZ, A; GALLARDO, M; RODRÍGUEZ, V. Further characterization of the 12kDa proteases/alpha amylase inhibitor present in maize seeds. **Food Nutrition Press**. v. 3, p. 27- 41. 1995.
- BOLTER, C.J. & JONGSMA, M.A. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors in potato leaves by methyl jasmonate. **Jounal Insect Physiology**. v.41, p. 1071 - 1078. 1995.
- BOULTER, D. **Biochemistry**. v. 34, p. 1453–1466. 1993.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v.72, p. 248 – 254.1976.
- BRAVO, A; GILL, S.S; SOBERO, N.M. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon** .v.49, p. 423–435. 2007.
- BRITO, L.O; LOPES, A.R; PARRA, J.R.P; TERRA, W.R; SILVA-FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by synthesis of new proteinases. **Comparative Biochemistry Physiology**. v. 128, p.365–375. 2001.

- BROADWAY, R.M. AND VILLANI, M.G. Does host range influence susceptibility of herbivorous insects to novel plant proteinase inhibitors? *Entomologia Experimentalis et Applicata*. V.76, p.303 – 313. 1995.
- BROADWAY, R.M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *Journal Insect Physiol.* v. 43, p.855-874. 1997.
- BROADWAY, R.M; DUFFEY, S.S. The effect of plant protein quality on toxicity of plant proteinase inhibitors. *Journal Insect Physiology*. v.34, p. 1111-1117. 1986.
- BRZIN, J. & KIDRIC, M. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. *Biotechnology. Genetic. Eng. Rev.* v.13, p. 420-467. 1995.
- BUENO, R.C.O.F; Bases biológicas para utilização de *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: trichogrammatidae) para controle de *Pseudoplusia includens* (Walker, 1857) e *Anticarsia gemmatalis* Hubner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) em soja. Piracicaba. p.22 - 24.2008.
- BURKILL, I.H. A dictionary of the economic products of the Malay Peninsula. *Governments of Malaysia and Singapore*, Kuala Lumpur, Malaysia.1966.
- CARLINI, C.R. & GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, v. 40, p. 1515-1539. 2002.
- CARLINI, C.R. & UDEDIBIE, A.B. Comparative effects of processing methods on hemagglutinating and antitryptic activities of *Canavalia ensiformis* and *Canavalia braziliensis* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 45, p. 4372-4377. 1997.
- CASARETTO, J.A; ZUNIGA, G.E; CORCUERA, L.J. Abscisic acid and jasmonic acid affect proteinase inhibitor activities in barley leaves. *Journal Plant Physiology*. v.161, p.389 - 396. 2004.

- CHRISPEELS, M.J. & RAIKHEL, N.V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**. v. 3, p. 1 - 9. 1991.
- CHRISTELLER, J.T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. **FEBS Journal**. v. 272, p.5710 - 5722. 2005.
- CHRISTELLER, J.T., LAING, W.A., MARKWICK, N.P., BURGESS, E.P.J.. Insect **Biochemistry. Mol. Biol.** v.22, p. 735 - 746. 1992.
- CHYE, M.L; SIN, S.F; XU, Z.F; YEUNG, E.C. Serine proteinase inhibitor proteins:exogenous and endogenous functions. **In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant** v. 42, p. 100 - 108. 2006.
- CLARK, J.M; YAMAGUCHI, I. Scope and Status of Pesticide Resistance. **American Chemical Society Washington, DC**. 2002.
- CLEMENTE, A., GEE, J.M; JOHNSON, I.T; MACKENZIE, D.A; DOMONEY, C. Pea (*Pisum sativum L.*) protease inhibitors from the Bowman-Birk class influence the growth of human colorectal adenocarcinoma HT29 cells in Vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.53, p.8979 - 8986. 2005.
- CLOUTIER, C; JEAN, C ; FOURNIER, M ; YELLE, S ; MICHAUD, D. Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata*, compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over-production of insensitive proteases. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** v.44, p.69 - 81. 2000.
- COELHO, M. B; MARANGONI, S; MACEDO, M.L. Insecticidal action of Annona coriacea lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v.146, p. 406–414.2007.
- COHEN, E. Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 22, p. 245-261. 1993.

- CORSEUIL, E., F.Z. CRUZ & L.M.C. MAYER. Insetos nocivos à soja no Rio Grande do Sul. UFRGS, **Porto Alegre**. P.36. 1974.
- DE LEO, F; BONADÉ-BOTTINO, M; CECI, L.R; GALLERANI, R; JOAUNIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 593 - 602. 2001.
- DE LEO, F; VOLPICELLA, M; LICCIULLI, F; LIUNI, S; GALLERANI, R; CECI, L.R. Plant-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. **Nucleic Acids Res.** v.30, p. 347- 348. 2002.
- DE VOS, M; VAN ZAAANEN, W; KOORNNEEF, A; KORZELIUS, J.P; DICKE, M; VAN LOON, L.C; PIETERSE, C.M.J. Herbivore-induced resistance against microbial pathogens in Arabidopsis. **Plant Physiol.** v.142, p.352 - 363. 2006.
- DUAN, X.; LI, X.; XUE, Q; ABO-EI-SAAD, M; XU, D. and WU, R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. **Nature Biotechnology.** v. 14, p. 494 - 498. 1996.
- ERLANGER, B.F; KOKOWSKY, N; COHEN, W. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** v. 95, p. 271 - 278. 1961.
- FALCO, M.C; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry.** v. 41, p.761 - 766 . 2003.
- FAN, S.G. & WU, G.J. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, p.273 - 292. 2005.
- FERNANDES, K.V.S; SABELLI, P.A; BARRATT, D.H.P; RICHARDSON, M; XAVIER-FILHO, J; SHEWRY, P.R. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related

to levels of cysteine proteinase - inhibitors. **Plant Molecular Biology**, v. 23, 215 - 219. 1993.

FERRY, N; JOUANIN, L; CECI, L.R; MULLIGAN, E.A; EMAMI, K., GATEHOUSE, J.A; GATEHOUSE, A.M. Impact of oilseed rape expressing the insecticidal serine protease inhibitor, mustard trypsin inhibitor-2 on the beneficial predator *Pterostichus madidus*. **Molecular Ecology**. v.14, p.337- 349. 2005.

FRANCO, O.L; DIAS, S.C; MAGALHÃES, C.P; MONTEIRO, A.C.S; BLOCH-JR, C; MELO, F.R; OLIVEIRA-NETO, O.B; MONNERAT, R.G; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry**. v. 65, p. 81-89. 2004.

FRANCO, O.L; SANTOS, R.C; BATISTA, J.A; MENDES, A.C; ARAÚJO, M.A.M; MONNERAT, R.G; GROSSI-DE-SÁ, M.F; FRIETAS, S.M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, v. 63, p.343 - 349. 2003.

GALLO, D; NAKANO, O; NETO, S.S; CARVALHO, R.P.L; BATISTA, G.C; FILHO, E.B; PARRA, J.R.P; ZUCCHI, R.A; ALVES, S.B; VENDRAMIM, J.D; MARCHINI, L.C; LOPES, J.R.S; OMOTO, C. **Entomologia Agrícola**, v. 10 FEALQ. 2002.

GARCIA, V.A; FREIRE, M.G; NOVELLO, J.C; MARANGONI, S; MACEDO, M.L. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. **Protein Journal**. v. 23(5), p.343 - 50.2004.

GARCIA-OLMEDO, F; SALCEDO, G; SANCHEZ-MONGE, R; GOMEZ, L; ROYO, J; CARBONERO, P. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and α -amylases. **Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology**. v.4, p. 275 - 334. 1987.

GATEHOUSE, A.M.R; GATEHOUSE, J.A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect resistant transgenic crops. **Pesticide Science**. v. 52, p.165 - 175. 1998.

- GATEHOUSE, A.M.R; NORTON E; DAVISON, G.M; BABBE, S.M; NEWELL, C.A;
GATEHOUSE, J.A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo, **Journal of Insect Physiology**. v. 45, p. 545 - 558. 1999.
- GATEHOUSE, J.A; GATEHOUSE, A.M.R; AND BOWN, D.P. Control of phytophagous insect pests using serine proteinase inhibitors, in *Recombinant Protease Inhibitors in Plants*, ed. by Michaud D. Eureka.com, Georgetown, TX, p. 9-26. 2000.
- GATEHOUSE, L.N; SHANNON, A.L; BURGESS, E.P.J; CHRISTELLER, J.T.
Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitor in diet. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 27 - 11, p. 929-944. 1997.
- GEOFFROY, P; LEGRAND, M; FRITING, B. Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.3, p.327 - 333. 1990.
- GEORGE, D; FERRY, N; BACK, EJ; GATEHOUSE, AMR. Characterisation of midgut digestive proteases from the maize stem borer *Busseola fusca*. **Pest Management Science**. v.64, p.1151 - 1158. 2008.
- GIRARD, C; MÉTAYER, M.L; BONADÉ-BOTINO, M; DELEGUÈ, M.P; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 28, p. 229 - 237. 1998a.
- GIRI, A.P; HARSULKAR, A.M; DESHPANDE, V.V; SAINANI, M.N; GUPTA, V.S;
RANJEKAR, P.K. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. **Plant Physiology**. v. 116, p. 393 - 401. 1998.
- GOMES, A.P.G; DIAS, S.C; BLOCH JR, C; MELO, F.R; FURTADO-JR, J.R; MONNERAT, R.G; GROSSI-DE-SÁ, M.F; FRANCO, O.L. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus*

- grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. **Comparative Biochemistry and Physiology B**. v. 140, p. 313 - 319. 2005.
- GRAHAM, J.S. & RYAN, C.A. Accumulation of a metallo-carboxypeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants. **Biochemistry Biophysics Research Communications**, v. 101, p. 1164 - 1170. 1981.
- HABIBI, J; BACKUS, E.A; HUESING, J.E. Effects of phytohemagglutinin (PHA) on structure of midgut epithelial cells and localization of its binding sites in western tarnished plant bug, *Lygus hesperus* Knight. L. **Insect Physiol.** v.46, p. 611- 619. 2000.
- HAQ, S.K.; ATIF, S.M; KHAN, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 431, p. 145 - 159. 2004.
- HARTMANN, T. Plant-derived secondary metabolites as defensive chemicals in herbivorous insects: a case study in chemical ecology. **Planta**. v. 219, p.1 - 4. 2004.
- HILDER, V. A. *et al.* A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**. v.330, p.160 - 163, 1987.
- HILDER, V.A; GATEHOUSE, A.M.R; SHEERMAN, S.E; BARKER, R.F; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**. v. 300. 1987.
- HOWE, R.W, 1971. A parameter for expressing the suitability of an environment for insect development. **Journal of Stored Products Research** .v.7, p.63 - 65.
- ISHIMOTO, M., SATO, T; CHRISPEELS, M.J. & KITAMURA, K. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 79, p.309 - 315. 1996.

- JANY, K.D; BEKELAER, K; PFLEIDER, G; ISAHAY, J. Amino acid sequence of an insect chymotripsin from the larvae of the hornet, *Vespa orientalis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 110, p.1 - 7. 1983.
- JANY, K.D; HAUG, H.; PFLEIDER, G; ISAHAY, J. Enzymatic and chemical properties of an endopeptidases from the larva of the hornet, *Vespa crabro*. **Biochemistry**. v. 17, p. 4675 - 4682. 1978.
- JOHNSTON, K.A; LEE, M.J; BROUGH, C; HILDER, V.A; GATEHOUSE, A.M.R; GATEHOUSE, J.A. Proteinase activities in the larval midgut of *Heliothis virescens*: Evidence for trypsin and chymotripsin-like enzymes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 25, p. 375 - 383. 1995.
- JONGSMA, M.A; BAKKER, P.L; PETERS, J; BOSCH, D; STIEKEMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibitor. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v. 92, p. 8041 - 8045. 1995.
- JONGSMAN, M. A; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**. v.43, p.885 - 895. 1997.
- JOUANIN, L; BONADE'-BOTTINO, M; GIRARD, C; MORROT, G; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**. v. 131, p.1 - 11. 1998.
- KENNEDY, A.R. Chemo preventive agents: protease inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 78, p.167 - 209. 1998.
- KING, E.G; BULL, D.L; SAUNDERS, J.L. **Las plagas invertebradas de cultivos anuales em America Central**. London: Overseas Development Administration. p.1 - 10.1985.
- KITAJIMA, E.W. A peculiar type of glycocalyx on the microvilli of the midgut epithelial cells of the thrips *Frankliniella* sp. (*Thysanoptera, Thripidae*). **Cytobiology**. v.11, p. 299 - 303. 1975.

- KOGAN, J; SELL, D.K.; STINNER, R.E; BRADLEY; KOGAN, M.V. Bibliography the *Heliothis zea* (Boddie) and *Heliothis virescens* (F) (Lepidoptera: Noctuidae). **International Soybean Program**. v. 17. 1978.
- KOIWA, H; BRESSAN, R.A; HASEGAWA, P.M. Regulation of proteinase inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**. v. 2, p. 379 - 384. 1997.
- KONAREV, A.V; LOVEGROVE, A; SHEWRY, P.R. Serine proteinase inhibitors in seeds of *Cycas siamenis* and other gymnosperms. **Phytochemistry**. v. 69, p. 2482 - 2489. 2008.
- KOUL, O; MULTANI, D.W.M; GUMULCA J.S; SINGH, M.G. Antifeedant effects of the limonoids from *Entandrophragma candolei* (Meliaceae) on the gram pod borer, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.51, p.7271 - 7275.2003.
- KUBO, C.E.G. Efeito de um inibidor de proteinase serínica sobre o desenvolvimento e atividade enzimática de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Campinas. 2007.
- KURODA, M; ISHIMOTO, M; SUZUKI, K.; KONDO, H; ABE, K.; KITAMURA, K.; ARAI, S. Oryzacystatins exhibit growth-inhibitory and lethal effects on different species of bean insect pests *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) and *Riptortus clavatus* (Hemiptera). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 60, p. 209-212. 1996.
- KURODA, M; KIYOSAKI, T; MATSUMOTO, I; MISAKA, T; ARAI, S; ABE, K. Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**.v. 65, p. 22 - 28. 2001.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. **Nature**, London, v.277, p.680 - 685. 1970.
- LANE, N.J; HARRISON, J.B. An unusual cell surface modification: a double plasma membrane. **Journal of Cell Science**. v.39, p.355 - 372. 1979.

- LASKOWSKI JR., M; QASIM, M.A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1477, p.324 - 337. 2000.
- LASKOWSKI, M.J. & KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**. v. 49, p. 593 - 626. 1980.
- LAWRENCE, P.K; KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**. v. 5, p. 93 - 109. 2002.
- LECARDONNEL, A; CHAUVIN, L; JOUANIN ,L; BEAUJEAN, A; PREVOST, G; SANGWAN-NORREEL, B.S. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. **Plant Science**. v. 140, p.71 - 79. 1999.
- LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. *A. Rev. Entomol.*, 42: 525-550. 1997.
- LEMOS, F.J.A. & TERRA, W.R. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.22, p. 613 - 619. 1992.
- LI, H; TANGA, H; SIVAKUMAR, PHILIP, S.J; HARRISONC, R.L; GATEHOUSE, J. A; BRYONY C. BONNING. Insecticidal activity of a basement membrane degrading protease against *Heliothis virescens* (Fabricius) and *Acyrtosiphon pisum* (Harris). **Journal of Insect Physiology**. v. 54, p.777 - 789.2008.
- LIM, C.O.; LEE, S.I.; CHUNG, W.S.; PARK, S.H.; HWANG, I.; CHO, M.J. Characterization of a cDNA encoding cysteine proteinase inhibitor from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) flower buds. **Plant Molecular Biology**, v. 30, p. 373-379. 1996.
- LINGARAJU, M.H; GOWDA, L.R. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfite bridge. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1784, p.850 - 855. 2008.

- LIPKE, H; FRAENKEL, G.S; LIENER, I. Effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 2, p. 410 - 414.1954.
- LOPES, A.R; JULIANO, M.A; JULIANO, L; TERRA, W.R. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. 55,140 - 152. 2004.
- LORENZI, H. Árvores brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil. **Editora Plantarum LTDA**, 1. (1992).
- MACEDO, M. L. R; SILVA, D. S; FREIRE, M.G.M; DURIGAN R.A; MARANGONI, S; PARRA. J. R. P. Effect of a Trypsin inhibitor on Growth, Development, and Trypsin Activity of Larval *Anagasta kuehniella*(Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Insect Biochemistry & Physiology**. p.1- 64.2009.
- MACEDO, M.L.R; FERNANDES, K.V.S; SALES, M.P; XAVIER-FILHO, J. Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds, which are susceptible or resistant to the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**v. 26. p.183 - 190.1995.
- MACEDO, M.L.R; FREIRE, M.G.M; CABRINI, E.C; TOYAMA, M.H; NOVELLO, J.C; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biochimica et Biophysica Acta**. 1621, 170 - 182. 2003b.
- MACEDO, M.L.R; MATOS, D.G.G; MACHADO, O.L.T; MARANGONI, S; NOVELLO, J.C. Trypsin inhibitors from *Dimorphandra mollis* seeds: Purification and Properties. **Phytochemistry**. v. 54, p. 553 - 558. 2000.
- MACEDO, M.L.R; MELLO, G.C; FREIRE, M.G.M; NOVELLO, J.C; MARANGONI, S; MATOS, D.G.G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 40, p. 891-898. 2002.

- MACEDO, M.L.R; XAVIER-FILHO, J. Purification and characterization of trypsin inhibitors from seeds of *Clitoria ternatea*. **Science of Food and Agriculture**. v.58, p.55 - 58. 1992.
- MACEDO, M.R.L; SÁ, C.M; FREIRE, M.G.M; PARRA, J.R.P. A Kunitz-Type Inhibitor of Coleopteran Proteases, Isolated from *Adenanthera pavonina* L. Seeds and Its Effect on *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 2533 - 2540. 2004.
- MARCHETTI, S; DELLEDONNE, M; FOGHER, C; CHIABA, C; CHIESA, F; SAVAZZINI, F; GIORDANO, A. Soybean Kunitz, C-II and PIIV inhibitor genes confer different levels of insect resistance to tobacco and potato transgenic plants.**Theoretical and Applied Genetics**. v. 101, p. 519 - 526. 2000.
- MARES, M; MELOUN, B; PAVLIK, M; KOSTKA, V; BAUDYS, M. Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. **FEBS Letters**. v. 251, p. 94-98. 1989.
- MCMANUS, M.T. & BURGESS, E.P.J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive protease of the larvae of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**. v. 41, n. 9, p. 731-738. 1995.
- MELLO, G.C; OLIVA, M.L.V; SUMIKAWA, J.T; MACHADO, O.L.T; MARANGONI, S; NOVELLO, J.C; MACEDO, M.L.R. Purification and Characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. **Journal of Protein Chemistry**. v.20, p. 625 - 632. 2001.
- MEYER, J.R; ENT 425 Home Page. Disponível em: <http://www.cals.ncsu.edu/course/ent425/index.html>.2006.
- MICKEL, C.E. & STANDISH, J. Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum*. **University of Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin**. v. 178, p. 1-20. 1947.

- MISAKA, T; KURODA, M; IWABUCHI, K.; ABE, K.; ARAI, S. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. **European Journal of Biochemistry**. v. 240, p. 609-614. 1996.
- MORDUE (LUNTZ), A; BLACKWELL, A.J. Azadirachtin: an update. **Journal of Insect Physiology**. v.39, p.903 - 924. 1993.
- MOSOLOV, V.V. & VALUEVA, T.A. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. **Prikl Biokhim Mikrobiol**. v.41, p. 261 - 82. 2005.
- MOSOLOV, V.V; GRIGOR'EVA, L.I; VALUEVA, T.A. Plant proteinase inhibitors as polyfunctional proteins (a review). **Prikl Biokhem Mikrobiol**. v.37, p. 643 - 50. 2001.
- MOSOLOV, V.V; VALUEVA, T.A. Participation of proteolytic enzymes in the interaction of plants with phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry**. v.71, p.838 - 845. 2006.
- MURDOCK, L.L; BROOKHART, G; DUNN, P.E; FOARD, D.E; KELLEY, S; KITCH, L; SHADE, R.E; SHUKLE, R.H; WOLFSON, J.L. **Comparative Physiology and Biochemistry**. v. 87, p.783 - 787. 1987.
- NANDEESHA, P. & PRASAD, D.T. Characterization of serine proteinase inhibitor from subabul (*Leucaena leucocephala* Lam) seeds. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**. v. 10, p. 75-78. 2001.
- NATHAN, S.S; KALAIVANI, K. Efficacy of nucleopolyhedrovirus (NPV) and azadirachtin on *Spodoptera litura* Fabricius (Lepidoptera: Noctuidae). **Control from Biology**. v. 34, p. 93 - 98. 2005.
- NATHAN, S.S; KALAIVANI, K.; MURUGAN, K.; CHUNG, P.G. Efficacy of neem limonoids on *Cnaphalocrocis medicinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae) the rice leafholder. **Crop Protection**. v.24, p.760 - 763. 2005a.

- NEURATH, H. Proteolytic processing and physiological regulation. **Trends in Plant Science**. v.14, p.268 - 271. 1989.
- NORIOKA, N., HARA, S., IKENAKA, T. ABE, J., Distribution of the Kunitz and Bowman-Birk family proteinase inhibitor in Leguminosae seeds. **Agric. Biol. Chem.** v. 52, p. 1245–1252. 1988.
- OERKE, E.C; DEHNE, H.W; SCHONBECK, F; WEBER, A. Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops. **Elsevier**, Amsterdam. 1994.
- OJIMA, A; SHIOTA, H; HIGASHI, K.; KAMADA, H; SHIMMA, W; ADAMASATA, P; SATOH, S. An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell cultures and seeds of carrot. **Plant Molecular Biology**. v. 34, p. 99-109. 1997.
- OLIVA, M.L.V; SOUZA-PINTO, J.C; BATISTA, I.F; ARAUJO, M.S; SILVERIA, V.F; AUERSWALD, E.A; MENRELE, R; ECKERSKORN, C; SAMPAIO, M.U. Sampaio, *Leucena leucocephala* serine protease inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema, **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 147, p. 64 - 74. 2000.
- OLIVEIRA, A.S; MIGLIOLO, L; AQUINO, R.O; RIBEIRO, J.K.C; MACEDO, L.L.P; ANDRADE, L.B.S; BEMQUERER, M.P; SANTOS, E.A; KIYOTA, S; DE SALES, M.P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pés. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.10 - 11, p.858-865.Published: OCT.
- OLIVEIRA, A.S; MIGLIOLO, L; AQUINO, R.O; RIBEIRO, J.K.C; MACEDO, L.L.P; ANDRADE, L.B.S; BEMQUERER, M.P; SANTOS, E.A; KIYOTA, S.P. Purification and characterization of a trypsin papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pest. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.45, p.858 - 865.

- OSBORN, T.C; ALEXANDER, D.C; SUN, S.S.M; CARDONA, C; BLISS, F.A. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. **Science**. v. 240, p. 207 - 210. 1988.
- PAES, N.S; GERHARDT, I.R; COUTINHO, M.V; YOKOYAMA, M; SANTANA, E; HARRIS, N; CHRISPEELS, M.J; GROSSI-DE-SÁ, M.F. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. **Journal Insect Physiol**. v.46, p. 393 - 402. 2000.
- PANIZZI, A.R. & PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. Ecologia nutricional de insetos e suas aplicações no manejo de pragas. São Paulo: **Editora Manole LTDA**. Capítulo II, p. 9 - 65. 1991.
- PANIZZI, A.R. Manejo integrado de pragas da soja no Brasil. In: CROCOMO, W.D. (Ed). **Manejo integrado de pragas**. São Paulo: ícone, cap.15, p.293 - 321.1990.
- PANIZZI, A.R; CORREA-FERREIRA, B. Dynamics in the insect fauna adaptation to soybean in the tropics. **Trends in Entomology**. Trivandrum. v.1, p.71 - 88.1997.
- PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. 3ª edição. Piracicaba: **FEALQ**, p. 137. 1996.
- PAULILLO, L.C.M.S ; LOPES, A.R ; CRISTOFOLETTI, P.T ; PARRA, J. R. P ; TERRA, W.R ; SILVA-FILHO, M.C. Changes in midgutendopeptidases activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**. v. 93, p.892 - 896. 2000.
- PEREIRA, R.A; BATISTA, J.A.N; SILVA, M.C.M; OLIVEIRA-NETO, O.B; FIGUEIRA, E.L.Z; JIMÉNEZ, A.V; GROSSI-DE-SÁ, M.F. An α -amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). **Phytochemistry**, v. 67, p. 2009 - 2016. 2006.
- PETERS, W. Peritrophic membranes. In Zoo Physiology. Vol. 30, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 1992.

- PILON, A. M; OLIVEIRA, M. G. A; GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity and postembryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsininhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v.86, n.1, p.23 - 29, 2006.
- POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatrea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 99, p. 79 - 85. 2001.
- PURCELL, J.P; GREENPLATE, J.T; SAMMONS, R.D. Insect **Biochemistry and Molecular Biology**. v.22, p. 41 - 47. 1992.
- RAHBE´, Y; FERRASON, E; RABESONA, H; QUILLIEN, L. Toxicity to the pea aphid *Acythosiphon pisum* of anti-chymotrypsin isoforms and fragments of Bowman-Birk protease inhibitors from pea seeds. **Biochemistry and Molecular Biology**. v.33, p.299 - 306. 2003.
- RAKWAL, R e AGRAWAL. G.K., JWA. N.S. Characterization of a rice (*Oryza sativa L.*) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to phosphatase 2^a inhibitors. **Gene**. v.263, p.189 - 198.2001.
- RAMESHWARAM, N.R; NADIMPALLI, S.K. An efficient method for the purification and quantification of a galactose-specific lectin from vegetative tissues of *Dolichos lablab*. **Journal of Chromatography B**. v.861, p.209 - 217. 2008.
- RAMOS, V.S; FREIRE, M.G.M; PARRA, J.R.P; MACEDO, M.L.R. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* (Benth.) seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Zeller). **Comparative Biochemistry and Physiology**, (accepted in oct. 2008), 2008b.

- RAMOS, V.S; SILVA, G.S; FREIRE, M.G.M; PARRA, J.R.P; MACEDO, M.L.R. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 10, p.11348 - 1155. 2008.
- RANCOUR, J.M. & RYAN, C.A. Isolation of a carboxypeptidase B inhibitor from potatoes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 380 - 383. 1968.
- RANJEKAR, P.K., PATANKAR, A., GUPTA, V., BHATNAGAR, R., BENTUR, J., KUMAR, P.A. Genetic engineering of crop plants for insect resistance. **Current Science**. v. 84, p. 321 - 329. 2003.
- REECK, G.R; KRAMER, K.J; BARKER, J.E; KANOST, M.R; FABRICK, J.A; BEHNKE, C.A. Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects. In: Carozzi,N.,Koziel, M. (Eds.), **Advances in Insect Control. The Role of Transgenic Plants**. p. 157 - 183. 1997.
- RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. **Methods in Plant Biochemistry**. v.5, .259 - 305. 1991.
- RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. **Phytochemistry**. v. 16, p.159 - 169. 1977.
- RICHARDSON, M; CAMPOS, F. A. P; XAVIER-FILHO, J; MACEDO, M. L. R; MAIA, G. M. C; YARWOOD, A. The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin isoinhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian carolina tree *Adenanthera pavonina* (L.). **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 872, p. 134 - 140. 1986.
- RYAN, C. A. Genes for improving defences against insects and pathogens. **Annuals Reviews Phytopathology**, v.28, p.425 - 449. 1990.
- SALES, M.P; GERHARDT, I.R; GROSSI-DE-SÁ, M.F; XAVIER-FILHO, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**. v. 124, p. 515 - 522. 2000.

- SAMPAIO, C.A.M; OLIVA, M.L.V; SAMPAIO, M.U; BATISTA, I.F.C; BUENO, N.R; TANAKA, A.S; AUERSWALD, A; FRITZ, H. Plant seriene proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes. **Immunopharmacology**. v.32, p.62 - 66. 1996.
- SCHROEDER, H.E; GOLLASH, S; MOORE, A; TABE, L.M; CRAIG, S; HARDIE, D; CHRISPEELS, M.J; SPENCER, D. & HIGGINS, T.J.V. **Plant Physiol**. v.107, p.1233 - 1239. 1995.
- SCHUCH, J.Z; LUCCA FILHO, O.A; PESKE, S.T; DUTRA, L.M.C; BRANCÃO, M.F; ROSENTHAL, M.D. Physiological and sanitary quality of rice seeds stored with different seed moisture contents and fungicide treated. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, p. 45-53. 2006.
- SCOLARI, D.D.G. Produção agrícola mundial: O potencial do Brasil. – Embrapa Roraima. **Internet: www.cpafr.embrapa.br**. 2007.
- SHADE, R.E; SCHROEDER, H.E; PUEYO, J.J; TABE, L.M; MURDOCK, L.L; HIGGINS, T.J.V; CHRISPEELS, M.J. Transgenic pea seeds expressing the a-amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. **Biotechnology**. v.12, p.793 - 796.1994.
- SHEE, C; ISLAM, A; AHMED, F; SHARMA, A.K.A. Structure-function studies of *Murraya koenigii* trypsin inhibitor revealed a stable core beta sheet structure surrounded by α -helices with a possible role for a-helix in inhibitory function. **International Journal of Biological Macromolecules**. v.41, p.410 - 414. 2007.
- SHEE, C; SHARMA, A.K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from seeds of *Murraya koenigii*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v.22, p. 115 - 120. 2007.
- SHEWRY, P.R. & LUCAS, J.A. Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. **In: Advances in Botanical Research**. v.26, p. 135-192. 1997.

- SILVA, F.C.B.L; ALCAZAR, A; MACEDO, L. L.P; OLIVEIRA, A. S; MACEDO, F.P; ABREU, L.R.D; SANTOS, E. A; SALES, M. P. Digestive enzymes during development of *Ceratitis capitata*(Diptera:Tephritidae) and effects of SBTI on its digestive serine proteinase targets. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 36 561, p.569.2006.
- SIN, S.F. & CHYE, M.L. Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. **Planta**. v. 219, p.1010 - 1022. 2004.
- SOLOMON, M.B; BELENGHI, DELLEDONNE, M; MENACHEM, E; LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants, **Plant Cell**. v.11, p.431- 443. 1999.
- SOLOMON, M; BELENGHI, B; DELLEDONNE, M; MENACHE, E; LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**. v.11, p. 431 - 443. 1999.
- SRITANYARAT, W; PEARCE, G; SIEMS, W.F; RYAN, C.A; WITITSUWANNAKUL, R; WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of iso inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**. v. 67, p.1650. 2006.
- SUPURAN, C.T; SCOZZAFAVA, A; CLARE, B.W. Bacterial protease inhibitors. **Medicinal Research Reviews**. v.22, p. 329 - 72. 2002.
- TELANG, M.A; GIRI, A.P; SAINAMI, M.N; GUPTA, V.S. Characterization of two midgut proteinase of *Helicoverpa armigera* and their interaction with proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**. v. 51, p. 513 - 522. 2005.
- TELES, R.C; DE SOUZA, E.M; CALDERON, L.A; DE FREITAS, S.M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. **Phytochemistry**, v.65, p.793 - 797. 2004.

- TERRA, W.R. Digestive enzymes. In: LEHANE M.J. (Ed). **Billin. London: Chapman and Hall.** p.153 - 194. 1996.
- TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology B.** v. 109, p. 1 - 62. 1994.
- TERRA, W.R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology.** v. 47, p. 47- 61. 2001.
- TREMACOLDI, C.R; PASCHOLATI, S.F. Inibidor de tripsina em raízes de *Eucalyptus urophylla*. **Fitopatologia Brasileira.** v.29, p.135 - 140. 2004.
- VALUEVA T.A. & MOSOLOV V.V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry.** v. 69, p. 1305-1309. 2004.
- VITALE, A; BOLLINI, R. Legume Storage Proteins. In: Kigel, J.; Galili, G. (Eds). Seed Development and Germination. **Marcel Dekker, New York.** p. 73 - 102. 1995.
- VOLPICELLA, M; CECI, L.R; CORDEWENER, J; AMERICA, T; GALLERANI, R; BODE, W; JONGSMA, M; BEEKWILDER, J. Properties of purified gut trypsin from *HelicoVerpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. **European Journal of Biochemistry.** p.10 - 19. 2009.
- WALDRON, C; WEGRICH, L.M; MERLO, P.A; WALSH, T.A. Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. **Plant Molecular Biology.** v. 23, n. 4, p. 801-812. 1993.
- WARD, C.W. Resolution of proteases in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. **Australian Journal of Biological Sciences.** v.28, p. 1 - 23. 1975.
- WHEELER, DA; ISMAN, MB. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia Americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. **Entomologia Experimentalis et Applicata.** v. 98, p.9 - 16. 2001.

- WITITSUWANNAKUL, R; PASITKUL, P; KANOKWIROON, K; WITITSUWANNAKUL, D.
A role for a *Hevea* latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. **Phytochemistry**. v. 69, p.339 - 347. 2008.
- XU, Z.F; QI, W.Q; OUYANG, X.Z; YEUNG, E; CHYE, M.L. A proteinase inhibitor II of *Solanum americanum* is expressed in phloem. **Plant Molecular Biology**. v.47, p.727 - 738. 2001.
- YANG, L; FANG, Z; DICKE, M ; VAN LOON, J.J.A; A. JONGSMA, M.A. The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates Mustard Trypsin Inhibitor 2 (MTI2) to overcome host plant defence. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 39, p. 55 - 61.2009.
- ZAVALA, J.A; PATANKAR, A.G; GASE, K.; HUI, D.Q; BALDWIN, I.T. Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuata* demonstrates their function as antiherbivore defenses. **Plant Physiology**. v. 134, p. 1181 - 1190. 2004.
- ZHANG, Y; KOUZUMA, Y; MIYAJI, T; YONEKURA, M. Purification, characterization and cDNA cloning of a Bowman–Birk type trypsin inhibitor from *Apios American Medicus* tubers. **Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry**. v.72, p.171 - 8. 2008.