



CÉZAR DA SILVA BEZERRA

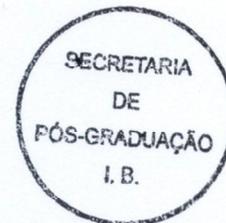
**ESTUDO DO POTENCIAL INSETICIDA DE UM INIBIDOR DE PROTEINASE DE
SEMENTES DE *Inga vera* SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Anagasta kuehniella*
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE): ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**

CAMPINAS

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia



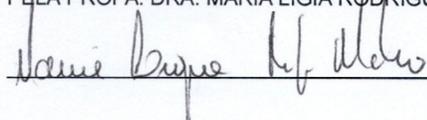
CÉZAR DA SILVA BEZERRA

**ESTUDO DO POTENCIAL INSETICIDA DE UM INIBIDOR DE PROTEINASE DE
SEMENTES DE *Inga vera* SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *Anagasta kuehniella*
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE): ASPECTOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular, na Área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO CÉZAR DA SILVA BEZERRA, E ORIENTADO PELA PROFA. DRA. MARIA LÍGIA RODRIGUES MACEDO



CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

B469e Bezerra, César da Silva, 1990-
Estudo do potencial inseticida de um inibidor de proteinase de sementes de *Inga vera* sobre o desenvolvimento de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) : aspectos fisiológicos e bioquímicos / César da Silva Bezerra. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Lígia Rodrigues Macedo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Interação planta-inseto. 2. Inibidores da tripsina. 3. Defesas de plantas. I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Study of insecticidal potential of a proteinase inhibitor from *Inga vera* seeds on *Anagasta kuehniella* development (Lepidoptera: Pyralidae) : physiological and biochemical aspects

Palavras-chave em inglês:

Plant-insect interaction

Trypsin inhibitors

Plant defenses

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Maria Lígia Rodrigues Macedo [Orientador]

Maria das Graças Machado Freire

Valdirene Moreira Gomes

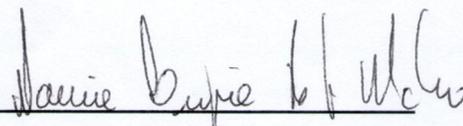
Data de defesa: 24-03-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

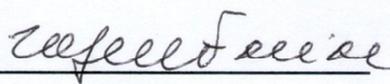
Campinas, 24 de março de 2014

BANCA EXAMINADORA

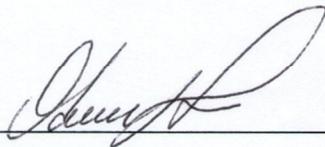
Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo (orientadora)
UNICAMP – IB – Depto. Bioquímica
UFMS – LPPFB


Assinatura

Profa. Dra. Maria das Graças Machado Freire
UNICAMP – IB – Depto. Bioquímica
Institutos Superiores de Ensino do CENSA


Assinatura

Profa. Dra. Valdirene Moreira Gomes
Lab. Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos
UENF


Assinatura

Dra. Luciana Maria de Hollanda
UNICAMP – IB – Depto. Bioquímica

Assinatura

Dra. Adriana Rios Lopes Rocha
Lab. de Bioquímica e Biofísica
Instituto Butantan

Assinatura

RESUMO

Os inibidores de proteases de plantas têm sido amplamente estudados como uma alternativa para o controle de insetos-praga devido à capacidade de inibir enzimas envolvidas na digestão. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi estudar a atividade biológica do inibidor de tripsina de sementes de *Inga vera* (IVTI) sobre o desenvolvimento, fisiologia nutricional e atividade enzimática de *Anagasta kuehniella*. Larvas neonatas (n=40) foram mantidas em dieta artificial sem inibidor (controle) ou contendo 1% de IVTI (p/p) até atingirem o quarto e quinto instares. As análises realizadas determinaram o efeito sobre o desenvolvimento destas, desde período larval até emergência dos adultos. Através de outras aferições elaboramos uma tabela de parâmetros nutricionais. A atividade proteolítica do homogenato intestinal e fecal foi analisada através de zimograma e ensaios enzimáticos *in vitro*, utilizando BApNA e Suc-AAPF-pNA como substratos para tripsina e quimotripsina, respectivamente. IVTI foi incubado com o homogenato intestinal larval para verificar a degradação do mesmo. O consumo de IVTI pelas larvas provocou uma redução de cerca de 50% no peso médio larval e uma redução significativa taxa de sobrevivência de 15%, bem como o prolongamento do período larval em 8 dias. A análise dos índices nutricionais revelou uma redução na eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido e um aumento no custo metabólico, sugerindo que IVTI apresenta efeito antinutricional para esta espécie. IVTI alterou a atividade proteolítica intestinal das larvas com a redução atividade trípica e o aumento da atividade quimotríptica. Na análise fecal, os níveis da atividade trípica foram semelhantes tanto nas fezes das larvas alimentadas em dieta controle quanto contendo inibidor, entretanto foi observado um aumento no nível da atividade quimotríptica nas larvas alimentadas com inibidor. IVTI não foi degradado pelas enzimas intestinais, sendo excretado nas fezes e permanecendo com sua atividade inibitória ativa. O zimograma não revelou nenhuma forma variante de enzima nas larvas alimentadas com inibidor, mas foi possível observar quais sofreram influências pelo mesmo. Com base nesses resultados, IVTI apresentou uma atividade tóxica e antinutricional contra *A. kuehniella*.

ABSTRACT

Plant protease inhibitors have been extensively studied as an alternative for the control of insect pests because of their ability to inhibit enzymes digestive enzymes. In this work, the biological activity of trypsin inhibitor of *Inga vera* seed (IVTI) on the development, nutritional physiology and enzyme activity of *Anagasta kuehniella* was evaluated. Neonate larvae (n=40) were maintained on artificial diet without inhibitor (control) or containing 1% IVTI (w / w) until fourth and fifth instar. This bioassay determined the effect on the development from the larval period to adult emergence. Through other measurements prepared a table of nutritional parameters. The proteolytic activity of intestinal and fecal homogenate was analyzed by zymography and enzymatic assays, *in vitro*, using BApNA and Suc-AAPF-pNA as substrates for trypsin and chymotrypsin, respectively. IVTI was incubated with the larval gut and check the degradation of the inhibitor. IVTI consumption by the larvae resulted in a reduction of about 50% of larval weight and a significant larval survival rate of 15%, as well as the extension of the larval period to 8 days. Nutritional analyses showed a reduction of efficiency of conversion of food eaten and digested and an increase in metabolic cost, suggesting that IVTI produces an anti-nutritional effect for this specie. IVTI changed the proteolytic activity in the gut of the larvae with decrease of trypsin activity and increase of chymotrypsin activity. Fecal analyses, the levels of trypsin activity were similar in the feces of larvae fed on control diet as containing inhibitor, however there was an increase in the level of chymotrypsin activity in larvae fed with inhibitor. IVTI was not degraded by intestinal enzymes, but it excreted in the feces and their inhibitory activity remained active. Zymogram revealed no variant form of the enzyme in the larvae fed inhibitor, but was observed which were influenced by it. Based on these results, IVTI presented an anti-nutritional and toxic activity against *A. kuehniella*.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| RESUMO | VII |
| ABSTRACT | IX |
| ABREVIACÕES | XV |
| I. INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 Considerações gerais | 17 |
| 1.2 Interação planta-inseto | 18 |
| 1.3 Insetos-praga | 20 |
| 1.3.1 Traça da farinha (<i>Anagasta kuehniella</i>) | 24 |
| 1.4 Enzimas digestivas de insetos | 24 |
| 1.5 Proteínas vegetais inseticidas | 25 |
| 1.5.1 Lectinas | 26 |
| 1.5.2 Proteínas inativadoras de ribossomos | 26 |
| 1.5.3 Inibidores de α -amilase | 27 |
| 1.5.4 Canatoxina | 27 |
| 1.6 Inibidores de proteinases | 28 |
| 1.6.1 Complexo enzima-inibidor | 29 |
| 1.6.2 Inibidores de serinoproteases | 31 |
| 1.7 Biotecnologia vegetal relacionada à defesa de plantas | 32 |
| 1.8 Atividade inseticida dos inibidores de proteases e utilização como ferramenta biotecnológica alternativa | 34 |
| 1.9 Estratégias adaptativas dos insetos à defesa de plantas | 36 |
| II. OBJETIVOS | 38 |
| 1.1 Objetivo geral | 38 |
| 1.2 Objetivos específicos | 38 |
| III. MATERIAL | 39 |
| 1.1 <i>Inga vera</i> | 39 |
| 1.2 Insetos | 39 |
| IV. MÉTODOS | 42 |
| 1.1 Purificação do inibidor de tripsina de sementes de <i>I. vera</i> | 42 |
| 1.1.1 Obtenção da farinha das sementes de <i>I. vera</i> | 42 |
| 1.1.2 Obtenção do extrato bruto | 42 |
| 1.1.3 Cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose | 42 |
| 1.1.4 Cromatografia de afinidade Sepharose-tripsina | 42 |
| 1.2 Dosagem de proteínas | 43 |
| 1.3 Preparação do homogenato intestinal | 43 |
| 1.4 Preparação do extrato fecal | 43 |
| 1.5 Efeito <i>in vitro</i> de IVTI sobre as enzimas digestivas de diferentes insetos-praga | 44 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1.6 | Efeito <i>in vivo</i> de IVTI sobre o desenvolvimento de <i>A. kuehniella</i> | 44 |
| 1.7 | Análise Nutricional..... | 45 |
| 1.8 | Ensaio biológico crônico..... | 46 |
| 1.9 | Ensaio biológico agudo | 46 |
| 1.10 | Atividade enzimática..... | 47 |
| 1.11 | Digestão <i>in vitro</i> de IVTI por proteases intestinais de <i>A. kuehniella</i> | 48 |
| 1.12 | Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS | 48 |
| 1.13 | Deteção da atividade de IVTI nas fezes de <i>A. kuehniella</i> | 49 |
| 1.14 | Zimograma | 49 |
| 1.15 | Análise dos dados | 50 |
| V. | RESULTADOS..... | 51 |
| 1.1 | Purificação de IVTI | 51 |
| 1.1.1 | Cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose | 51 |
| 1.1.2 | Cromatografia em coluna de Sepharose-tripsina..... | 52 |
| 1.1.3 | Tabela de purificação do inibidor | 52 |
| 1.1.4 | Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS..... | 53 |
| 1.2 | Efeito <i>in vitro</i> de IVTI sobre as enzimas digestivas de diferentes insetos-praga | 54 |
| 1.3 | Efeito <i>in vivo</i> de IVTI sobre o desenvolvimento de <i>A. kuehniella</i> | 55 |
| 1.4 | Análise do consumo e utilização do alimento..... | 57 |
| 1.5 | Efeito crônico de IVTI sobre as enzimas digestivas de <i>A. kuehniella</i> | 60 |
| 1.6 | Efeito agudo de IVTI sobre as enzimas digestivas de <i>A. kuehniella</i> | 63 |
| 1.7 | Digestão <i>in vitro</i> de IVTI por proteases intestinais de <i>A. kuehniella</i> | 66 |
| 1.8 | Efeito de IVTI sobre a atividade proteolítica das fezes de <i>A. kuehniella</i> | 69 |
| 1.9 | Zimograma | 72 |
| VI. | DISCUSSÕES..... | 75 |
| VII. | CONCLUSÕES | 84 |
| VIII. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 85 |

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Carlos Bezerra e Maria de Fátima Alves da Silva, por terem dado as melhores oportunidades que puderam, além de todo apoio e ajuda nas diferentes formas.

À Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo, pela orientação, amizade e confiança. Obrigado por ressaltar minhas qualidades e sempre me incentivar a continuar.

Ao Dr. Sérgio Marangoni, por ter me acolhido e permitido a utilização do laboratório possibilitando a execução desse trabalho.

Aos professores Dr. Marcelo Lancellotti, Dra. Luciana Maria de Hollanda e a Dra. Gláucia Coelho de Mello pela contribuição na banca de qualificação.

Aos professores Dra. Maria das Graças Machado Freire, Dra. Valdirene Moreira Gomes, Dra. Luciana Maria de Hollanda e a Dra. Adriana Rios Lopes Rocha por aceitarem a compor a banca de defesa do meu mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas, pela amizade, incentivo e ajuda muitas vezes necessária.

Aos amigos do Laboratório de Química de Proteínas, pelas muitas conversas, cafés, apoio e risadas.

Aos meus amigos, pelo companheirismo e ajuda que contribuíram tanto para minha formação quanto para minha distração.

À Universidade Estadual de Campinas, pela oportunidade de aprendizagem e qualificação.

Ao programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular, que foi fundamental na conclusão de mais uma etapa da minha realização profissional.

Ao apoio financeiro do CNPq que possibilitou a realização deste trabalho.

ABREVIACÕES

AD – Digestibilidade aproximada

AKFP – Proteinase fecal de *A. kuehniella*

AKGP – Proteinase intestinal “gut” de *A. kuehniella*

BAPNA – N-benzoil-L-arginina-p-nitroanilida

BSA – Albumina bovina sérica

CM – Custo metabólico

DEAE – Dietilaminoetil

DMSO – Dimetilsulfóxido

EB – Extrato Bruto

ECD – Eficiência de conversão do alimento digerido

ECI – Eficiência de conversão do alimento ingerido

IP – Inibidor de proteinase

IVTI – Inibidor de tripsina de *Inga vera*

kDa – Kilodalton

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS

Suc-AAPF-pNA – N-succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida

TLCK – N-tosil-L-lisina clorometil cetona

TRIS – Hidroximetil aminometano

I. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Em 2013, a população humana atingiu 7,2 bilhões de habitantes e estima-se que na metade do século 21, em 2050, atingirá 9,6 bilhões de habitantes, de acordo com dados da ONU (2013). Com isso a demanda por alimentos deverá aumentar em cerca de 70% do total produzido atualmente, sendo estimado um consumo anual de cerca de 1 bilhão de toneladas de cereais e 200 milhões de toneladas de carne (FAO, 2013).

A dieta humana é constituída por 93% de produtos de origem vegetal, com cerca de 30 espécies de cultura fornecendo a maioria das calorias e proteínas necessárias para uma vida saudável, dentre essas inclui 8 espécies de cereais, que em conjunto, representam 66% da oferta mundial de alimentos. Os produtos de origem animal constituem apenas 7% da dieta mundial, mas que também dependem de produtos de origem vegetal para sua alimentação (FAO, 2013)

Portanto, a preocupação desse século é a agricultura, a qual enfrentará múltiplos desafios para produzir mais alimentos, rações e fibras para uma população crescente e trabalhadores rurais escassos, produzir matéria-prima para o mercado crescente da bioenergia, adotar métodos de produção mais eficiente e sustentável e adaptar as mudanças climáticas (FAO, 2013).

Uma das estratégias a serem adotadas é o combate aos insetos-praga que são uma das maiores causas de danos na produção mundial de alimentos, que pode chegar a 20% para as principais culturas (FERRY *et al.*, 2004). Atualmente, os métodos de controle desses insetos são altamente onerosos e concentram-se no uso de inseticidas químicos, mas que

tem gerado grande polêmica devido aos efeitos negativos que causam sobre os ecossistemas, agroecossistemas e aos seres humanos, principalmente pelo uso indiscriminado (MACEDO & FREIRE, 2011b). Dessa forma, com auxílio da biotecnologia vegetal, estratégias alternativas à utilização de produtos químicos vêm sendo estudado tais como utilização de toxina Bt, lectinas e inibidores vegetais de enzimas digestivas dos insetos-praga (HAQ *et al.*, 2004)

1.2 Interação planta-inseto

As plantas terrestres e insetos coexistem por mais de 400 milhões de anos (FÜRSTENBERG-HÄGG *et al.*, 2013). Durante este tempo, eles desenvolveram interações refinadas que afetam os organismos em todos os níveis desde bioquímica básica até genética de população. Algumas dessas relações são mutuamente benéficas, tais como a polinização, mas as maiorias das interações envolvem a predação das plantas pelos insetos, e de defesa das plantas contra os insetos herbívoros. Na verdade, a relação predador-hospedeiro é tão comum que quase todas as espécies de plantas servem de alimento para pelo menos uma espécie de inseto (FÜRSTENBERG-HÄGG *et al.*, 2013). Isto deu origem à teoria da coevolução, onde a evolução de uma espécie torna-se parcialmente dependente da evolução da outra (EHRlich & RAVEN, 1964), portanto, os insetos herbívoros foram o fator determinante no aumento da diversidade de espécies tanto de plantas quanto deles próprios.

As estratégias utilizadas pelas plantas para se defender dos insetos herbívoros são muito diversas. Algumas espécies produzem características que afetam a preferência do inseto, como a seleção da planta hospedeira e do comportamento alimentar, enquanto algumas afetam o desempenho do inseto, como a taxa de crescimento e o desenvolvimento.

Essas características incluem aspectos morfológicos para defesa física e a produção de compostos para a defesa química.

Os insetos herbívoros são divididos em generalista (polígrafos) que se alimentam de vários hospedeiros de diferentes famílias de plantas, ou especialistas (monófagos ou oligófagos) os quais se alimentam de um ou alguns tipos de plantas da mesma família. Os generalistas tendem a tolerar uma grande variedade de defesas presentes na maioria das plantas. Por outro lado, os especialistas utilizam uma faixa específica de plantas hospedeiras que liberam compostos de defesa que ao mesmo tempo pode funcionar como um estimulante de alimentação ou proporcionar sinais de oviposição (FEENY, 1976; ALI & AGRAWAL, 2012; FÜRSTENBERG-HÄGG *et al.*, 2013). No entanto, esta visão foi contestada recentemente (ALI *et al.*, 2012), uma vez que se concentram apenas nos extremos, quando na realidade a distribuição de insetos que se alimentam de uma a várias plantas é um processo contínuo. O paradigma ainda baseia-se no fato de que a alimentação de generalistas e especialistas provocariam diferentes respostas nas plantas, o que é difícil de provar. É recomendado que os experimentos possuíssem pelo menos quatro espécies com mesma guilda alimentar e estando dois pares taxonômicos. Entretanto, até agora tais experimentos não foram relatados (ALI *et al.*, 2012).

A defesa das plantas contra herbivoria pode ser expressa de forma constitutiva ou pode ser induzida quando é desenvolvida apenas após o ataque (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002). Esta é uma questão do benefício versus custo, uma vez que os mecanismos de defesa de plantas são custosos energeticamente. Sendo assim, as plantas estão constantemente no dilema de combinar crescimento e desenvolvimento com a defesa. Este problema deve-se à alocação de recursos como o nitrogênio ou a produção de compostos

tóxicos para a planta em si, e não apenas aos herbívoros (BALDWIN, 2001; FÜRSTENBERG-HÄGG *et al.*, 2013).

Por outro lado, os insetos desenvolveram várias estratégias para superar as barreiras defensivas das plantas desde a desintoxicação de compostos tóxicos (SCOTT & WEN, 2001; WANG *et al.*, 2012) até a alteração do padrão gênico (SILVA *et al.*, 2001; NOGUEIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013), a fim de permitir sua alimentação, desenvolvimento e reprodução em seus hospedeiros.

1.3 Insetos-praga

Os insetos constituem os maiores grupos de organismos com aproximadamente um milhão de espécies descritas até hoje. Estima-se que o número real de espécies de insetos é maior e, que pode variar de 4 a 10 milhões de espécies (ØDEGAARD, 2000; NOVOTNY *et al.*, 2002; SCHOONHOVEN *et al.*, 2005). Dentre estes, mais de 400.000 espécies são herbívoros vivendo em cerca de 300 000 espécies de plantas vasculares (Figura 1).

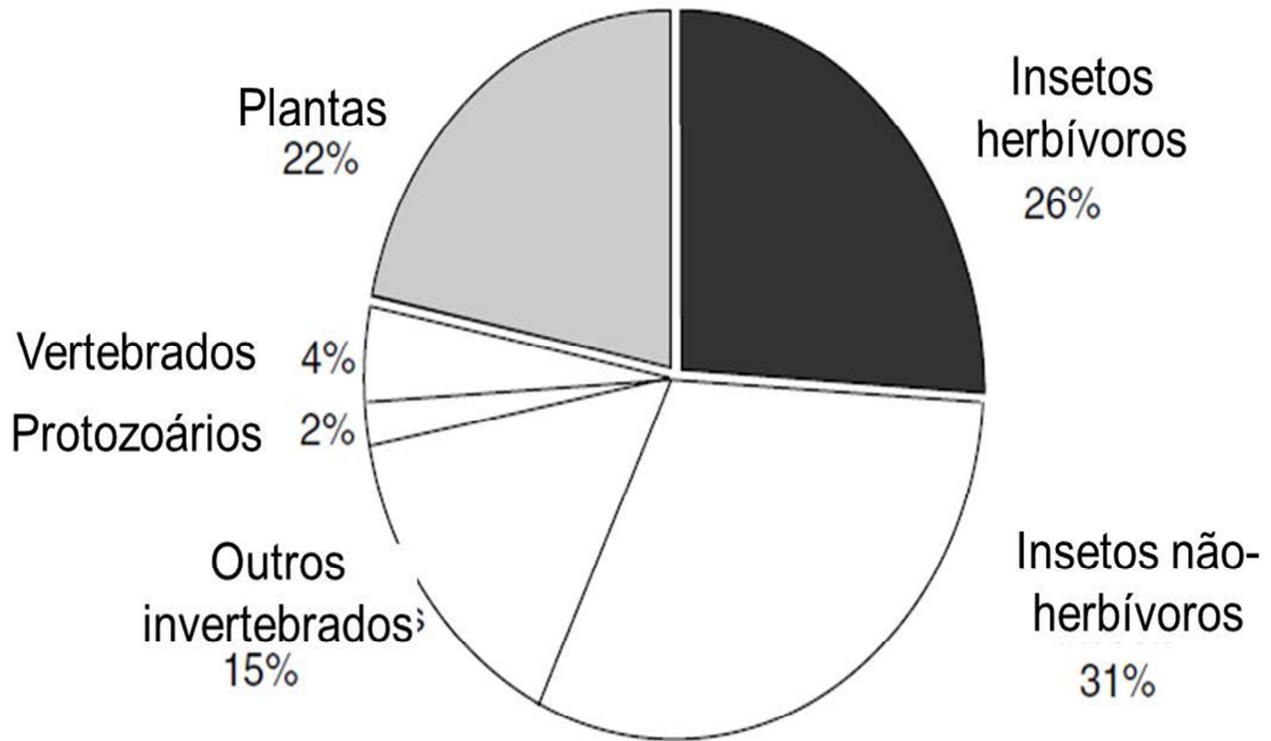


Figura 1. Proporções espécies de animais e plantas em maior taxa, excluindo fungos, algas e bactérias. Adaptado de SCHOONHOVEN *et al.* (2005)

A herbivoria não ocorre na mesma proporção em todos os grupos de insetos. A tabela 1 mostra que os membros de algumas ordens de insetos são quase exclusivamente herbívoros, enquanto que em outras ordens a herbivoria ocorre com menos frequência.

Tabela 1. Número de espécies herbívoras em diferentes ordens de insetos. Adaptado de SCHOONHOVEN *et al.* (2005)

| Ordem | Número total de espécies | Espécies herbívoras | |
|--------------|--------------------------|---------------------|-----|
| | | Número | % |
| Coleoptera | 349.000 | 122.000 | 35 |
| Lepidoptera | 119.000 | 119.000 | 100 |
| Diptera | 119.000 | 35.700 | 30 |
| Hymenoptera | 95.000 | 10.500 | 11 |
| Hemiptera | 59.000 | 53.000 | 90 |
| Orthoptera | 20.000 | 19.900 | 100 |
| Thysanoptera | 5.000 | 4.500 | 90 |
| Phasmida | 2.000 | 2.000 | 100 |

O maior número de espécies herbívoras pertence às ordens Coleoptera e Lepidoptera, sendo os principais responsáveis por prejuízos no campo e no armazenamento. Os coleópteros da família Bruchidae têm maior importância em relação à infestação de feijões, tais como *Acanthoscelides clandestinus*, *Zabrotes subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus* (SINGH & SINGH, 1990). Em relação aos lepidópteros, esta ordem agrupa as mariposas e borboletas, cujos adultos não podem consumir materiais sólidos, sendo os danos causados pelas larvas que possuem aparato mastigador (VOLPICELLA *et al.*, 2003).

No Brasil, as 8 principais culturas representam mais de 80% da área plantada total, sendo estas: soja, milho, cana-de-açúcar, arroz, feijão, eucalipto, trigo e café. Entre as

culturas com maior número de insetos-praga se destacam: citros (laranja + limão + tangerina), soja, arroz, milho e feijão (ZARBIN *et al.*, 2009).

A monocultura extensiva como da soja e milho exige uma elevada utilização de agrotóxicos para combater o ataque de insetos-praga especialmente às lagartas do cartucho, *S. frugiperda* (OLIVEIRA *et al.*, 2013), e da soja, *Anticarsia gemmatalis* (PIUBELLI *et al.*, 2005). Já as lagartas do gênero *Helicoverpa* são as principais pragas da cultura do algodão no Brasil e outros países das Américas, Austrália e África (DUNSE *et al.*, 2010). O gênero *Agrotis* constitui um sério grupo de pragas presentes em toda a Europa, Ásia e das Américas (JAKUBOWSKA *et al.*, 2005). Suas larvas passam boa parte do tempo de vida no solo e alimentam-se de uma grande variedade de culturas incluindo milho, beterraba, batata, repolho, cereais, tabaco, videira e outros. Considerada uma das principais e mais destrutivas pragas do tabaco *Heliothis virescens* ataca ainda diversas espécies do gênero *Nicotiana*. As lagartas atacam brotos e flores e na ausência de tecido reprodutivo atacam tecido foliar (PAIR, 1994). A broca da cana *Diatrea saccharalis* é a principal praga da cana-de-açúcar no Brasil, provocando danos aos caules das plantas que resulta em perda de produção para as indústrias de açúcar e álcool (FALCO & SILVA-FILHO, 2003). A traça do arroz *Corcyra cephalonica* é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, sendo uma importante praga de produtos armazenados como cereais, farinha e frutos secos (COELHO *et al.*, 2007).

O custo destinado ao controle destes insetos é muitas vezes tão alto que o cultivo destas culturas pode não ser financeiramente viável. Uma vez conhecido os prejuízos e a necessidade de controle destas pragas, estudos sobre manejo e controle devem ser realizados a fim de mitigar os danos à agricultura.

1.3.1 Traça da farinha (*Anagasta kuehniella*)

As perdas de grãos armazenados como milho, trigo, nozes, cacau, chocolate e doces são causados, principalmente, por ataque do inseto polífago *A. kuehniella* (figura 3), um lepidóptero coloração parda com cerca de 20 mm de envergadura pertencente da família Pyralidae (COELHO *et al.*, 2007). A fêmea deposita em 4 ou 5 dias, entre 200 e 300 ovos, sobre a farinha e outros alimentos. A larva mede aproximadamente 12 mm de comprimento e é bastante voraz. Na medida em que se alimenta vai tecendo fios de seda que podem formar massas compactas, obstruindo por vezes, a maquinaria e tubulações dos moinhos de trigo (TECNIGRAN, 2013)

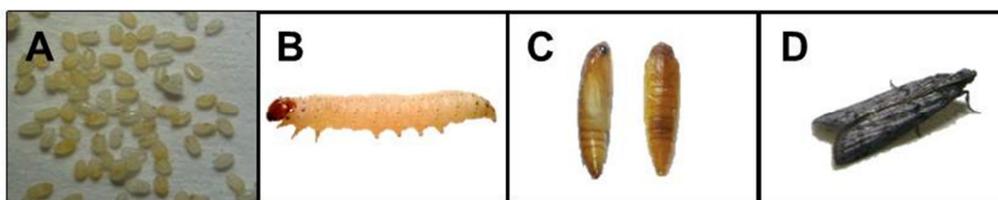


Figura 2. *Anagasta kuehniella* Zeller. (A) Ovos (Turatti, C.O.); (B) Larva de 4º instar (Guimarães, L.C.); (C) Pupas (Bezerra, C.S.) e (D) Inseto adulto (Bezerra, C.S.)

1.4 Enzimas digestivas de insetos

As enzimas digestivas são também denominadas peptidases (peptídeo-hidrolases, EC 3.4) responsáveis pela clivagem das ligações peptídicas. São encontradas na região do intestino médio do inseto e subdivididas em exopeptidases (EC 3.411-19) e endopeptidases ou proteinases (EC 3.421-24). As exopeptidases removem aminoácidos da extremidade N-terminal (aminopeptidases, EC 3.4.11) ou C-terminal (carboxipeptidases, EC 3.4.16-18), e as endopeptidases clivam ligações peptídicas internas (BOLTER e JONGSMA, 1997).

As proteinases são divididas em quatro subclasses com base no aminoácido do sítio ativo responsável pela catálise: serino, cisteíno, aspartato e metaloproteinases (TERRA e FERREIRA, 1994). Um quinto grupo, treonina-proteinases, tem sido proposto por alguns autores. Estas enzimas são muito semelhantes às serinoproteinases, entretanto esse quinto grupo apresenta um resíduo de treonina ao invés de uma serina envolvida na catálise (BARRETT *et al*, 1998).

A maioria das moléculas de alimentos a serem digeridas são polímeros e, neste caso, proteínas. Estas são digeridas em três etapas: I) A digestão inicial ou primária ocorre no interior da membrana peritrófica e consiste na dispersão e redução do tamanho dos polipeptídeos. Nesta etapa da digestão é realizada por proteinases, resultando em oligopeptídeos e este processo exige proteinases de diferentes especificidades, sendo que em insetos, endopeptidases das classes serina, cisteína e aspártico já foram descritas envolvidas no processo digestivo. II) Digestão intermediária ocorre, frequentemente, no espaço ectoperitrófico, estas moléculas são novamente reduzidas a dímeros por ação das amino e carboxi-peptidases. III) Por último, a digestão final terá redução dos dímeros à monômeros na superfície das células intestinais por ação de dipeptidases.

Dentre as endopeptidases envolvidas na digestão em insetos fitófagos, as enzimas da classe serino e cisteíno proteinases são as duas principais que ocorrem na maioria dos Lepidopteros e Coleopteros, respectivamente (TERRA & FERREIRA, 1994)

1.5 Proteínas vegetais inseticidas

Como visto anteriormente, as estratégias utilizadas pelas plantas a fim de se defender dos insetos herbívoros são muito diversas, incluindo diferentes tipos de proteínas inseticidas

(CARLINI *et al.*, 2002; MICHIELS *et al.*, 2010; SILVA & SAMUELS, 2011). Algumas das proteínas que apresentam propriedades tóxicas são as lectinas, proteínas inativadoras do ribossomo, inibidores de α -amilase, canatoxina e os inibidores de proteinases (CARLINI *et al.*, 2002).

1.5.1 Lectinas

As lectinas são definidas como proteínas vegetais que possuem pelo menos um domínio não catalítico a qual se liga reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo específico (PEUMANS & VAN DAMME, 1995; VANDENBORRE *et al.*, 2011). As lectinas estão presentes nas plantas em grandes quantidades nas sementes e em órgãos de armazenamento (PEUMANS *et al.*, 1995). Além disso, elas apresentam especificidade de carboidratos para gliconjugados presentes em organismos fora do reino vegetal, tais como vírus, bactérias, fungos, nematódeos ou insetos fitófagos (BOLETI *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011a; SOUZA *et al.*, 2011; VANDENBORRE *et al.*, 2011). Por isso, foi proposto que as lectinas de plantas desempenham um papel na defesa geral contra uma multiplicidade de atacantes vegetais e também utilizado como proteína de reserva para o crescimento e desenvolvimento da planta (PEUMANS *et al.*, 1995).

1.5.2 Proteínas inativadoras de ribossomos

As proteínas inativadoras de ribossomos ou RIPs provocam danos a ribossomos, impedindo a síntese de proteínas (STIRPE & BATTELLI, 2006). Esta classe de proteína inseticida pode ser dividida em 3 subclasses: RIP do tipo I, constituídas de cadeias polipeptídicas simples de aproximadamente 30 kDa e com atividade enzimática; de tipo II que possuem 2 cadeias polipeptídicas uma de aproximadamente 30 kDa com atividade enzimática e outra de aproximadamente 35 kDa com propriedades de lectina e a RIP do tipo III, sintetizada como precursor inativo (proRIP), que necessita sofrer um processamento

proteolítico para formarem RIP ativas (STIRPE *et al.*, 2006). A RIP do tipo I é frequentemente encontrada em plantas e em diferentes concentrações, sendo que algumas dessa são consumidas que é o caso do espinafre (ISHIZAKI *et al.*, 2002) e o tomate (BARBIERI *et al.*, 2006). Apenas algumas RIPs do tipo II são conhecidas como a ricina e abrina que são altamente tóxicas (OLSNES, 2004).

1.5.3 Inibidores de α -amilase

As α -amilases constituem uma família de endoamilases que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos (FRANCO *et al.*, 2002). Essas enzimas são muito importantes para o desenvolvimento e a sobrevivência de larvas e/ou adultos, especialmente daqueles insetos que se alimentam de grãos ricos em amido. Os inibidores de α -amilase ocorrem em várias espécies vegetais como parte do seu mecanismo de defesa. Quando a ação das amilases é inibida, a nutrição do organismo é prejudicada, estabelecendo um quadro de falta de energia que pode levar à morte (CARLINI *et al.*, 1997). Dentre os inibidores mais estudados, destaca-se o α -AI1, encontrado nos grãos do feijão *Phaseolus vulgaris*, que inibe α -amilases de diversos insetos-praga, como: *Tribolium castaneum*, *Tribolium confusum*, *Tenebrio molitor*, *Sitophilus oryzae*, *C. maculatus*; *Diabrotica vergifera vergifera* e *Hypothenemus hampei* (PUEYO *et al.*, 1995; TITARENKO & J. CHRISPEELS, 2000; VALENCIA *et al.*, 2000).

1.5.4 Canatoxina

A canatoxina é uma potente proteína neurotóxica isolada das sementes do feijão *Canavalia ensiformis*. Esta proteína comporta-se como dímeros ligados não-covalentemente de massa próxima a 95 kDa, que podem constituir até 0,5% do peso seco das sementes (CARLINI *et al.*, 2002). O padrão de acúmulo durante o processo de maturação das sementes sugere um importante papel fisiológico que pode ser relacionado à defesa vegetal

(OLIVEIRA, 2011). CARLINI *et al.* (1997) realizaram um ensaio alimentar com diferentes insetos para avaliar esta hipótese e observaram uma importante atividade inseticida desta proteína para insetos pertencentes a diferentes ordens: Lepidoptera, Orthoptera, Diptera, Coleoptera e Hemiptera.

1.6 Inibidores de proteinases

Sua existência na natureza foi relatada pela primeira vez no século XIX por FERMI & PERNOSSI (1894), apresentando a capacidade de inibir a atividade catalítica de enzimas proteolíticas. Além disso, eles são considerados moléculas extremamente estáveis, resistentes a variações de pH, temperatura, agentes desnaturantes e à proteólise por proteinases, sendo que essa estabilidade pode ser atribuída à presença de pontes dissulfeto e a outras interações não covalentes (BIRK, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Estas moléculas são encontradas em bactérias, fungos, animais, no entanto, são mais estudados em famílias de plantas como Fabaceae, Poaceae e Solanaceae, sendo detectadas em órgãos vegetativos, reprodutivos e de reserva (MACEDO *et al.*, 2009). Estudos apontam que em plantas, os inibidores apresentam variadas funções, podendo atuar como reguladores de proteases endógenas, proteínas de reserva e como agentes de defesa vegetal contra insetos, microrganismos e outros animais herbívoros (RYAN, 1990).

Tradicionalmente, estas moléculas têm sido agrupadas em famílias conhecidas como Kunitz, Bowman-Birk, batata I e II, squash, cevada e cistatinas (RICHARDSON, 1991; BIRK, 2003; OLIVA *et al.*, 2011)

1.6.1 Complexo enzima-inibidor

Os IPs são específicos para cada um das 4 classes de enzimas proteolíticas e baseados na sequência de aminoácidos e na constituição de seus sítios reativos, são classificados em inibidores de serino, cisteíno, aspártico e metaloprotease (RICHARDSON, 1991). A inibição da atividade catalítica é alcançada pela interação entre o sítio reativo do inibidor e o sítio catalítico enzimático formando um complexo como observado na figura 3.

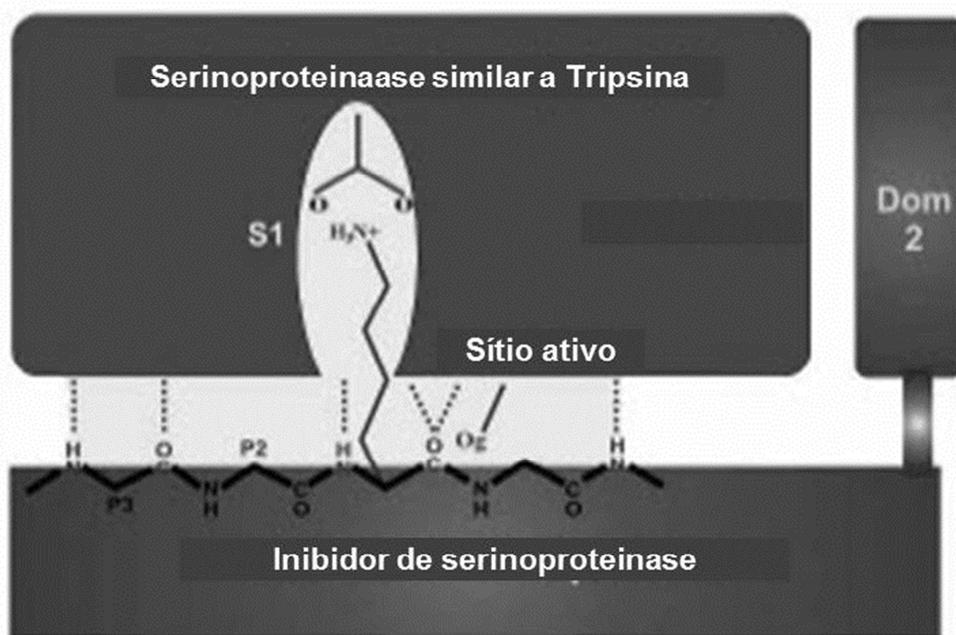
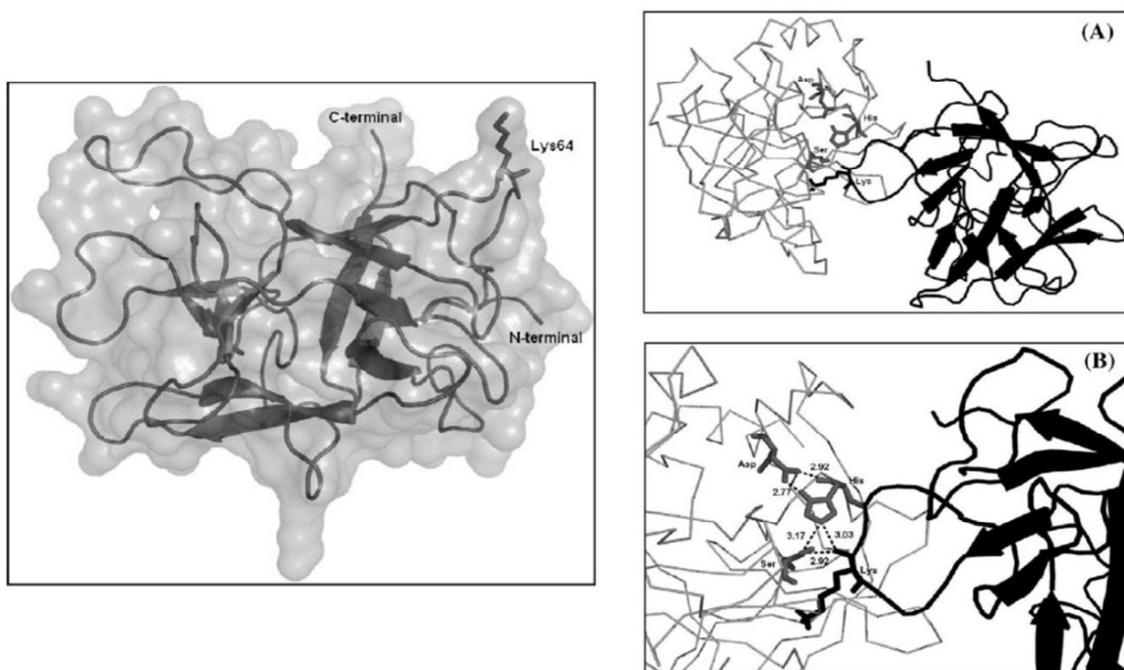


Figura 3. A interação entre o inibidor e a serinoproteína semelhante à tripsina de um inseto. O inibidor tem um sítio reativo com um número de ligações de hidrogênio que unem com o sítio ativo da enzima. Um resíduo de lisina (H₃N) nos projetos da cadeia de P1 para o S1, em que inúmeras interações ocorrem semelhantes aos da união com o substrato. Foto adaptado de Bode e Huber (2000).

Na Figura 4 podemos observar a representação da estrutura tridimensional de um inibidor de tripsina (ILTI) isolado de sementes de *Inga laurina* (MACEDO *et al.*, 2007b) Este inibidor pertence à família Kunitz de inibidores de serinoprotease e apresenta uma massa

molecular de 20 kDa. Além da região N-terminal e C-terminal, está presente o aminoácido lisina localizado na posição 64 (Lys64). Tal resíduo está presente no sítio reativo de ILTI e é reconhecido, especificamente, pelo sítio de ligação primário da enzima tripsina (Figura 4A), e por isso é denominado resíduo P1. Esta característica, a presença de uma lisina na posição P1, determina que ILTI seja específico para serinoproteases do tipo tripsina. Na figura 1B, ainda é possível observar as interações moleculares formadas durante o complexo enzima-inibidor. O átomo de oxigênio do resíduo de Lisina 64 interage com o grupo hidroxila do resíduo de Serina 195, formando uma ponte de hidrogênio de 2,92 Å. Esta interação é favorecida pela atração que os resíduos Histidina 57 e Aspartato 102 promovem ao redor do



resíduo Serina 195, também representada na figura 4B como linhas pontilhadas (MACEDO *et al.*, 2011c). Além das pontes de hidrogênio, outros elementos como forças de van der Waals e interações hidrofóbicas estão envolvidas nas interações entre os inibidores e as proteases (BIRK, 2003).

Figura 4. Representação da estrutura tridimensional do inibidor de tripsina de *Inga laurina*. (A) Visão geral da formação do complexo entre o inibidor e a enzima tripsina e (B) detalhe da Interação entre o resíduo de Lisina 64 e os resíduos da tríade catalítica (Ser195, His57 e Asp102) presentes no sítio catalítico durante a formação do complexo (adaptado de MACEDO et al., 2011)

1.6.2 Inibidores de serinoproteases

A proteólise é um processo extremamente controlado e catalisado por enzimas proteolíticas, as quais são classificadas em quatro grandes grupos: proteases serínicas, cisteínicas, aspárticas e metaloproteases (CARLINI *et al.*, 2002). Serinoproteases são as mais estudadas e presentes em vírus, procariotos e eucariotos, sugerindo vital importância para a sobrevivência dos organismos (PILON *et al.*, 2006). Assim, um grande número de inibidores proteicos tenha sido descritos e extensivamente estudados no intuito de elucidar suas propriedades estruturais e funcionais (BODE & HUBER, 1993; OLIVA *et al.*, 2011) e sua interferência na nutrição dos organismos.

Em plantas, os inibidores de serinoproteases diferentes atuações lhe têm sido atribuídas, incluindo a atuação como proteínas de reserva (CARLINI *et al.*, 2002), reguladores da atividade proteolítica endógena (RYAN & PEARCE, 1998), participantes em muitos processos de desenvolvimento incluindo a morte celular programada e como componentes associados à resistência de plantas contra insetos e patógenos (CARLINI *et al.*, 2002). Além disso, são divididos em duas famílias estruturalmente distintas baseada nas diferentes seqüências de aminoácidos: Bowman-Birk e Kunitz(OLIVA *et al.*, 2011).

1.6.2.1 Família Bowman-Birk

A família Bowman-Birk é constituída de pequenos polipeptídeos (8-11 kD) encontrados em plantas da família Fabaceae (RAO & SURESH, 2007) e Poaceae (RAJ *et al.*, 2002;

PARK *et al.*, 2004). Eles possuem dois sítios reativos com a capacidade de inibir simultaneamente e independentemente duas proteases distintas, como tripsina e quimiotripsina e por isso são conhecidos como “inibidores de dupla-cabeça” (BODE *et al.*, 1993; CARLINI *et al.*, 2002).

1.6.2.2 Família Kunitz

A família Kunitz é melhor caracterizada, provavelmente devido sua abundância em sementes (BIRK, 2003; OLIVA *et al.*, 2011). São proteínas de peso molecular entre 18-22 kDa, constituídos de uma ou duas cadeias polipeptídicas. Poucos resíduos de cisteína estão presentes (normalmente 4 resíduos formando duas pontes dissulfeto) e há presença de um resíduo de arginina em seu único sítio reativo (CARLINI *et al.*, 2002; OLIVA *et al.*, 2011). Algumas diferenças entre estruturas primárias e topologia são observadas, no entanto, a estrutura e mecanismo de ação são bem preservados entre os inibidores de serinoproteases.

1.7 Biotecnologia vegetal relacionada à defesa de plantas

A contínua necessidade de aumentar a produção de alimentos requer o desenvolvimento e a aplicação de ferramentas biotecnológicas inovadoras capazes de oferecerem variedades de culturas melhoradas, oportuna e economicamente rentáveis (HAQ *et al.*, 2004).

Um marco nesse campo foi à introdução de genes de proteínas entomotóxicas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) em plantas. A bactéria foi primeiramente descoberta no Japão em 1902 (BABU *et al.*, 2003) e as delta-endotoxinas, toxinas Bt ou ainda conhecidas como toxinas Cry, são proteínas com propriedades inseticidas produzidas durante a fase da esporulação, que tem sido utilizada como inseticida comercial por mais de duas décadas.

Elas são dissolvidas pelo suco alcalino no lúmen intestinal e convertidas pelas proteases do inseto alimentado em fragmentos tóxicos (BABU *et al.*, 2003). Dessa forma, agrupam-se em oligômeros, criando poros na membrana intestinal, levando à morte do inseto pela descompartimentalização gerada. As primeiras culturas transgênicas de milho, algodão e batata resistentes a insetos expressando genes Bt foram lançadas comercialmente nos Estados Unidos em 1995 (FAN & WU, 2005), e desde 1996 ao ano 2000 a área plantada de culturas transgênicas aumentou de 1,7 para mais de 44 milhões de hectares (BABU *et al.*, 2003).

No entanto, existem algumas limitações no uso de plantas Bt que devem ser consideradas, por exemplo: 1) a persistência da toxina Bt ao longo de todo o período de crescimento da planta seleciona intensivamente a resistência de insetos e (HAQ *et al.*, 2004) 2) a variedade de insetos que podem ser controlados por estas toxinas é relativamente pequena (HAQ *et al.*, 2004). Além disso, outro ponto importante é que a atividade inseticida exercida pelas proteínas Bt tem um complexo modo de ação, já que muitas classes destas pró-toxinas devem ser proteoliticamente ativadas para exercerem seu papel funcional (OLIVEIRA & MACEDO, 2011b). Uma série de trabalhos baseados em observações de laboratório, estufa e campo sobre a resistência de insetos a plantas expressando proteínas Bt tem sido relatada (TABASHNIK *et al.*, 2000), apesar do curto espaço de tempo transcorrido desde o início de sua comercialização. TABASHNIK *et al.* (2008) observaram que *Helicoverpa zea* desenvolveu resistência ao algodão Bt cultivado no Arkansas e Mississippi, nos Estados Unidos.

1.8 Atividade inseticida dos inibidores de proteases e utilização como ferramenta biotecnológica alternativa

Inúmeros trabalhos evidenciam a atividade inseticida de inibidores para as diferentes famílias de insetos (DUNSE *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2013). Inibidores de serino e cisteínoproteases frequentemente apresentam efeitos deletérios quando introduzidos na alimentação de insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera, respectivamente (CARLINI *et al.*, 2002).

A ingestão desses inibidores faz com que as enzimas digestivas do inseto responsável pela proteólise fiquem inibidas com observado na figura 5. Dessa forma, impede degradação das proteínas, conseqüentemente, diminui a disponibilidade de aminoácidos afetando o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos (BODE *et al.*, 1993; MACEDO *et al.*, 2010)

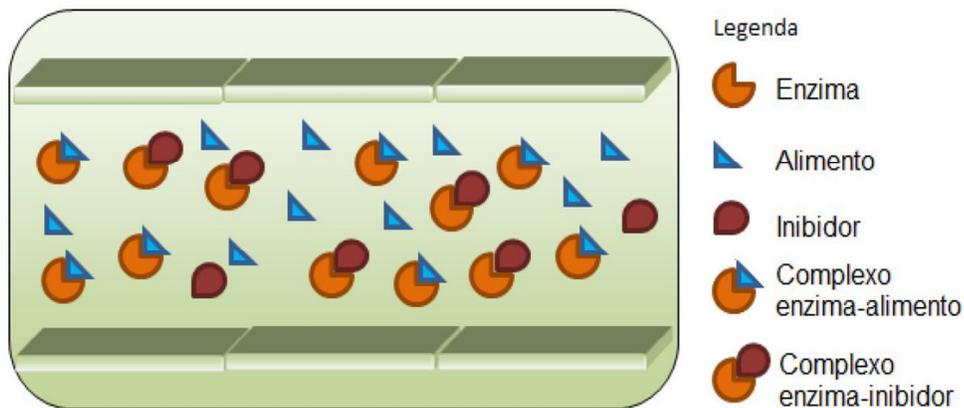


Figura 5. Representação do processo digestório na presença de inibidores de protease. O esquema mostra que uma parcela das enzimas é temporariamente inativada pela formação do complexo enzima-inibidor, diminuindo a eficiência do processo de digestório. Adaptado de OLIVEIRA & MACEDO (2011b).

Pelo fato dessa atividade inseticida, a transformação de plantas com genes de inibidores enzimáticos como uma ferramenta biotecnológica alternativa no combate de insetos-praga vem sendo estudada. A expressão destes nas plantas pode ser associados a fortes promotores para expressá-los em níveis relativamente altos em intervalos de tempos específicos (MOCHIZUKI *et al.*, 1999) em tecidos particularmente vulneráveis ao ataque, como sementes, ou ser induzido a expressão através de ferimentos no tecido atacado pela mastigação, como as folhas (ESTRUCH *et al.*, 1997; MOCHIZUKI *et al.*, 1999).

A expressão de inibidores em plantas transgênicas foi primeiramente demonstrado por HILDER *et al.* (1987), através da expressão do gene do inibidor de tripsina (CpTI) do feijão caupi (*Vigna unguiculata*) em tabaco, conferindo resistência a uma grande variedade de insetos-praga, incluindo espécies dos gêneros *Heliothis* e *Spodoptera* (Lepidoptera), *Diabrotica* e *Anthonomous* (Coleoptera) e *Locusts* (Orthoptera) (GATEHOUSE *et al.*, 1992). Na revisão bibliográfica de FAN & WU (2005) são apresentados mais de 50 trabalhos de plantas transgênicas expressando inibidores de diferentes famílias resistentes a insetos, com esta característica passada por várias gerações. Contudo, plantas transgênicas expressando IP ainda não são comercializadas. Além de apresentar atividade inseticida, os inibidores vegetais são efetivos contra nematoides, vírus, bactérias e fungos patogênicos, podendo exercer um efeito protetor cumulativo para as plantas.

Apesar de todos os benefícios, os genes de IP apresentam certas limitações: uma das mais preocupantes é que diferentes espécies de insetos são afetadas diferencialmente quando alimentadas com o mesmo inibidor (COWGILL & ATKINSON, 2003). Considerando a alta complexidade das interações entre protease/inibidor e a diversidade de enzimas proteolíticas utilizadas pelas diversas pragas no processo de digestão do alimento, a escolha de um IP e sua especificidade representa um ponto crucial no sucesso de qualquer

estratégia de controle que dependa da inibição enzimática (OLIVEIRA & MACEDO, 2011b). Primeiramente, a escolha de um inibidor deve ser baseada em um profundo entendimento do sistema biológico de uma praga específica, baseado em testes *in vitro* e *in vivo*.

1.9 Estratégias adaptativas dos insetos à defesa de plantas

Estudos bioquímicos e de expressão gênica das proteases intestinais de insetos em resposta a inibidores começaram a elucidar as respostas adaptativas dos insetos aos mesmos (JONGSMA *et al.*, 1995; ZHU-SALZMAN & ZENG, 2008; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Insetos respondem aos inibidores com uma variedade de mecanismos compensatórios, incluindo a produção elevada de proteases, produção de novas isoformas de proteases insensíveis ao inibidor ou a neutralização dos inibidores através da degradação proteolítica (ZHU-SALZMAN *et al.*, 2003; OPPERT *et al.*, 2005; PETEK *et al.*, 2012; HIVRALE *et al.*, 2013; STEVENS *et al.*, 2013).

NANDI *et al.* (1999) mostraram que a expressão de um gene de inibidor de tripsina de soja em plantas de tabaco transgênicas falham em conferir resistência contra *Helicoverpa armigera*. Alguns insetos fitófagos, incluindo a *Helicoverpa Zea* praga de muitas solanáceas como a batata se adaptaram aos inibidores da protease de suas plantas hospedeiras. A sobrevivência e o desenvolvimento larval não foram afetados pela presença de tais moléculas na sua dieta. Portanto, pesquisadores verificaram que eles têm a capacidade de expressar proteases que são insensíveis aos inibidores (DUNSE *et al.*, 2010; STEVENS *et al.*, 2013). GATEHOUSE *et al.* (1998) demonstraram que *H. armigera* apresenta 18 genes que codificam para tripsina e 14 que codificam para quimotripsinas. O nível de proteinases do tipo quimotripsinas foi significativamente aumentado enquanto que o nível das tripsinas não foram alterados devido à presença de inibidores. BROADWAY (1995) demonstrou que a

exposição crônica dos insetos a inibidores de proteinases promove a produção de enzimas digestivas parcialmente resistentes. PAULILLO *et al.* (2000) encontraram alterações na expressão de serinoproteinases em *Spodoptera frugiperda* com aparecimento de uma nova atividade trípica e um aumento significativo na atividade quimotríptica do inseto alimentados com inibidores de proteinases de soja, sugerindo que as enzimas digestivas tenham sofrido alterações nos aminoácidos que circundam o sítio de ligação, resultando em uma fraca interação com os inibidores.

Estas respostas adaptativas são resultados da coevolução planta-inseto. Assim, pesquisas atuais buscam identificar inibidores com alta atividade contra insetos-praga.

II. OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial inseticida de um inibidor de proteinase de sementes de *Inga vera* (IVTI) sobre o desenvolvimento de *Anagasta kuehniella* tanto fisiológico quanto bioquímico.

1.2 Objetivos específicos

- Purificar e isolar o inibidor de proteinase de sementes de *I. vera*;
- Verificar o potencial inseticida *in vitro* sobre diferentes insetos-praga;
- Analisar o efeito *in vivo* de IVTI sobre o desenvolvimento de *A. kuehniella*;
- Observar o consumo e utilização do alimento por *A. kuehniella* na presença e ausência de IVTI.
- Examinar os efeitos sobre a atividade enzimática digestiva de *A. kuehniella* quando submetidas num período de curto e longo prazo a dieta contendo IVTI;
- Verificar alteração no excremento de *A. kuehniella* quando submetida à dieta com IVTI;
- Analisar a resistência a degradação do IVTI pelas proteases intestinais de *A. kuehniella*;
- Examinar possíveis alterações das enzimas proteolíticas do homogenato intestinal das larvas de *A. kuehniella* em zimograma após ter submetida à dieta contendo IVTI;
- Averiguar os prováveis mecanismos de adaptação do inseto quando submetidos a dietas artificiais contendo inibidor.

III. MATERIAL

1.1 *Inga vera*

As sementes de *I. vera* foram cedidas pelo banco de sementes do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Estas sementes foram secas em estufa à 37°C e, posteriormente, acondicionadas em freezer a -20°C.

1.2 Insetos

Oito espécies de insetos-praga pertencentes à ordem Lepidoptera, divididos entre as famílias Noctuidae: *Spodoptera eridania*, *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* e *Anticarsia gemmatalis*; Crambidae: *Diatrea saccharalis*; e Pyralidae: *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*. Os insetos pertencentes a família Noctuidae e Crambidae foram cedidos pelo Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, do Laboratório de Biologia de Insetos, Departamento de Entomologia, ESALq, Piracicaba. Enquanto, os insetos da família Pyralidae foram fornecidos pelo Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

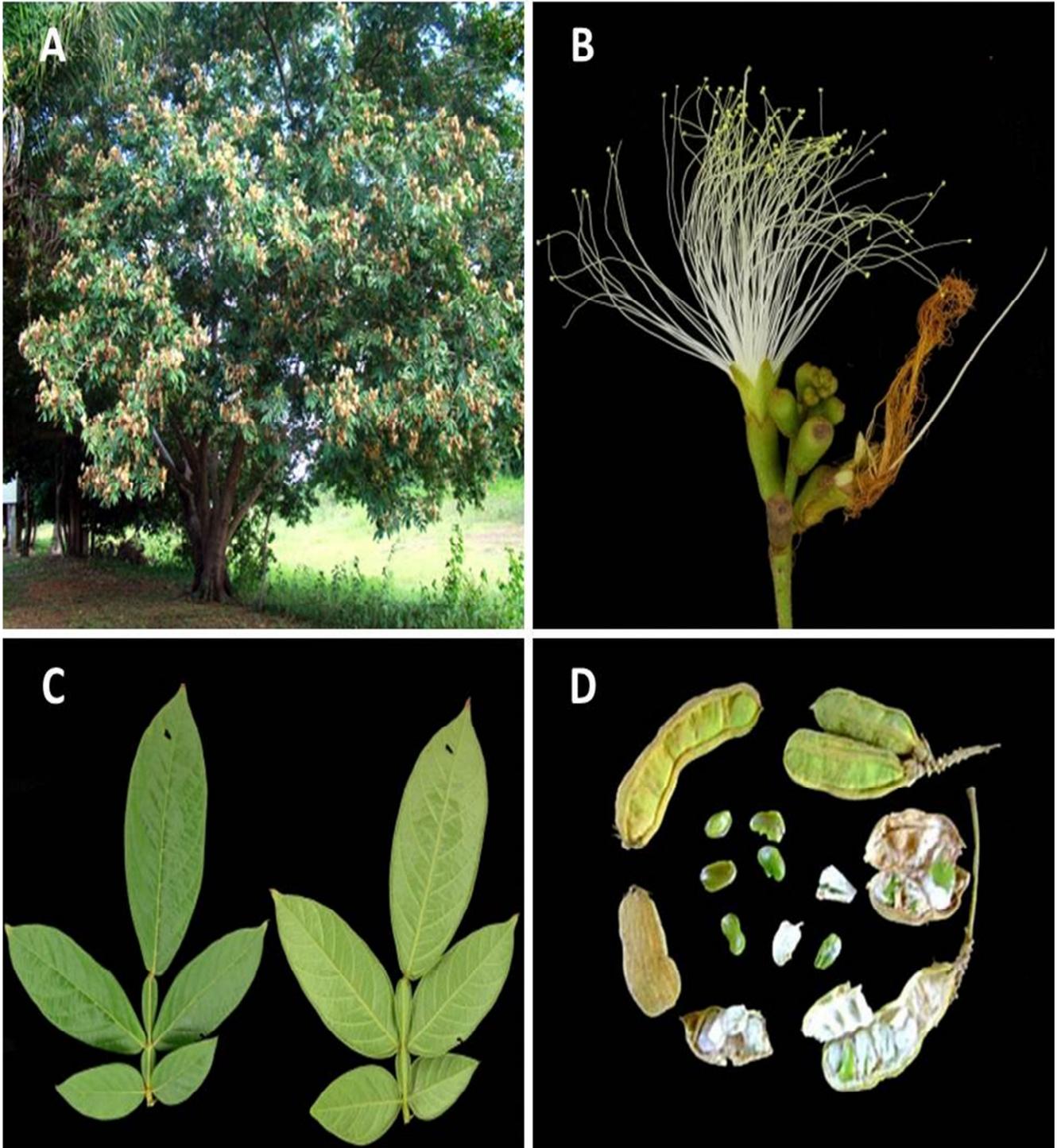


Figura 6. *Inga vera* Willd: (A) Árvore, (B) Flor, (C) Folha e (D) Frutos e sementes. Fotos: Bezerra, C.S, Biogeodb (<http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/>) e Colecionando frutas (<http://www.colecionandofrutas.org/ingavera.htm>)

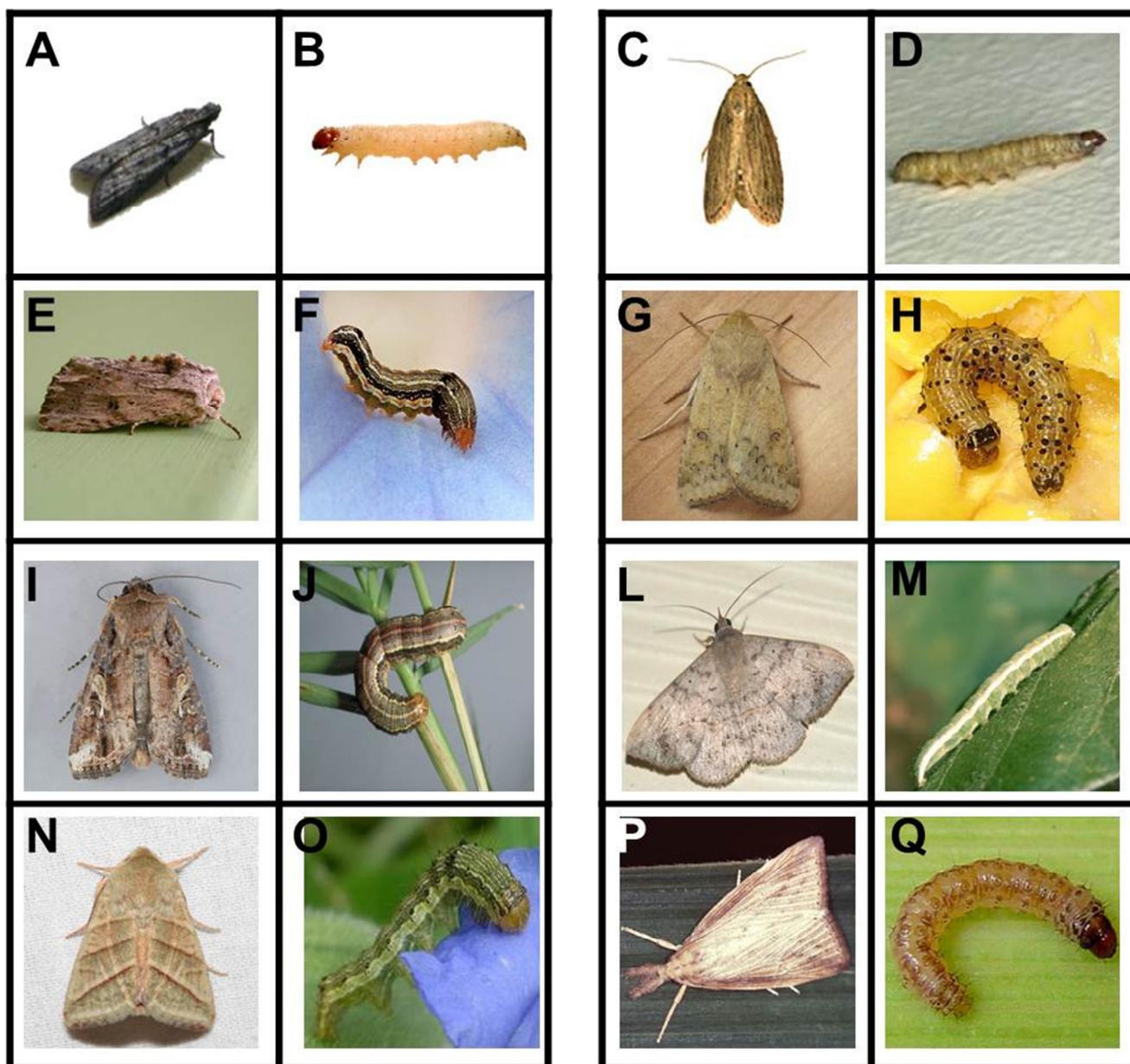


Figura 7. Insetos-praga utilizados no estudo. (A) Adulto de *Anagasta kuehniella*; (B) Larva de *A. kuehniella*; (C) Adulto de *Corcyra cephalonica*; (D) Larva de *C. cephalonica*; (E) Adulto de *Spodoptera eridania*; (F) Larva de *S. eridania*; (G) Adulto de *Helicoverpa zea*; (H) Larva de *H. zea*; (I) Adulto de *Spodoptera frugiperda*; (J) Larva de *S. frugiperda*; (L) Adulto de *Anticarsia gemmatalis*; (M) Larva de *A. gemmatalis*; (N) Adulto de *Heliiothis virescens*; (O) Larva de *H. virescens*; (P) Adulto de *Diatrea saccharalis* e (Q) Larva de *D. saccharalis*. Fotos: Bezerra, C. S ou bugguide (<http://bugguide.net/node/view/15740>)

IV. MÉTODOS

1.1 Purificação do inibidor de tripsina de sementes de *I. vera*.

1.1.1 Obtenção da farinha das sementes de *I. vera*

As sementes de *I. vera* foram trituradas em moinho elétrico a 27.000 rpm e peneiradas até se obter uma farinha fina. Para retirar o excesso de óleo dessas sementes realizou-se o processo de delipidação utilizando hexano. Após essa etapa, a farinha foi seca e acondicionada em frascos escuros e hermeticamente fechadas até sua utilização.

1.1.2 Obtenção do extrato bruto

À farinha da semente adicionou-se tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,6, na relação 1:10 (p/v), sob agitação constante durante 3 horas à 25°C. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 7500g durante 30 minutos, obtendo um precipitado que foi descartado e um sobrenadante chamado de extrato bruto (EB) que foi dialisado e liofilizado, sendo posteriormente, utilizado nas etapas de purificação.

1.1.3 Cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose

Uma quantidade de EB (50mg) foi dissolvida em 1,5 mL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. O material foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos e aplicado em coluna DEAE-Sepharose equilibrada com o mesmo tampão. Um gradiente salino de NaCl de 0-1 M foi utilizado para eluir as proteínas adsorvidas, sendo coletadas frações de 3 mL num fluxo de 40 mL/h. A detecção das proteínas foi feita a 280 nm.

1.1.4 Cromatografia de afinidade Sepharose-tripsina

O segundo pico da DEAE-Sepharose (D-II), eluído com gradiente salino (NaCl 0-1 M), foi dialisado, liofilizado e aplicado (8 mg) em coluna de afinidade Sepharose-Tripsina. A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6, com 100 mM de NaCl. A

eluição do material retido foi feita com HCl 0,1M num fluxo de 30 mL/h, onde frações de 1,5 mL foram coletadas. A detecção das proteínas foi feita a 280 nm. O pico eluído com HCl (ST-II), foi dialisado, liofilizado e nomeado IVTI.

1.2 Dosagem de proteínas

A concentração de proteína nas amostras foi determinada de acordo com o método de BRADFORD (1976), utilizando como proteína padrão para as quantificações albumina sérica bovina a 1 mg/mL.

1.3 Preparação do homogenato intestinal

A extração das proteases intestinais foi realizada de acordo com MACEDO *et al.* (2010). As larvas foram imobilizadas em gelo e tiveram seus intestinos removidos com auxílio de pinças. Os intestinos foram colocados em solução salina isotônica (NaCl 150 mM) e macerados com um homogeneizador de tecido (Potter-Elvehjem). O homogenato obtido foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 min à 4°C. O sobrenadante foi coletado, aliquoteado, conteúdo proteico quantificado e utilizado nos ensaios de atividade enzimática ou armazenados a -20°C.

1.4 Preparação do extrato fecal

As fezes de *A. kuehniella* alimentadas cronicamente em dietas sem ou contendo inibidor foram coletados e homogeneizado em NaCl 150 mM sobre o gelo com auxílio de um

homogeneizador (Potter-Elvehjem). O extrato fecal foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 min à 4°C. O sobrenadante foi separado e usado como fonte de enzima para ensaios enzimáticos, zimograma ou armazenados a -20°C.

1.5 Efeito *in vitro* de IVTI sobre as enzimas digestivas de diferentes insetos-praga

A atividade inibitória de IVTI foi testada contra as proteases intestinais de 8 espécies de insetos-praga: *S. eridania*, *S. frugiperda*, *H. virescens*, *H. zea* e *A. gemmatalis*; *D. saccharalis*; *A. kuehniella* e *C. cephalonica*. As larvas foram criadas em dieta artificial e permaneceram na mesma até atingirem o 4º instar e ,então, foi feita a extração das proteases intestinais de acordo com método descrito acima. Para analisar a capacidade de IVTI inibir, *in vitro*, as tripsinas dos insetos-praga acima diferentes concentrações de IVTI (0-0,5 µg) foram utilizadas junto a concentrações fixas de amostras do homogenato intestinal (2 µg). Após o período de incubação de 10 minutos, a atividade da tripsina foi verificada conforme o método que será descrito abaixo no tópico ensaios enzimáticos. Todos os ensaios foram realizados em triplicadas e a atividade das amostras sem o inibidor foi considerada como 100%.

1.6 Efeito *in vivo* de IVTI sobre o desenvolvimento de *A. kuehniella*

Com base no ensaio *in vitro*, a praga *A. kuehniella* foi escolhida para os ensaios *in vivo* a fim de avaliar a atividade biológica do inibidor. IVTI foi adicionado à dieta artificial em uma proporção de 1,0% do peso total da dieta. Uma dieta sem adição de inibidor foi usada como grupo controle. A dieta artificial foi preparada pela mistura de trigo integral e germe de trigo

(3:2). O bioensaio foi realizado em tubos de plástico contendo 200 mg de dieta onde quatro larvas neonatas foram colocadas, com um total de 10 repetições (n=40). Quando as larvas atingiram o quarto (21 dias) e o quinto instar (26 dias) em condições padrões, o efeito sobre o peso e a sobrevivência larval foi observado. O peso das pupas e a emergência dos adultos foram determinados no primeiro dia seguinte a pupação e mediante a emergência dos adultos, respectivamente.

1.7 Análise Nutricional

Os parâmetros do consumo e utilização do alimento foram comparados entre as larvas alimentadas em dieta controle e dieta contendo IVTI 1% ao fim do 4º instar. Além do peso larval, a dieta não consumida e as fezes produzidas separadas e pesadas foram utilizadas para o cálculo dos índices nutricionais, de acordo com o método de WALDBAUER (1968). Quatro parâmetros foram analisados: Eficiência de Conversão de alimento Ingerido (ECI), Eficiência de Conversão de alimento Digerido (ECD), Digestibilidade Aparente (AD) e Custo Metabólico (CM), que foram calculados utilizando as seguintes fórmulas:

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

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

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

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

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.

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

CM – representa a percentagem do alimento metabolizado em energia para manutenção dos processos vitais.

$$CM = 100 - ECD$$

Onde,

B = peso médio das larvas

I = alimento consumido

F = produtos de excreção

I-F = alimento assimilado

1.8 Ensaio biológico crônico

Larvas neonatas de *A. kuehniella* foram alimentadas em dieta artificial sem inibidor ou contendo IVTI 1% até o quarto instar (21 dias) e quinto instar (26 dias) e então elas foram removidas e dissecadas para preparação do homogenato intestinal que foi utilizado para os ensaios enzimáticos. O bioensaio foi realizado em tubos de plástico contendo 200 mg de dieta onde quatro larvas neonatas foram colocadas, com um total de 10 repetições (n=40). Os resultados experimentais são a média de três bioensaios independentes.

1.9 Ensaio biológico agudo

As larvas de *A. kuehniella* da colônia desenvolvendo em dietas artificiais em condições padrões foram transferidas no início do quarto instar para dietas experimentais (controle e IVTI 1%) e expostas ao tratamento por 72h. Após esse período, as larvas do grupo controle metade foram dissecadas e outra metade permaneceu na dieta por mais 72h. Em relação às larvas submetidas à dieta contendo IVTI 1%, metade foi dissecada e outra metade foi

transferida para tubos plásticos contendo somente dieta sem inibidor por mais 72h, denominado grupo 144h e, então, dissecadas. O bioensaio de curto prazo foi realizado em tubos plásticos contendo 500 mg de dieta onde dez larvas foram colocadas, com um total de seis repetições (n=60). A atividade enzimática do grupo 72h e 144h foram analisadas. Os resultados experimentais são a média de três bioensaios independentes

1.10 Atividade enzimática

A atividade enzimática das proteases do intestino médio das larvas e do extrato fecal foi realizada em microplacas de acordo com OLIVEIRA *et al.* (2013). Para atividade trípica, uma solução estoque de BApNA (100 mM) foi, primeiramente, preparada em DMSO e então diluído para solução de uso (1 mM) em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Amostras de 2 µg do homogenato intestinal ou fecal foram incubados com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 por 10 min e, então, 200 µL de BApNA (1 mM) foi adicionado, completando para o volume final de 270 µL. O ensaio foi executado por 30 min à 37°C. Para atividade quimotríptica, uma solução estoque de Suc-AAPF-pNA (100 mM) foi preparada em uma solução de 10% de dimetilformamida diluída em 50 mM Tris-HCl pH 8,0 e então diluída na concentração final de 1 mM no mesmo tampão. Amostras de 2 µg do homogenato intestinal ou fecal foram incubados com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0 por 10 min e, então, 20 µL de Suc-AAPF-pNA (1mM) foi adicionado, completando para o volume final de 120 µL. O ensaio foi executado por 5 min à 37°C. Para análise da sensibilidade das enzimas do tipo tripsina do intestino médio das larvas à inibição por IVTI, uma curva de inibição foi feita com concentrações crescentes de IVTI (0 – 0,5 µg) e o ensaio da atividade trípica foi realizada como descrita acima. Em todos ensaios a formação do cromóforo p-nitroanilide foi determinado por

monitoramento da absorbância à 410 nm (VersaMax Microplate Reader, Molecular Devices, US)

1.11 Digestão *in vitro* de IVTI por proteases intestinais de *A. kuehniella*

IVTI foi incubado com proteases do intestino médio de *A. kuehniella* de acordo com OLIVEIRA *et al.* (2013). As amostras de IVTI/ intestino médio na proporção proteica de 1:5 (p/p) foi incubado à 37°C, e um total de 7 intervalos de digestão foi usado (0; 1; 3; 6; 12; 24 e 48h). A digestão foi interrompida por imersão dos tubos em água fervente durante 2 min e imediatamente em água gelada. A degradação do BSA foi usada como controle positivo da atividade proteolítica das enzimas intestinais. BSA foi incubado com proteases intestinais da larva na mesma proporção à 37°C e um intervalo mais curto de digestão foi usado (0; 0,5; 1; 2; 3; e 4h). As massas moleculares relativa do produto da digestão foram separadas por eletroforese como descrito abaixo.

1.12 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE) foi desenvolvida segundo o método de Laemmli (1970). As placas de poliacrilamida apresentam um gel de empilhamento e um gel de corrida. O gel de corrida foi preparada com 12,5% de poliacrilamida preparada em tampão Tris-HCl 150 mM, pH 8,8. O gel de empilhamento foi preparada com 5% de poliacrilamida utilizando-se o tampão Tris-HCl 500 mM, pH 6,8. Em ambos os géis são acrescentados 0,1% (v/v) de SDS 20%, 0,025% PSA e 0,1% TEMED. A SDS-PAGE é realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer

Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de massa molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl 0,08 M, pH 6,8; 10% de glicerol; 4% de SDS; 0,001% de azul de bromofenol). As proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular foram: fosforilase (97 kDa), albumina sérica bovina (66 kDa), ovalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (31 kDa), inibidor de tripsina de soja (21 kDa) e α -lactoalbumina (14 kDa). A corrida eletroforética foi realizada em voltagem de 200 v à 4°C.

1.13 Detecção da atividade de IVTI nas fezes de *A. kuehniella*

Para verificar se o inibidor era eliminado nas fezes das larvas alimentadas com o mesmo realizou uma SDS-PAGE, como descrito acima. Um ensaio da atividade inibitória utilizando o extrato fecal também foi realizado a fim de conferir se o IVTI eliminado nas fezes permanecia funcional, ou seja, mantinha sua atividade inibitória. Para isso, concentrações crescentes (0,25; 0,5; 0,75 e 1 μ g) do extrato fecal foram incubados com volumes variáveis de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8, seguido de 4 μ L de tripsina (0,125 mg/mL). Após 10 minutos de incubação a 37°C, 200 μ L de BApNA a 1 mM foi adicionado completando um volume final de 270 μ L/poço. O tempo total do ensaio foi de 30 minutos. A mudança na absorbância a 410 nm subtraída a leitura do branco foi detectado no leitor de microplacas VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices).

1.14 Zimograma

A atividade das proteinases presentes no fluido do intestino médio das larvas do bioensaio de longo e curto prazo assim como das fezes foi analisada em gel de eletroforese

native-page incubado com caseína 1% de acordo com método proposto por LOMATE & HIVRALE (2011), com algumas modificações. O homogenato intestinal e fecal (5 µg de proteína) foram incubados com tampão de amostra não desnaturante por 15 min à 37°C. Outro grupo de amostra foram incubados, além do tampão amostra, com 6 µL de TLCK (10 mM), inibidor específico da enzima tripsina. Assim, as amostras foram eletroforéticamente separadas em um gel native-PAGE (gel de empilhamento 4% e de corrida 10%) numa voltagem de 120 v a 4°C. Então, o gel foi lavado com água destilada e equilibrado em tampão Glicina-NaOH 100 mM pH 10 por 15 min. Após o equilíbrio, o gel foi colocado em solução de caseína 1% diluída no mesmo tampão de equilíbrio e incubado por 1h à 37°C. Por último, o gel foi corado com Coomassie Brillhante Blue R-250 e descorado. As bandas brancas visualizadas contra o fundo azul indicam atividade proteolítica.

1.15 Análise dos dados

Os dados obtidos com as diferentes etapas do ensaio biológico, assim como nos ensaios bioquímicos foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade (ANOVA)

V. RESULTADOS

1.1 Purificação de IVTI

1.1.1 Cromatografia em coluna de DEAE-Sepharose

O cromatograma (figura 8) obtido a partir da aplicação do EB de *I. vera* na coluna de troca iônica DEAE-Sepharose apresentou um primeiro pico D-1 eluído antes do gradiente salino e a presença de dois picos, D-II e D-III, eluídos em torno de 0,2 – 0,4 M de NaCl, respectivamente. Entretanto, apenas o pico D-II apresentou atividade inibitória sendo, então, dialisado, liofizado e utilizado para próxima etapa de purificação.

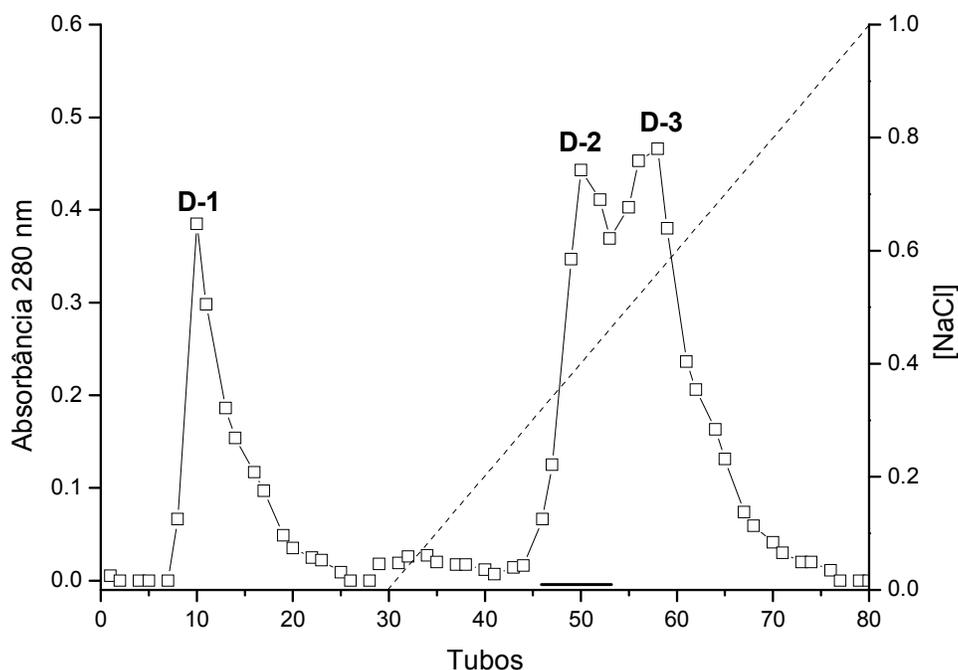


Figura 8. Perfil cromatográfico DEAE-Sepharose, coluna equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0. Frações de 3 mL foram coletadas num fluxo de 40 mL/h. Gradiente Salino de NaCl (0-1 M). A detecção das proteínas foi acompanhada a 280 nm. A fração que apresentou atividade inibitória está evidenciada por uma barra.

1.1.2 Cromatografia em coluna de Sepharose-tripsina

A fração D-II da DEAE-Sepharose foi submetido à cromatografia de afinidade Sepharose-tripsina, apresentando dois picos de proteínas no seu perfil cromatográfico, um anterior (ST-I) e um posterior (ST-II) à eluição da coluna com HCl 0,1M (Figura 9). Apenas o pico ST-II apresentou atividade inibitória, sendo então dialisado, liofilizado e denominado IVTI.

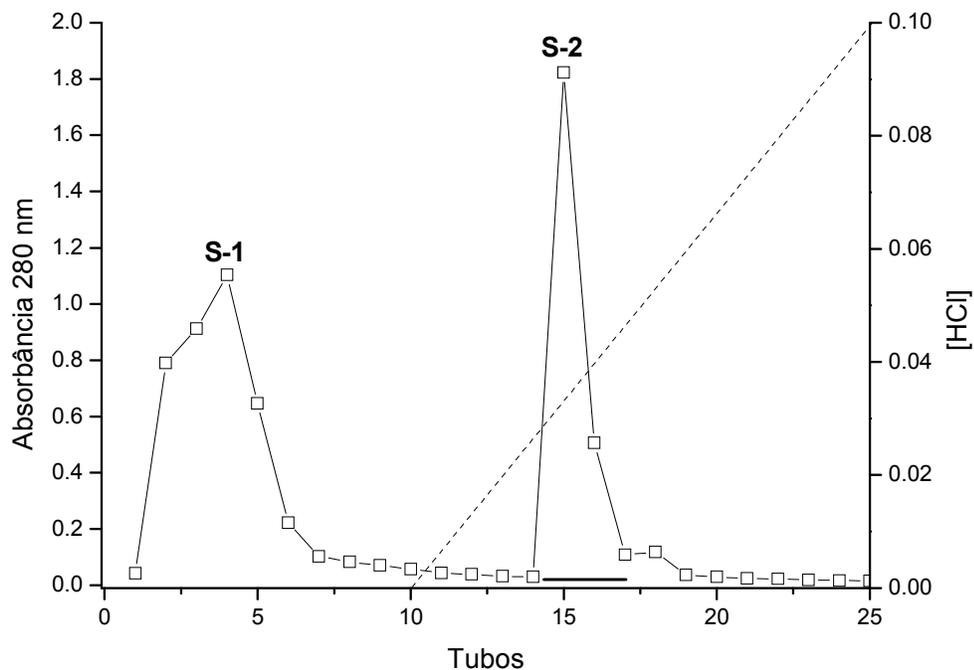


Figura 9. Perfil cromatográfico Sepharose-Tripsina, coluna equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1 M com 0,1 M de NaCl, pH 7,6. Frações de 1,5 mL foram coletadas num fluxo de 30 mL/h. A eluição da proteína ligada a resina foi realizada com HCl 0,1 M. A detecção das proteínas foi acompanhada a 280 nm. O pico que apresentou atividade inibitória está evidenciado por uma barra.

1.1.3 Tabela de purificação do inibidor

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos nas etapas de purificação do inibidor.

Tabela 2. Purificação do inibidor de *Inga vera*

| Etapa | Proteína total (mg) | Atividade inibitória total (UI) x 10 ⁶ | Atividade específica (UI/mg) x 10 ³ | Rendimento (%) | Purificação (vezes) |
|--------------------|---------------------|---|--|----------------|---------------------|
| Extrato Bruto | 729 | 301,8 | 4,14 | 100 | 1 |
| DEAE-Sepharose | 102.2 | 45,58 | 4,46 | 84,89 | 1,07 |
| Sepharose-tripsina | 38.1 | 21,56 | 5,66 | 52,69 | 1,36 |

1.1.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

A figura 10 mostra as frações obtidas nas etapas de purificação de IVTI. Nota-se que IVTI é uma proteína constituída por uma única cadeia polipeptídica de massa molecular aparente de 20 kDa mesmo em condições redutoras, na presença de 100 mM DTT.

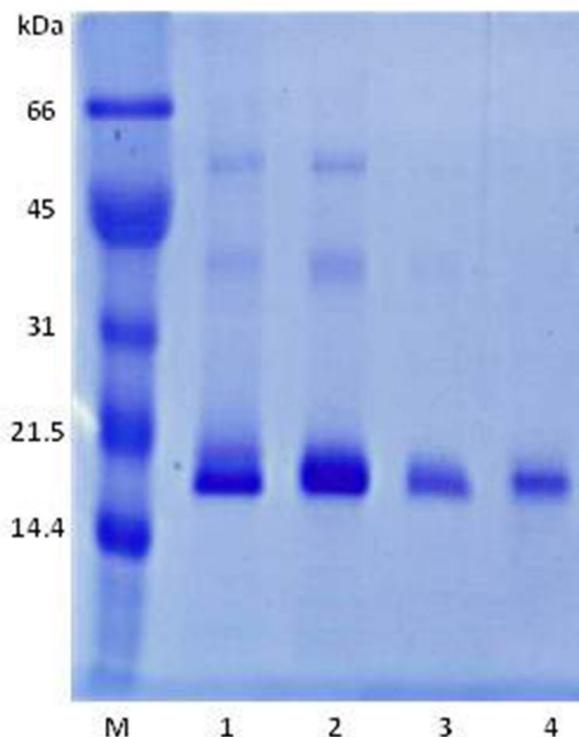


Figura 10. SDS-PAGE 12,5% das etapas de purificação do IVTI: (M) Marcador de peso molecular; (1) Extrato bruto; (2) Cromatografia de troca iônica (DEAE-II); (3) Cromatografia de afinidade (ST-II) e (4) Cromatografia de afinidade (ST-II) com 100 mM de DTT.

1.2 Efeito *in vitro* de IVTI sobre as enzimas digestivas de diferentes insetos-praga

A análise da atividade inibitória de IVTI contra as proteases intestinais de alguns insetos-praga mostrou a formação de dois grupos de tripsinas de acordo com a sua sensibilidade de inibição. O primeiro grupo é representado pelas tripsinas insensíveis às quais foram fracamente inibidas por IVTI observado nas larvas de *A. gemmatalis* e *S. eridania* que apresentaram uma atividade residual de 86% e 63%, respectivamente. Já o segundo grupo é formado pelas tripsinas sensíveis que foram fortemente inibidas por IVTI observado nas larvas de *H. zea*, *S. frugiperda*, *C. cephalonica*, *H. virescens* e *A. kuehniella* com atividade residual variando de 32 a 9% (Figura 11).

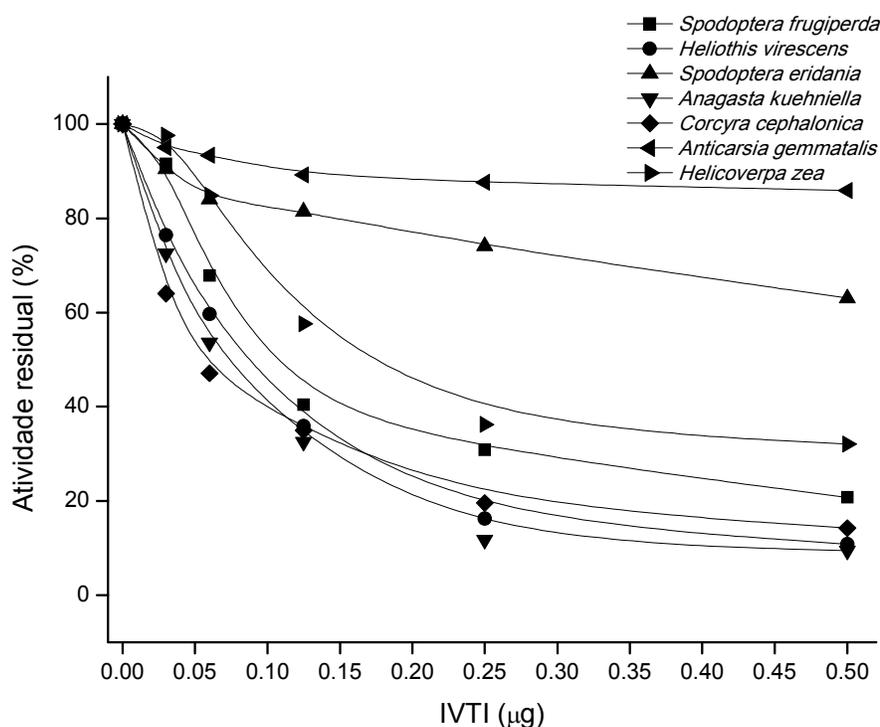


Figura 11. Atividade inibitória de IVTI, *in vitro*, contra proteases intestinais de larvas de 4º instar de insetos-praga de grande importância econômica.

1.3 Efeito *in vivo* de IVTI sobre o desenvolvimento de *A. kuehniella*

As larvas alimentadas em dieta controle apresentaram um peso larval médio de $8,75 \pm 0,56$ mg e $22,37 \pm 0,87$ mg, no quarto e quinto instar, respectivamente. Já as larvas alimentadas com IVTI 1% foi de $4 \pm 0,72$ mg e $10,63 \pm 0,96$ mg, ocorrendo uma redução significativa de 54% nas larvas de quarto instar e de 52% nas de quinto instar em relação ao controle (Figura 12).

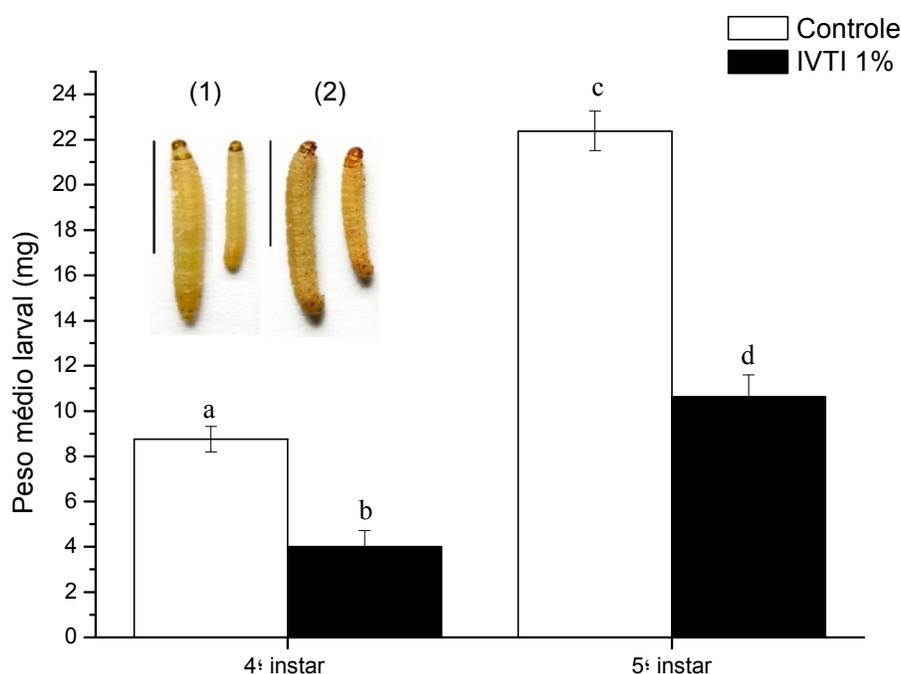


Figura 12. Peso médio das larvas de 4º e 5º instares de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI 1%. Foto: Variação do tamanho das larvas de (1) 4º instar e (2) 5º instar alimentadas em dieta controle (esquerda) ou contendo IVTI 1% (direita). Letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Em relação à sobrevivência em ambos os instares alimentados com IVTI mostrou uma mortalidade significativa de 15% (Figura 13).

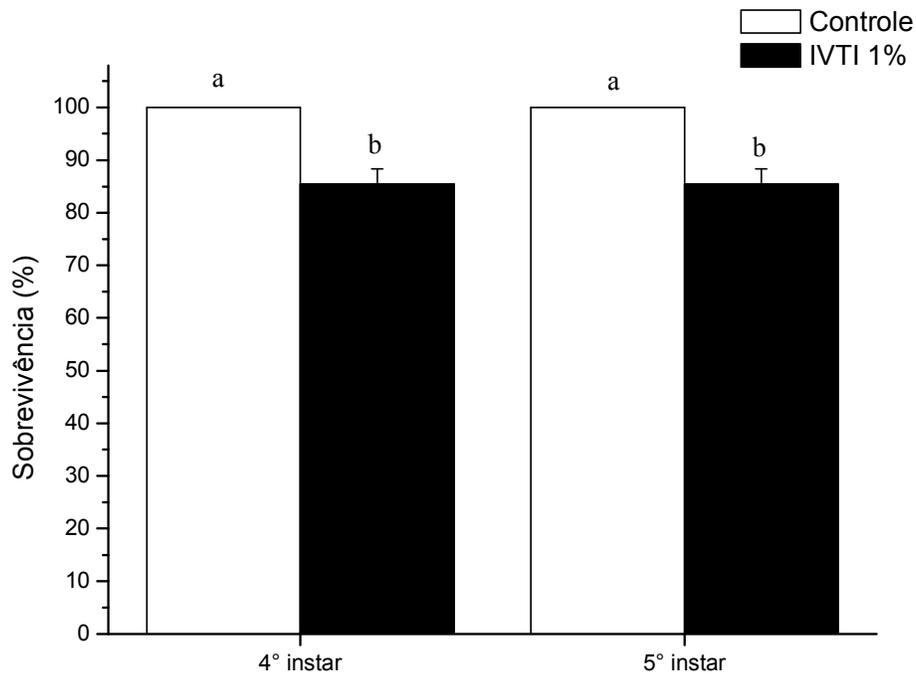


Figura 13. Taxa de sobrevivência das larvas de 4° e 5° instares de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI 1%. Letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A tabela 3 mostra que o consumo de IVTI não afetou o peso das pupas, o período pupal e a emergência dos adultos. Entretanto o período larval foi prolongado em 8 dias até atingirem a fase de pupa.

Tabela 3. Efeito de IVTI sobre o desenvolvimento de *A. kuehneilla*.

| | Controle | IVTI 1% |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Peso larval (mg) | | |
| 4° instar | 8,75 ± 0,56 _a | 4 ± 0,72 _b |
| 5° instar | 22,37 ± 0,87 _a | 10,63 ± 0,96 _b |
| Peso pupal (mg) | | |
| Macho | 22,34 ± 1,37 _a | 21,45 ± 1,69 _a |
| Fêmea | 26,75 ± 1,18 _a | 25,81 ± 1,40 _a |
| Período larval (dias) | 30,71 ± 1,31 _a | 38,77 ± 1,07 _b |
| Período pupal (dias) | 8,15 ± 1,64 _a | 7,05 ± 2,81 _a |
| Emergência (%) | 100 _a | 100 _a |
| Sobrevivência (%) | | |
| 4° instar | 100 _a | 85,14 ± 2,94 _b |
| 5° instar | 100 _a | 85,14 ± 2,94 _b |

Letras diferentes indicam que a diferença entre os tratamentos são significantes (ANOVA, p<0,05)

1.4 Análise do consumo e utilização do alimento

As figuras 14 e 15 mostram os efeitos de IVTI no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas pelas de quarto instar de *A. kuehniella*. IVTI causou uma diminuição de 57,85% na quantidade de dieta consumida e de 62,57% na quantidade de fezes produzidas em relação as larvas submetidas a dieta controle.

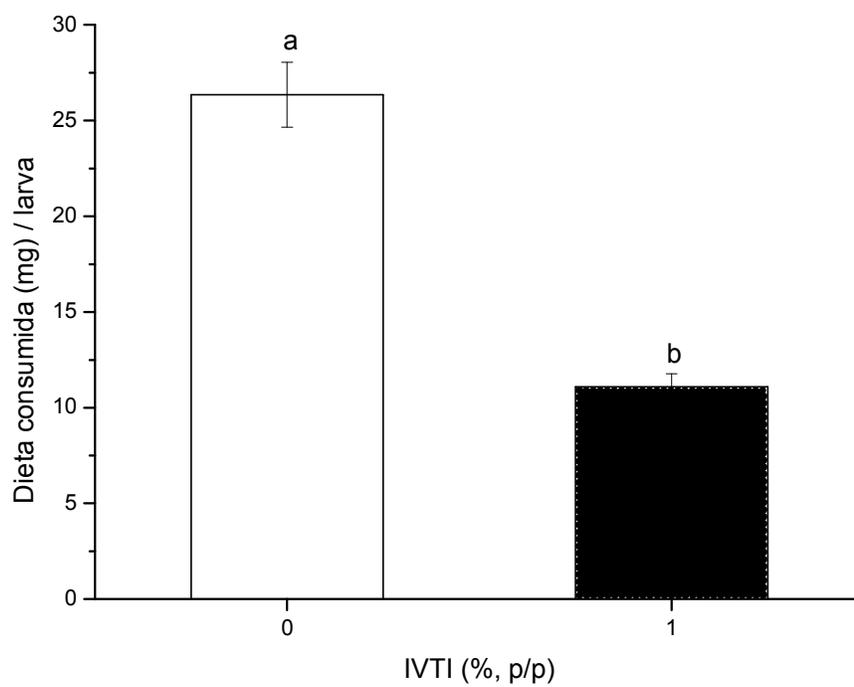


Figura 14. Quantidade de dieta consumida pelas larvas de 4^o instar de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI 1%. Letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

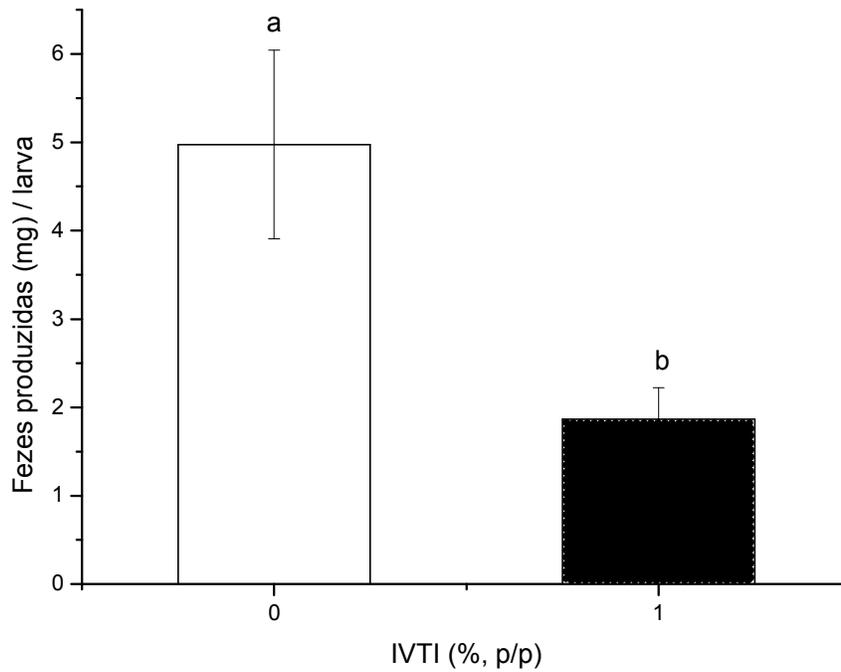


Figura 15. Quantidade de fezes produzidas pelas larvas de 4º instar de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI 1%. Letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Os parâmetros nutricionais relacionados na Tabela 4 mostram que as larvas alimentadas com IVTI 1% tiveram um impacto negativo na utilização afetando seu metabolismo. Houve uma redução tanto na eficiência de conversão alimento ingerido (ECI) quanto do alimento digerido (ECD) e um aumento no custo metabólico (CM).

Tabela 4. Índices nutricionais de larvas de 4^o instar de *A. kuehniella* alimentadas em dietas artificiais contendo IVTI e na sua ausência. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo. Eficiência de Conversão do alimento Ingerido (ECI), Eficiência da Conversão do alimento Digerido (ECD) Digestibilidade Aparente (AD) e Custo Metabólico (CM).

| Índices nutricionais | Controle | IVTI 1% |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|
| ECI (%) | 8.63 ± 0.55 _a | 5.49 ± 1.24 _b |
| ECD (%) | 10.62 ± 0.41 _a | 6.57 ± 1.37 _b |
| AD (%) | 81.24 ± 2.97 _a | 83.27 ± 2.15 _a |
| CM (%) | 89.37 ± 0.41 _a | 93.43 ± 1.37 _b |

1.5 Efeito crônico de IVTI sobre as enzimas digestivas de *A. kuehniella*

O consumo de IVTI pelas larvas de quarto e quinto instares de *A. kuehniella* reduziu a atividade trípica em 65% e 58%, respectivamente (Figura 16).

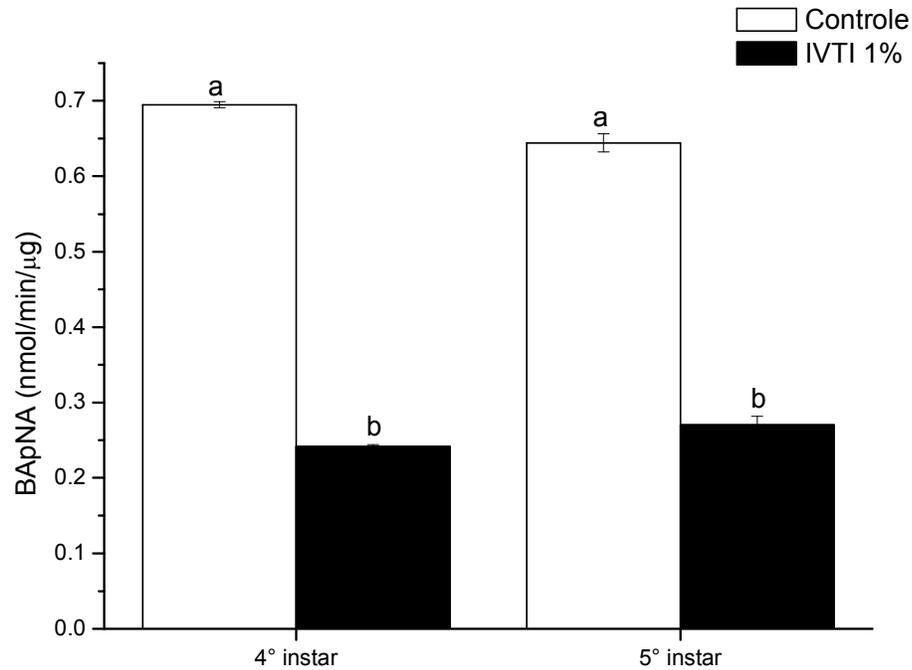


Figura 16. Efeito crônico de IVTI sobre a atividade trípica do intestino médio das larvas de 4° e 5° instares de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI 1%. Letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Em relação à atividade quimotríptica observou um aumento de 39% e 57% nas larvas alimentadas com IVTI 1% no quarto e quinto instares, respectivamente (Figura 17).

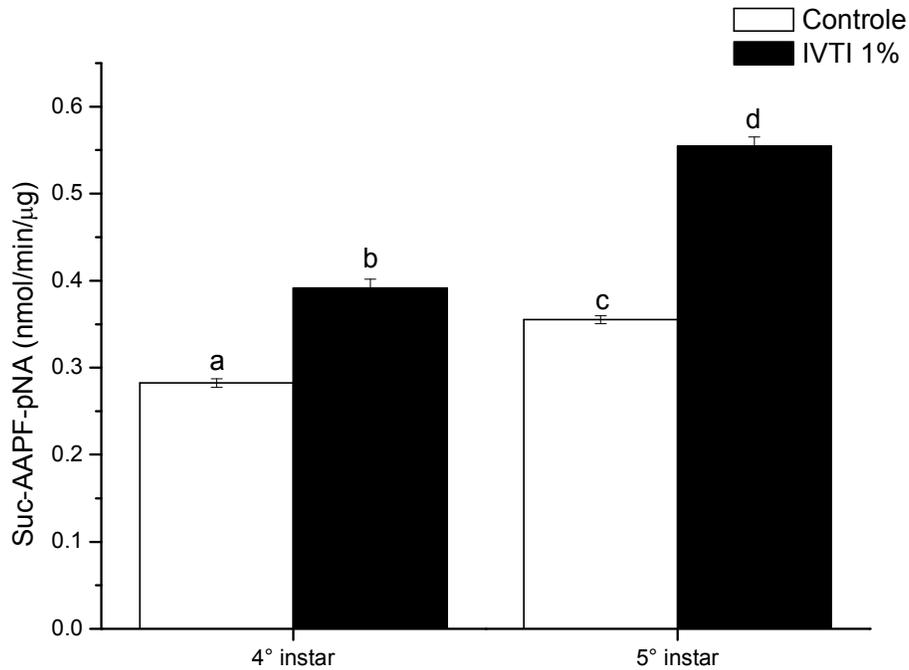


Figura 17. Efeito crônico de IVTI sobre atividade quimotríptica do intestino médio das larvas de 4° e 5° instares de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI 1%. Letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Complementando os dados, para analisar a sensibilidade das enzimas tripsinas presente no intestino médio de *A. kuehniella* a partir de larvas alimentadas em dieta controle e contendo IVTI 1%, o homogenato intestinal foi incubado com concentrações crescentes de IVTI. A atividade anti-triptica revelou que as enzimas do tipo tripsina das larvas que consumiram IVTI continuam susceptíveis a inibição por IVTI (Figura 18).

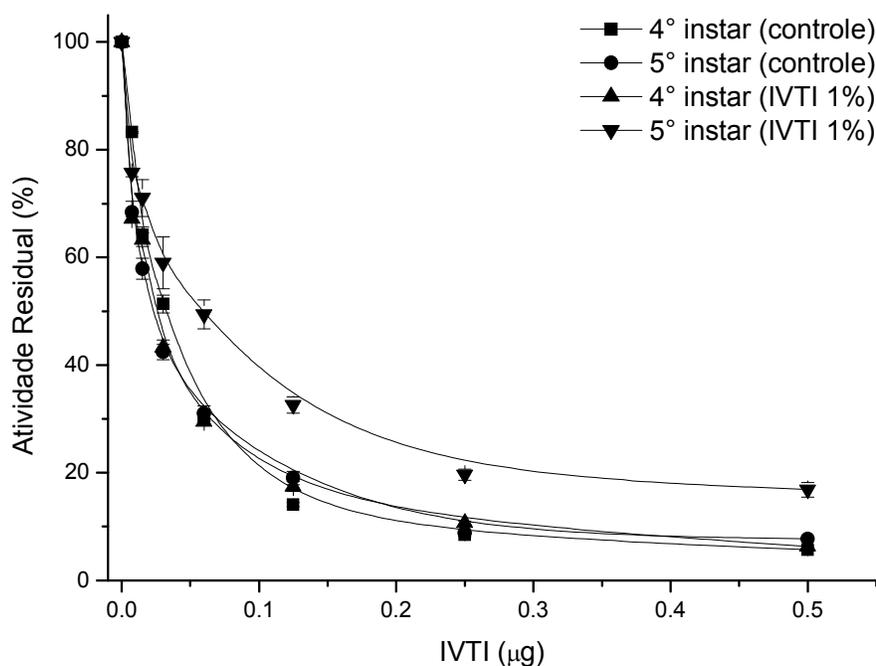


Figura 18. Atividade inibitória do IVTI sobre as tripsinas do fluido intestinal de larvas de 4º e 5º instares de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI do bioensaio de exposição crônica ao IVTI. Homogenato intestinal foi incubado com concentrações crescentes de IVTI e a atividade trípica residual foi determinada pela hidrólise do substrato BApNA.

1.6 Efeito agudo de IVTI sobre as enzimas digestivas de *A. kuehniella*

A atividade proteolítica da tripsina e quimotripsina no ensaio de curto prazo mostraram também alterações. A atividade trípica das larvas expostas ao IVTI por 72h tiveram uma diminuição de 55%. Quando essas larvas voltaram para uma dieta na ausência do inibidor por igual período (grupo 144h) o perfil da atividade da enzima analisada retornou ao nível do grupo controle (Figura 19).

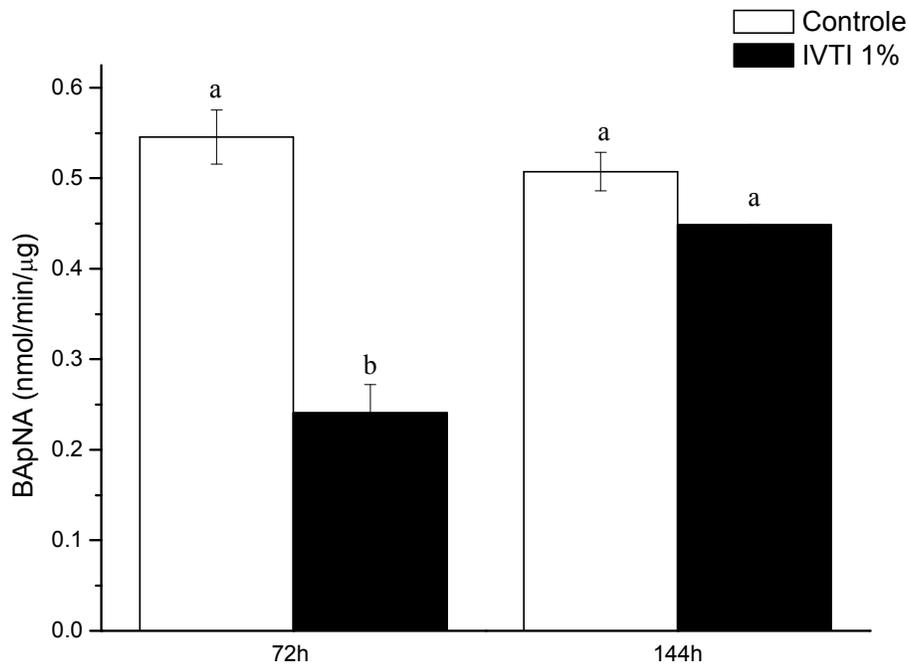


Figura 19. Efeito agudo de IVTI sobre a atividade trípica do intestino médio das larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI 1%. Letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Em relação à atividade quimotríptica as larvas submetidas à dieta contendo IVTI por 72h tiveram um aumento de 24% da atividade da enzima. E quando retornadas para dieta controle pelo mesmo período observou uma pequena redução da atividade (Figura 20).

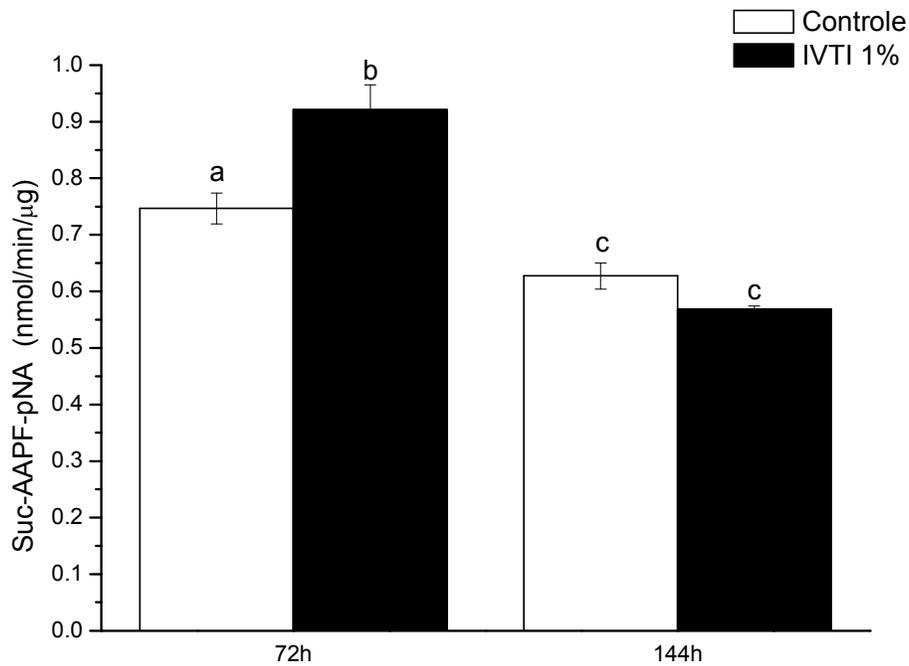


Figura 20. Efeito agudo de IVTI sobre a atividade quimotríptica do intestino médio das larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI 1%. Letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

O IVTI ainda foi capaz de inibir as enzimas do tipo tripsina após tratamento, portanto, essas continuam sensíveis à ação do inibidor (Figura 21).

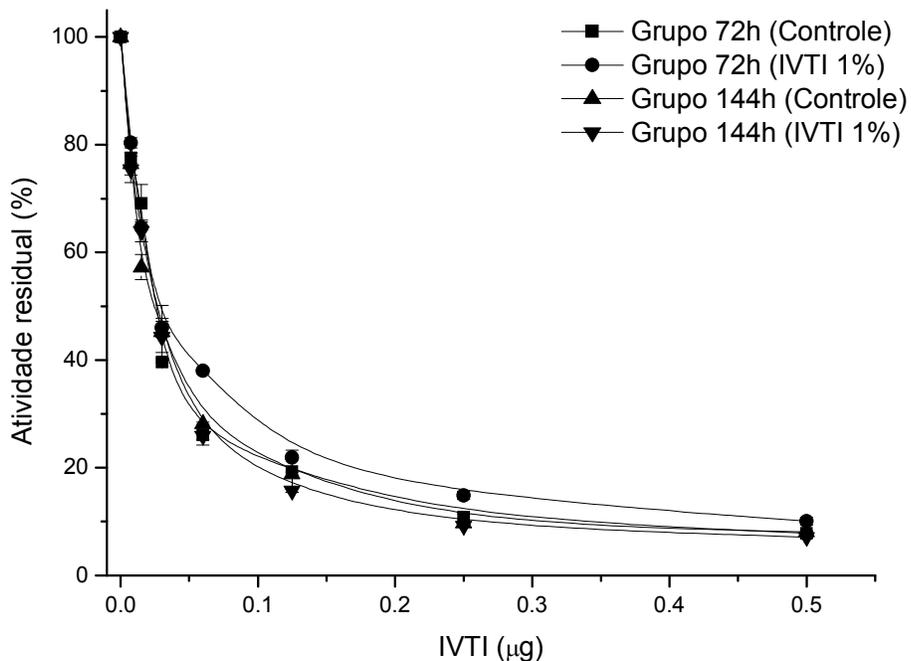


Figura 21. Atividade inibitória do IVTI sobre as tripsinas do fluido intestinal de larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI do bioensaio de exposição aguda ao IVTI. Homogenato intestinal foi incubado com concentrações crescentes de IVTI e a atividade trípica residual foi determinada pela hidrólise do substrato BApNA

1.7 Digestão *in vitro* de IVTI por proteases intestinais de *A. kuehniella*

As figuras 22 e 23 mostram que o IVTI não foi degradado pelas proteases intestinais de *A. kuehniella* tanto no bioensaio crônico quanto no agudo, durante o tempo analisado. Entretanto BSA foi completamente digerido pelas proteases das larvas alimentadas com dieta controle ou do grupo 144h durante as quatro horas, o mesmo não foi observado nas larvas alimentadas cronicamente com IVTI ou por 72 horas.

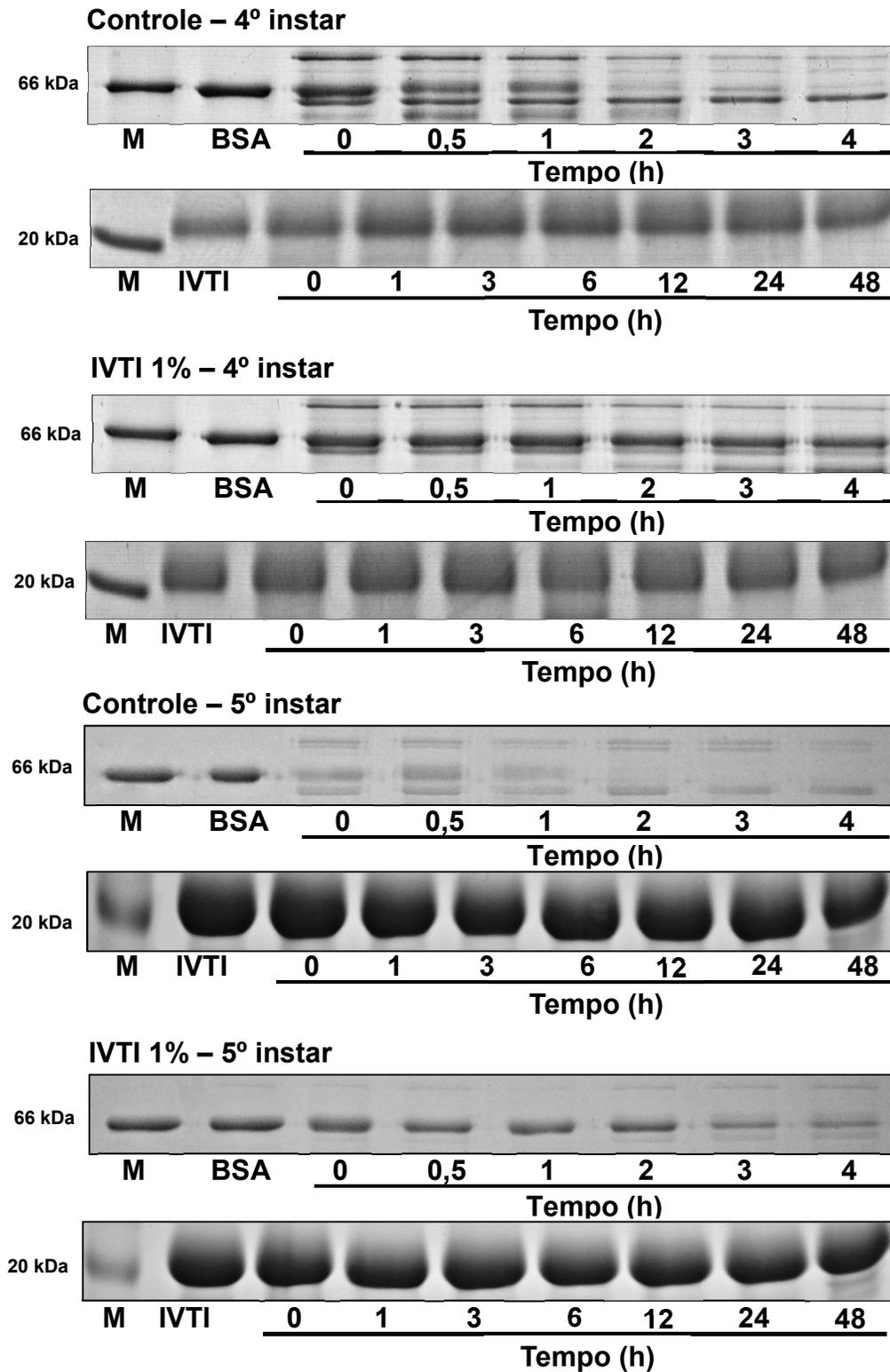


Figura 22. Digestão *in vitro* de IVTI por proteinases intestinais *A. kuehniella* do bioensaio crônico. O IVTI foi incubado na proporção de 1:5 (inibidor: homogenato intestinal). BSA foi usado como controle positivo sob as mesmas condições. A digestão ocorreu no intervalo de tempo indicado.

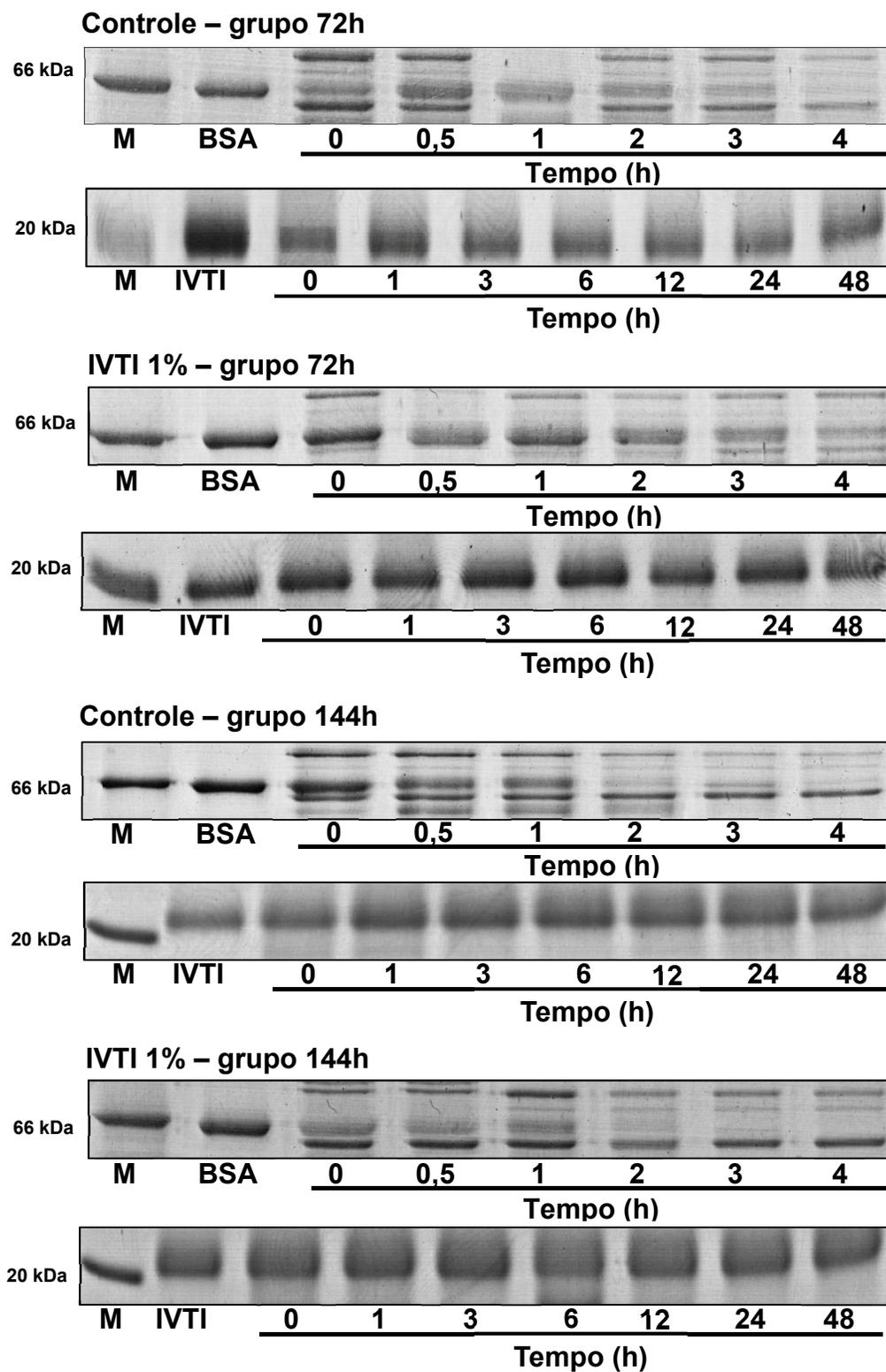


Figura 23. Digestão *in vitro* de IVTI por proteinases intestinais *A. kuehniella* do bioensaio agudo. O IVTI foi incubado na proporção de 1:5 (inibidor: homogenato intestinal). BSA foi usado como controle positivo sob as mesmas condições. A digestão ocorreu no intervalo de tempo indicado.

1.8 Efeito de IVTI sobre a atividade proteolítica das fezes de *A. kuehniella*

A atividade da tripsina e quimotripsina foram investigadas nas fezes de *A. kuehniella* alimentadas cronicamente com o inibidor. A atividade trípica apresentou níveis semelhantes de atividade tanto nas larvas alimentadas com dieta controle quanto as que consumiram IVTI (Figura 24).

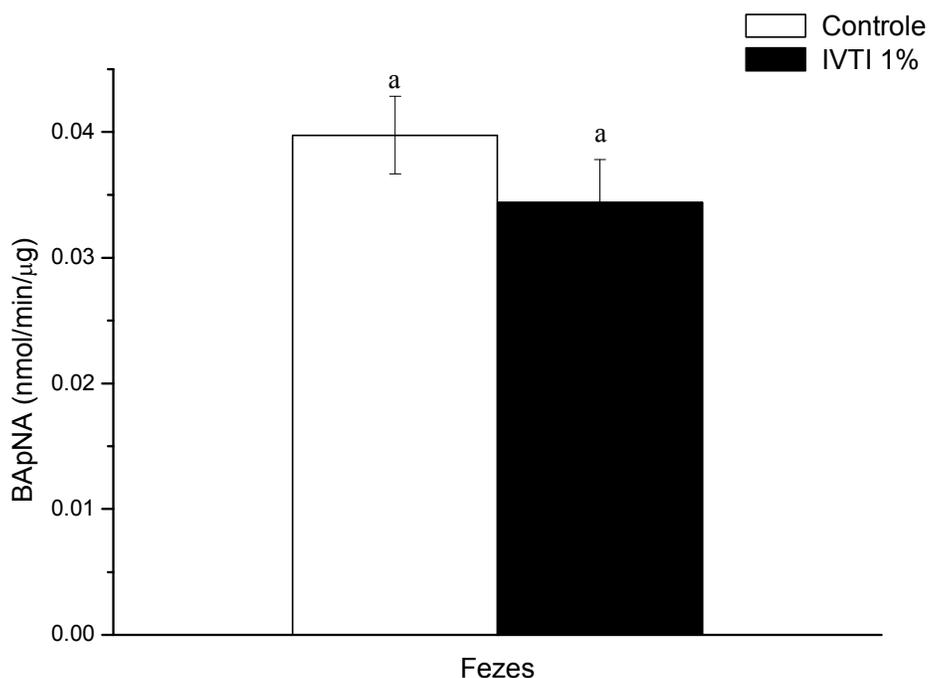


Figura 24. Atividade trípica das fezes das larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI 1%. Letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Em comparação, a atividade quimotríptica das fezes das larvas alimentadas com IVTI foi 1,76 vezes maior que o controle (Figura 25).

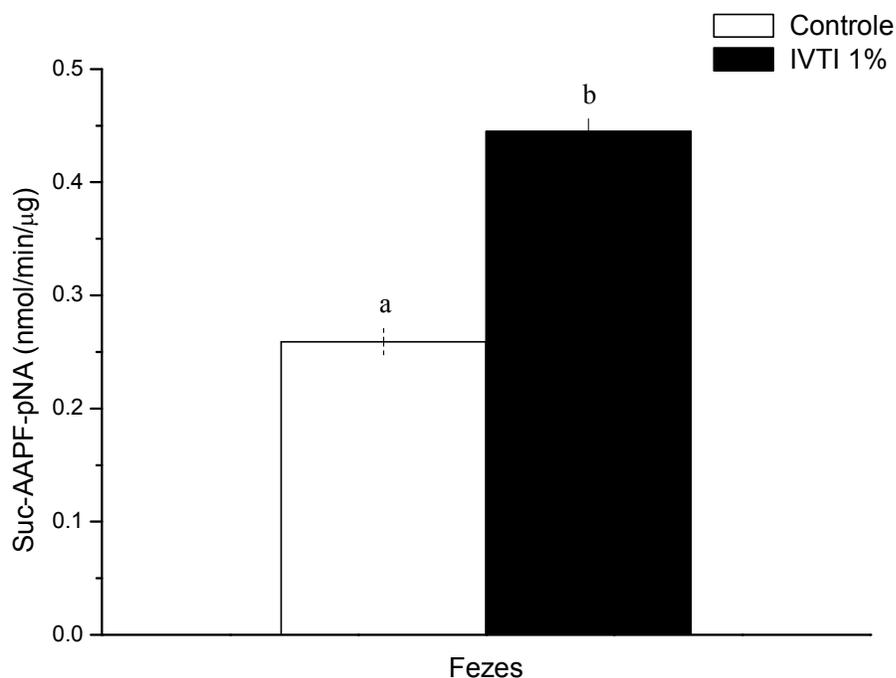


Figura 25. Atividade quimotríptica das fezes das larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI 1%. Letras diferentes indicam que houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Através de uma eletroforese (SDS-PAGE 12,5%) observou-se que uma banda como peso molecular semelhante com IVTI era eliminado nas fezes das larvas que foram alimentadas com o inibidor (Figura 26). O ensaio de atividade inibitória utilizando o extrato fecal contra a tripsina bovina confirmou a presença do inibidor nas fezes e o mesmo permanece com a capacidade de inibir a enzima alvo (Figura 27).

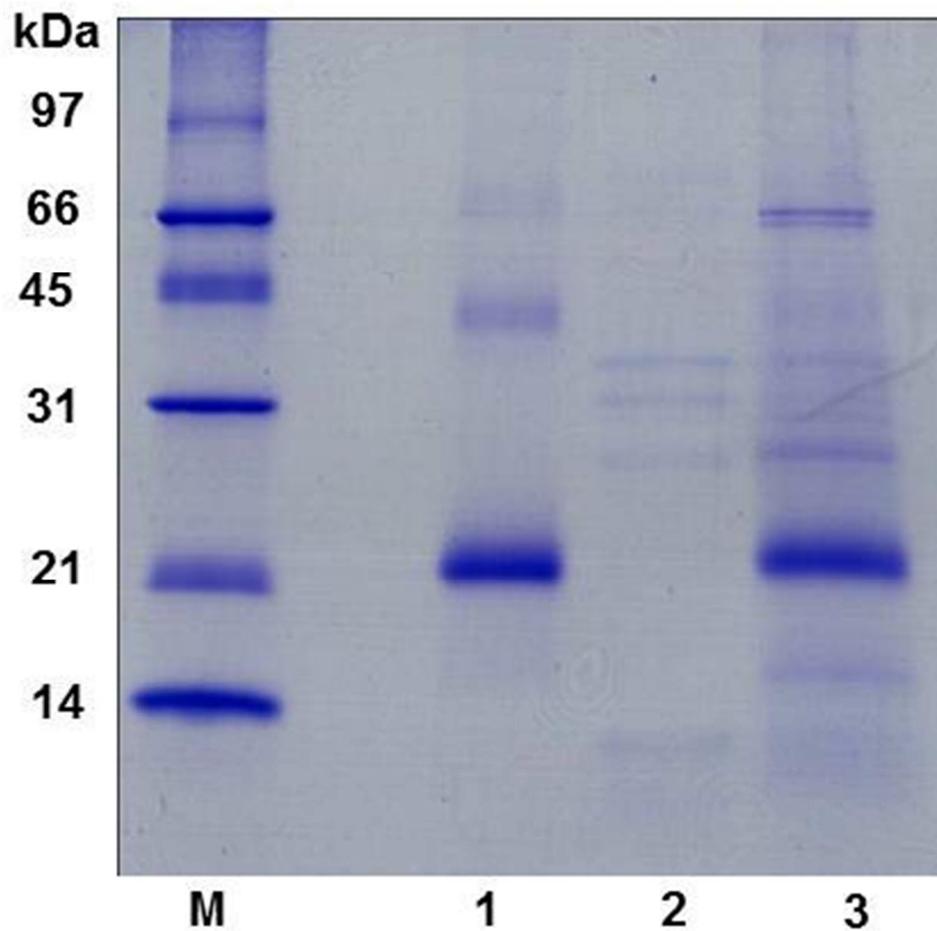


Figura 26. SDS-PAGE 12,5% das fezes das larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI 1%. (M) Marcador; (1) IVTI; (2) Fezes controle; (3) Fezes tratamento.

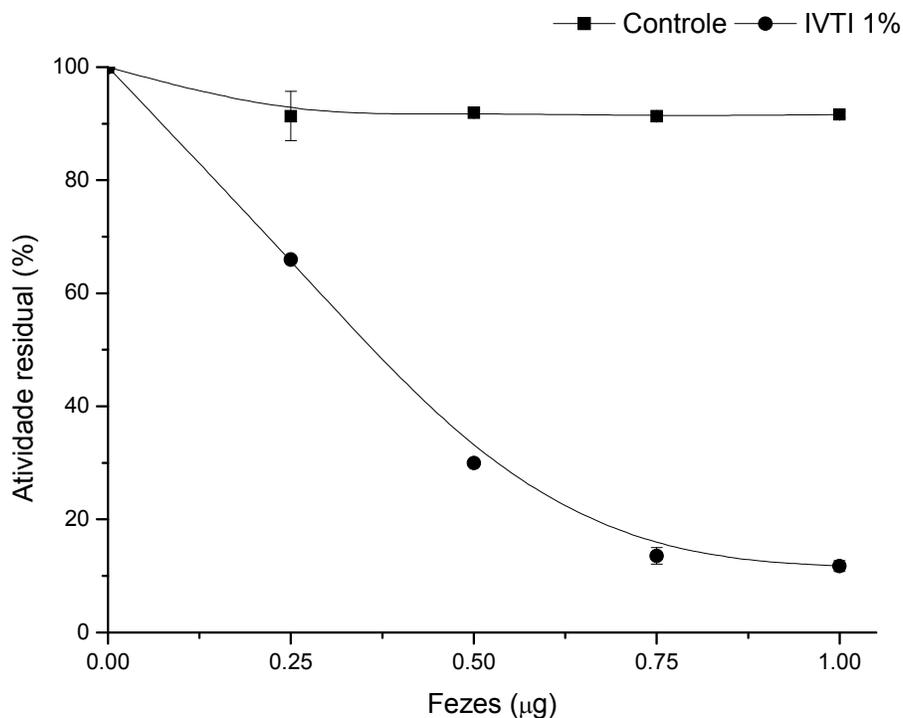


Figura 27. Atividade inibitória do extrato fecal das larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta artificial na ausência ou presença de IVTI 1%. Concentrações crescentes do extrato fecal foram incubadas com tripsina bovina e atividade trípica residual foi determinado pela hidrólise do substrato BApNA.

1.9 Zimograma

O zimograma do homogenato intestinal das larvas controle de 4º e 5º instar de *A. kuehniella* revelou a presença de 8 e 9 proteinases, respectivamente. Essas proteinases foram designadas como AkGP (proteínase intestinal “gut” de *A. kuehniella*) e numeradas de 1 – 9, dentre elas três (AkGP 3, 6 e 7) foram inibidas nas larvas alimentadas com IVTI ou incubadas com TLCK (Figura 28A). No homogenato intestinal das larvas do bioensaio de

curto prazo detectou 8 proteinases das quais as mesmas bandas descritas acima foram inibidas quando expostas por 72h à uma dieta contendo IVTI ou incubado o homogenato com TLCK. Entretanto, quando as larvas foram transferidas para uma dieta sem IVTI por igual período (grupo 144h), as bandas que haviam sido inibidas reapareceram (Figura 28B). Nas fezes só foram observadas somente três bandas com atividade proteolítica e nenhuma inibição foi observada nas larvas alimentadas com IVTI ou pelo TLCK (Figura 28C).

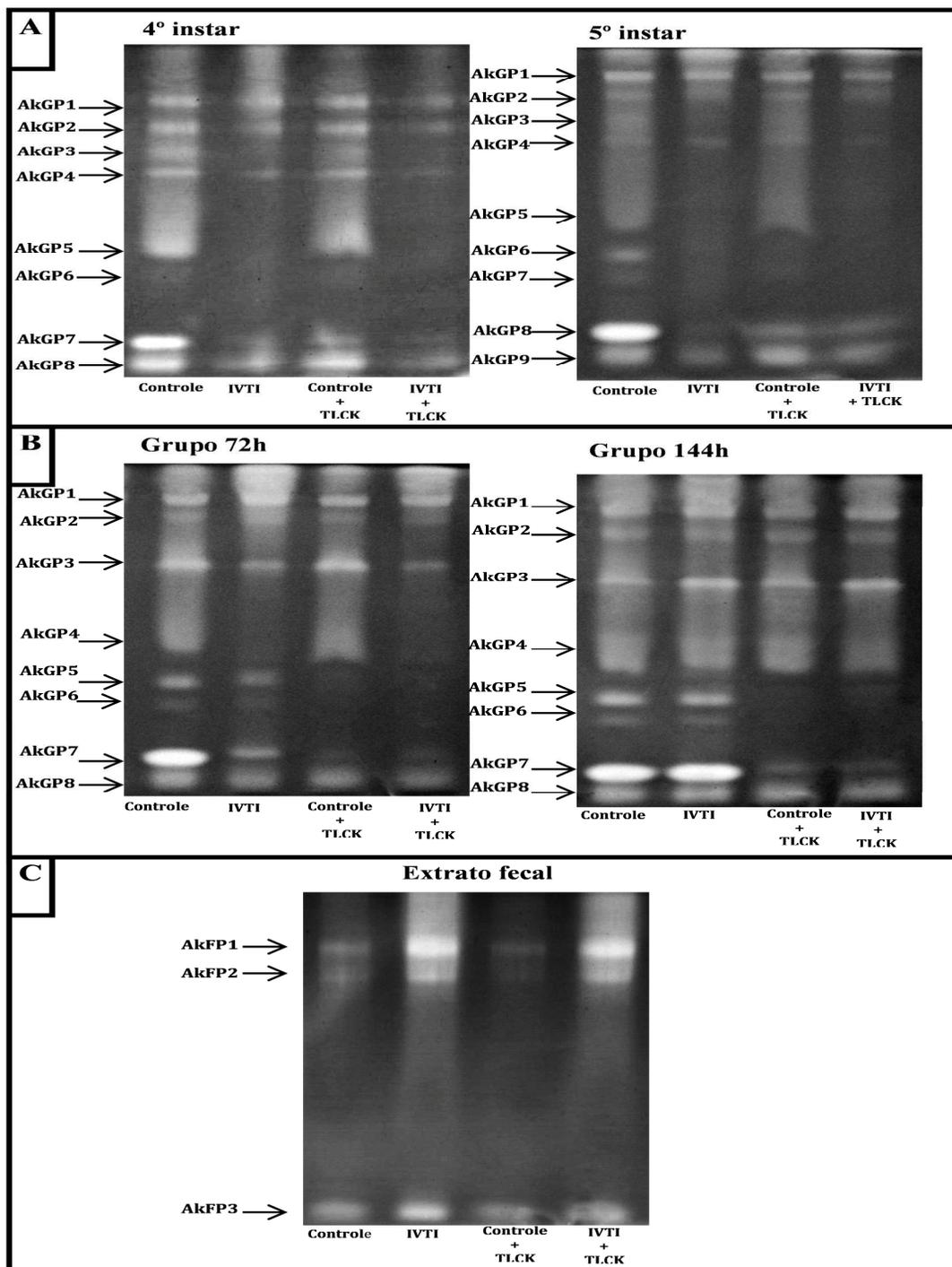


Figura 28. Zimograma do homogenato intestinal e fecal das larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dieta artificial na ausência ou presença de IVTI 1%. (A) Bioensaio de longo prazo; (B) Bioensaio de curto prazo e (C) Extrato fecal. As amostras também foram tratadas com TLCK para inibição da atividade da tripsina. As proteinases intestinais foram designadas como AkGP 1 – 9 e das fezes como AkFP 1 – 3.

VI. DISCUSSÕES

As sementes da família Fabaceae contêm grandes quantidades de proteínas, sendo que uma pequena proporção destas consiste de inibidores que suprimem a atividade proteolítica *in vivo* e *in vitro* pela formação de complexo estáveis de enzima-inibidor (RICHARDSON, 1991; EHRMANN & CLAUSEN, 2004). Diversos estudos sugerem sua aplicação como ferramenta biotecnológica para o combate a diversas pragas agrícolas, as quais provocam enormes prejuízos econômicos e limitam o crescimento da produção mundial de alimentos (ESTRUCH *et al.*, 1997; BIRK, 2003; FALCO *et al.*, 2003; RAMOS *et al.*, 2012; STEVENS *et al.*, 2013)

Para purificação do IVTI estabeleceu-se um método simples e rápido, utilizando uma cromatografia de troca iônica seguido por uma coluna de afinidade de acordo com MACEDO *et al.* (2007b). Inicialmente, após a obtenção da farinha fina das sementes, empregou-se um processo de delipidação utilizando hexano devido a grande concentração de lipídios. Conforme (RICHARDSON, 1991), a delipidação elimina problemas durante a extração de inibidores, diminuindo a interferência nas etapas subsequentes de purificação.

Muitos IPs são purificados e isolados com a utilização de técnicas cromatográficas (MACEDO *et al.*, 2000; MELLO *et al.*, 2001; MACEDO *et al.*, 2007b; BHATTACHARYYA & BABU, 2009; BIJINA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2013). Dessa forma, na primeira etapa de purificação utilizou-se a cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose, onde o EB foi fracionado em 3 picos, sendo o D-I antes do gradiente salino, portanto, representa as proteínas que não ficaram aderidas a coluna pois são de mesma carga iônica da coluna, no caso cargas negativas. Após o gradiente salino, apresentou dois picos, D-II e D-III, eluidos entre 0,2 – 0,4 M de NaCl, sendo essas proteínas

de cargas positivas que sofreram dissociação da coluna devido as cargas provenientes do gradiente salino que passaram a interagir com as moléculas proteicas, diminuindo a interação com a resina. Apenas o pico D-II apresentou atividade inibitória e um rendimento de 84,86% e purificado 1,07 vezes (Tabela 2).

Na etapa final de purificação, empregou-se a coluna de afinidade Sepharose-tripsina. A cromatografia de afinidade mostra-se uma eficiente ferramenta na purificação de inibidores, onde resinas são imobilizadas com enzimas específicas (MELLO *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2013). Dois picos foram eluidos da coluna, sendo que o único que apresentou atividade foi segundo pico (S-II) após eluição com HCl 100 mM que foi denominado IVTI.

No final das duas etapas de purificação, IVTI apresentou uma atividade específica de $5,66 \times 10^4$ UI/mg e um rendimento de 52,69%, de acordo com a Tabela 2. A pureza e alto rendimento são características desejáveis para as proteínas que apresentam atividade biológica, pois, muitas vezes, utiliza grandes quantidades de material e requerem repetições nos bioensaios (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A ordem Lepidoptera apresenta como principal classe de enzimas digestivas as serinoproteinases, tais como a tripsina e quimotripsina, que são as enzimas majoritárias detectadas no intestino médio desta ordem (MACEDO *et al.*, 2011b). Uma das estratégias ao combate de insetos-praga é inibir a ação dessas enzimas no trato digestivo por meio de inibidores vegetais de enzimas digestivas (CARLINI *et al.*, 2002).

A inibição das enzimas digestivas interfere na disponibilidade de aminoácidos essenciais necessários para o crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos (MACEDO *et al.*, 2011b; SILVA *et al.*, 2012). Entretanto os efeitos inibitórios dos inibidores de proteinases de plantas (IPs) sobre as enzimas de insetos podem variar de uma praga para

outra e por isso a importância da triagem preliminar *in vitro* para a escolha dos melhores alvos (MACEDO *et al.*, 2011a). Portanto, a atividade biológica de IVTI foi testada contra sete insetos-praga pertencentes à ordem Lepidoptera. Diferentes perfis de inibição foram observados para as enzimas do tipo tripsina das espécies de lepidópteros (figura 11), sugerindo formação de dois grupos de tripsinas nas pragas alvo, àquelas que são susceptíveis a inibição e as que são resistentes aos inibidores (DUNSE *et al.*, 2010).

Entre os insetos analisados, *A. gemmatalis* foi a mais resistente à inibição por IVTI que pode estar relacionado pelo fato de se tratar de uma espécie especialista que se alimenta principalmente de soja que é rica em inibidor de tripsina e, portanto, criou mecanismos para sobrepujar os efeitos negativos dos PIs ao longo da coevolução com sua planta hospedeira, a soja (PIUBELLI *et al.*, 2005; MACEDO *et al.*, 2011d). Já as enzimas de *A. kuehniella* foram as mais susceptíveis a ação do inibidor já que é um inseto generalista tendo uma maior diversidade alimentar, portanto, não se limita a criar adaptações para cada dieta. Com base nisso, *A. kuehniella* foi escolhida como inseto de estudo para verificar os efeitos de IVTI.

Para avaliar o efeito *in vivo* de IVTI sobre o desenvolvimento de *A. kuehniella*, o inibidor foi incorporado à dieta artificial e oferecido a larvas neonatas do inseto. Como observado na Tabela 3, IVTI causou um efeito negativo no ganho de peso bem como na sobrevivência das larvas. Devido ao comprometimento no peso observou um retardo de 8 dias na formação das pupas, ou seja, um prolongamento do período larval. Entretanto, nenhuma alteração foi verificada no peso das pupas ou no período pupal. A extensão do período larval combinado com a redução do peso pode ser um sinal do uso de aminoácidos essenciais na síntese de proteinases (BROADWAY & DUFFEY, 1986) ou outras proteínas relacionadas ao metabolismo, desintoxicação e tolerância ao estresse (PETEK *et al.*, 2012).

Análise dos índices nutricionais revelou que IVTI provoca um efeito antinutricional quando ingerido pela larva, como mostrado na tabela 4. ECI é uma medida da capacidade de um inseto para utilizar o alimento que ingere para o crescimento, a sua diminuição indica que mais alimento está sendo metabolizado para energia e menos está sendo convertido em massa corporal, ou seja, para o crescimento dos insetos (KOUL *et al.*, 2003). ECD é a estimativa da conversão do alimento que foi assimilado, ou seja, diminui à medida que a proporção de alimento digerido é metabolizado para gerar energia (RAMOS *et al.*, 2009). Na dieta contendo IVTI 1% os índices ECI e ECD foram menores, significando, portanto, que nesta dieta uma menor quantidade de alimento foi utilizada para a produção de biomassa do inseto, o que justifica o menor peso larval. O CM indica a energia gasta no processo digestivo, e foi maior na dieta contendo IVTI do que na da dieta controle, pois provavelmente uma quantidade maior de energia proveniente da dieta foi utilizada para sobrepujar os efeitos da inibição das enzimas. Não houve diferença significativa em relação ao AD o que significa que não houve necessidade de que o alimento permanecesse no tubo digestivo por um tempo maior para permitir a degradação ou neutralização dos efeitos do inibidor. Logo esse menor tempo de contato do alimento com as enzimas digestivas não permitiu maior digestibilidade do alimento, portanto, prejudicando no ganho de biomassa. Portanto, os baixos valores de ECI e ECD sugerem que a toxicidade crônica e a redução no ECD resultaram provavelmente do aumento na proporção de energia assimilada desviados do crescimento para cobrir o CM associado com a desintoxicação e excreção de IVTI (SILVA *et al.*, 2012).

Muitos trabalhos com inibidores de proteinases investigam os efeitos acarretados pela ingestão crônica desta classe de proteínas quando adicionada a dietas artificiais ou expressas em plantas geneticamente modificadas (COELHO *et al.*, 2007; DUNSE *et al.*,

2010; MACEDO *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013), entretanto trabalhos que abordem o efeito da exposição a inibidores por um curto período de tempo são escassos (STEVENS *et al.*, 2013). Portanto, ensaios enzimáticos foram realizados para verificar o comportamento da atividade proteolítica nas larvas de *A. kuehniella* expostas ao IVTI por um período de longo e curto prazo. O consumo de IVTI pelas larvas provocou uma redução na atividade tríptica e um aumento na atividade quimotríptica tanto no bioensaio de longa quanto de curta duração. O ensaio de sensibilidade das enzimas tripsinas do intestino médio das larvas alimentadas com inibidor mostrou a mesma susceptibilidade à inibição por IVTI, portanto, não houve produção de tripsina insensível ao inibidor. FITCHES & GATEHOUSE (1998) também verificaram alterações da atividade enzimática da aminopeptidase e tripsina nas larvas de *Lacanobia oleracea* que consumiram as lectinas ConA (*Canavalia ensiformis*) e GNA (*Galanthus nivalis*) cronicamente ou expostas por um curto período de tempo.

A redução da atividade da tripsina pode estar relacionada ao complexo enzima:inibidor (EHRMANN *et al.*, 2004) que se forma no intestino médio bloqueando a ação da enzima. O aumento da atividade da quimotripsina pode ser uma estratégia adaptativa do inseto. Como dito anteriormente, os lepidópteros tem como principais enzimas digestivas a tripsina e quimotripsina que possuem estruturas diferentes, entretanto com a mesma função de realizar a proteólise (MACEDO *et al.*, 2011b). O IVTI é um inibidor específico para tripsina e quando ocorre à ingestão dele fica comprometida a proteólise por essa enzima, assim sugerimos que o inseto desvia sua energia para aumentar a produção da quimotripsina para realizar a mesma função em busca da sobrevivência. Segundo STEVENS *et al.* (2013) a diminuição da atividade da tripsina induzido pela ingestão do inibidor pode não ter ação sobre as quimotripsinas, assim as quimotripsinas permanecem ativas com a presença do inibidor.

Portanto, embora o inibidor retarde a ação da digestão pela tripsina as quimotripsinas ativas desempenham esse papel e dessa forma não ocorre à inanição.

Para verificar se aumento da quimotripsina continuava na ausência de IVTI metade das larvas do bioensaio de curto prazo foram transferidas para uma dieta sem o inibidor por mais 72 horas (grupo 144h). Dessa forma, observou que o perfil de atividade enzimática da tripsina e da quimotripsina retornaram aos níveis do grupo controle. A ingestão de proteína na dieta estimula a síntese e a secreção de enzimas proteolíticas no trato digestivo (NORIEGA *et al.*, 1994; BROADWAY, 1997). Em geral, enzimas proteolíticas são transcricionalmente reguladas e tanto a qualidade e a quantidade de proteína na dieta influencia esta regulação (NORIEGA *et al.*, 1994; BROADWAY, 1997). Além disso, esta indução generalizada das enzimas proteolíticas em resposta à ingestão de proteínas na dieta, o consumo de inibidores de proteinase inicia a síntese e/ou secreção de um conjunto de proteinases que não são susceptíveis à inibição pelo inibidor (BROADWAY, 1995; JONGSMA *et al.*, 1995; JONGSMA *et al.*, 1996; BROADWAY, 1997). BROADWAY (1997) observou que alimentando larvas de quinto instar de *Helicoverpa zea* e *Agrotis ipsilon* por 30 minutos com inibidor de tripsina de soja estimulou a síntese de enzimas resistentes ao inibidor e persistiram durante esse instar mesmo quando os insetos foram transferidos para uma dieta livre do inibidor. No caso de IVTI, a supressão da tripsina ou o aumento da expressão da quimotripsina ocorre somente na presença do inibidor, sugerindo que as mudanças observadas sobre a atividade proteolítica de *A. kuehniella* são causadas por uma resposta do tipo *feedback*, e não expressa continuamente (BROADWAY, 1997; BRIOSCHI *et al.*, 2007).

Outro mecanismo de adaptação relacionado aos insetos contra os IPs é a degradação do inibidor pelas proteases intestinais (ZHU-SALZMAN *et al.*, 2003). Assim, IVTI foi incubado

com as proteases do intestino médio de *A. kuehniella* na proporção 1:5 (inibidor:protease) e utilizando BSA como controle positivo sob as mesmas condições. Através da SDS-PAGE, não se observou a degradação do inibidor pelas enzimas do inseto alimentado em dieta controle ou contendo o inibidor. Com relação ao BSA, as larvas que consumiram IVTI tiveram dificuldade em realizar a digestão dessa proteína em comparação ao grupo controle que realizou a digestão rapidamente (Figura 22 e 23). Quando as larvas do bioensaio de curto prazo foram transferidas para dieta sem inibidor observou que o BSA foi degradado como ocorreu no controle. Dessa forma, esses resultados confirmam a capacidade do inibidor em se ligar e inibir a ação das enzimas proteolíticas (HARTL *et al.*, 2011). A resistência do inibidor à digestão é um requisito importante para uma proteína desempenhar o papel de inseticida (MACEDO *et al.*, 2007a). Muitas proteínas com atividade inseticida são resistentes a degradação pelas proteases intestinais dos insetos, principalmente, os lepidópteros (RAMOS *et al.*, 2012; MACHADO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Entretanto, a degradação de IPs por digestão é comumente relatado por coleópteros, sendo uma estratégia bem conhecida para esta ordem de insetos (GIRARD *et al.*, 1998; ZHU-SALZMAN *et al.*, 2003).

Na análise fecal, os níveis da atividade trípica foram semelhantes tanto nas fezes das larvas alimentadas em dieta controle quanto contendo inibidor (Figura 24). LOMATE *et al.* (2011) sugerem que o pH intestinal pode ser adequado para a formação do complexo enzima-inibidor, e esse complexo pode dissociar depois de entrar nas fezes devido a alterações no pH. Assim, a tripsina que estava em complexo com o inibidor no intestino é liberada após a entrada nas fezes tornando-se ativa novamente e por isso os níveis serem semelhantes no controle quanto no tratamento. Entretanto a atividade quimotríptica foi maior nas fezes das larvas alimentadas com o inibidor (Figura 25). Esse resultado pode ser devido ao excesso de produção da mesma enzima no intestino que não foi reabsorvida do espaço

endoperitrófico para o espaço ectoperitrófico o que resulta na perda crítica de aminoácidos essenciais contendo enxofre (BROADWAY *et al.*, 1986; STEVENS *et al.*, 2013). A perda desses aminoácidos tem um grande impacto no crescimento e desenvolvimento do inseto (BROADWAY *et al.*, 1986).

Através da SDS-PAGE do extrato fecal observou-se que o inibidor é eliminado nas fezes das larvas alimentadas com IVTI (Figura 26). O ensaio de atividade inibitória do extrato fecal contra a tripsina bovina comprovou a presença do inibidor nas fezes, uma vez que, conseguiu inibir a ação da tripsina (Figura 27). Portanto, esses resultados corroboram que o inibidor não é degradado pelas proteases intestinais da larva como verificado na digestão *in vitro* e o mesmo permanece com sua função ativa.

Embora o zimograma não revelasse nenhuma forma variante de enzima nas larvas submetidas à dieta com inibidor, foi possível determinar quais enzimas sofrem influência pelo inibidor (figura 28). As larvas alimentadas com IVTI tiveram uma redução na atividade proteolítica de três isoformas. As mesmas enzimas também sofreram influência quando incubada com inibidor específico de tripsina (TLCK), sugerindo que essas sejam as possíveis tripsinas que sofrem complexos com inibidor. O fato interessante é que as larvas quando voltaram para dieta controle as bandas que tinham sido inibidas, apresentaram novamente atividade. Este resultado sugere a resposta *feedback* e que o inibidor não permanece no lúmen intestinal sendo eliminado nas fezes. Além disso, no extrato fecal foi observado apenas três bandas com atividade proteolítica e nenhuma inibição foi observada por IVTI ou TLCK., possivelmente sejam quimotripsinas devido a alta quantidade dela encontrada no ensaio quimotríptico das fezes. MACHADO *et al.* (2013) observaram resultados similares quando o mesmo inseto foi submetido a dieta contendo inibidor de protease, entretanto (OLIVEIRA *et al.* (2013) visualizaram novas regiões apresentando atividade proteolítica por

zimograma em *S. frugiperda*, propondo que novas enzimas são expressas em dieta com inibidor.

Diante desses resultados, concluímos que o inibidor de tripsina presente em sementes de *Inga vera*, denominado IVTI, apresentou uma atividade tóxica e antinutricional contra *A. kuehniella* sendo um possível agente contra insetos-praga. Entretanto, estudos mais detalhados sobre o mecanismo de ação do inibidor são necessários a fim de encontrar resultados conclusivos para outras pestes de cultivo. A melhor compreensão deste processo permitirá alcançar métodos mais eficazes para o controle biológico de pragas com base em produtos naturais pelo desenvolvimento de novas variedades de plantas com maior defesa química através da biotecnologia vegetal.

VII. CONCLUSÕES

Os testes realizados com o inibidor de *Inga vera* (IVTI) apresentou as seguintes conclusões:

- ✓ *In vitro*, ele foi capaz de inibir enzimas de alguns insetos pragas, sendo que o efeito maior foi em *A. kuehniella*;
- ✓ Redução significativa do peso larval de *A. kuehniella*;
- ✓ Mortalidade significativa das larvas de *A. kuehniella*;
- ✓ Prolongamento do período larval de *A. kuehniella*;
- ✓ Efeito antinutricional nas larvas de *A. kuehniella* com redução do ECI e ECD e um aumento do CM;
- ✓ Alteração do perfil da atividade proteolítica dos fluidos do intestino médio e das fezes de *A. kuehniella*;
- ✓ IVTI é eliminado nas fezes de *A. kuehniella* e o mesmo permanece com sua função ativa;
- ✓ Nenhuma enzima nova foi sintetizada nas larvas de *A. kuehniella* que se alimentaram do inibidor.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, J. G.; AGRAWAL, A. A. Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. **Trends in plant science**, v. 17, n. 5, p. 293-302, 2012.

BABU, M. R.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M. S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management—an over view. **Crop Protection**, v. 22, n. 9, p. 1071-1086, 2003.

BALDWIN, I. T. An Ecologically Motivated Analysis of Plant-Herbivore Interactions in Native Tobacco. **Plant Physiology**, v. 127, n. 4, p. 1449-1458, December 1, 2001 2001.

BARBIERI, L.; POLITO, L.; BOLOGNESI, A.; CIANI, M.; PELOSI, E.; FARINI, V.; JHA, A. K.; SHARMA, N.; VIVANCO, J. M.; CHAMBERY, A.; PARENTE, A.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins in edible plants and purification and characterization of a new ribosome-inactivating protein from *Cucurbita moschata*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1760, n. 5, p. 783-792, 5// 2006.

BHATTACHARYYA, A.; BABU, C. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: insight into structural and antimalarial features. **Phytochemistry**, v. 70, n. 6, p. 703-12, Apr 2009.

BIJINA, B.; CHELLAPPAN, S.; BASHEER, S. M.; ELYAS, K. K.; BAHKALI, A. H.; CHANDRASEKARAN, M. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2291-2300, 2011.

BIRK, Y. **Plant protease inhibitors: significance in nutrition, plant protection, cancer prevention and genetic engineering**. Berlin: Springer- Verlag, 2003.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. In: (Ed.). **EJB Reviews**: Springer, 1993. p.43-61. ISBN 3540564144.

BOLETI, A.; FREIRE, M.; COELHO, M.; SILVA, W.; BALDASSO, P.; GOMES, V.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.; MACEDO, M. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 7, p. 2653-8, Apr 2007.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, May 1976.

BRIOSCHI, D.; NADALINI, L. D.; BENGTON, M. H.; SOGAYAR, M. C.; MOURA, D. S.; SILVA-FILHO, M. C. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 12, p. 1283-1290, 2007.

BROADWAY, R. M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? **Journal of Insect Physiology**, v. 41, n. 2, p. 107-116, 1995.

BROADWAY, R. M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, n. 9, p. 855-874, 1997.

BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S. S. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exiqua*. **Journal of Insect Physiology**, v. 32, n. 10, p. 827-833, 1986.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

CARLINI, C. R.; OLIVEIRA, A. E. A.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J.; WELLS, M. A. Biological Effects of Canatoxin in Different Insect Models: Evidence for a Proteolytic Activation of the Toxin by Insect Cathepsinlike Enzymes. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, n. 2, p. 340-348, // 1997.

COELHO, M.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**, v. 146, n. 3, p. 406-14, Sep 2007.

COWGILL, S. E.; ATKINSON, H. J. A Sequential Approach to Risk Assessment of Transgenic Plants Expressing Protease Inhibitors: Effects on Nontarget Herbivorous Insects. **Transgenic Research**, v. 12, n. 4, p. 439-449, 2003/08/01 2003.

DUNSE, K. M.; STEVENS, J. A.; LAY, F. T.; GASPAR, Y. M.; HEATH, R. L.; ANDERSON, M. A. Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, n. 1091-6490 (Electronic), 20100825 DCOM- 20100923 2010.

EHRlich, P.; RAVEN, P. Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. **Evolution**, v. 18, n. 4, p. 586-608, // 1964.

EHRMANN, M.; CLAUSEN, T. Proteolysis as a regulatory mechanism. **Annual Review of Genetics**, v. 38, n. 1, p. 709-724, 2004.

ESTRUCH, J. J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; DUCK, N. B.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G. Transgenic plants: An emerging approach to pest control. **Nat Biotech**, v. 15, n. 2, p. 137-141, 02//print 1997.

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, n. 8, p. 761-766, 2003.

FEENY, P. Plant Apparency and Chemical Defense. In: WALLACE, J. e MANSELL, R. (Ed.). **Biochemical Interaction Between Plants and Insects**: Springer US, v.10, 1976. cap. 1, p.1-40. (Recent Advances in Phytochemistry). ISBN 978-1-4684-2648-9.

FERMI, C.; PERNOSSI, L. Ueber die Enzyme. **Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten**, v. 18, n. 1, p. 83-127, 1894/12/01 1894.

FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 155-61, Apr 2004.

FITCHES, E.; GATEHOUSE, J. A. A comparison of the short and long term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). **Journal of Insect Physiology**, v. 44, n. 12, p. 1213-1224, 12// 1998.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 397-412, 2002.

FÜRSTENBERG-HÄGG, J.; ZAGROBELNY, M.; BAK, S. Plant Defense against Insect Herbivores. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 5, p. 10242-10297, 2013.

GATEHOUSE, A. R.; HILDER, V.; POWELL, K.; BOULTER, D.; GATEHOUSE, J. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. In: MENKEN, S. B. J.; VISSER, J. H., *et al* (Ed.). **Proceedings of the 8th International Symposium on Insect-Plant Relationships**: Springer Netherlands, v.49, 1992. cap. 73, p.221-234. (Series Entomologica). ISBN 978-94-010-4723-4.

GATEHOUSE, L. N.; SHANNON, A.; 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 inhibitors in the diet. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 11, p. 929-944, 1998.

GIRARD, C.; LE MÉTAYER, M.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM-DELÈGUE, M.-H.; 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, n. 4, p. 229-237, 1998.

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, n. 1, p. 145-159, 2004.

HARTL, M.; GIRI, A. P.; KAUR, H.; BALDWIN, I. T. The multiple functions of plant serine protease inhibitors: Defense against herbivores and beyond. **Plant Signaling & Behavior** v. 6, n. 7, p. 1009-1011, 2011.

HILDER, V. A.; GATEHOUSE, A. M. R.; SHEERMAN, S. E.; BARKER, R. F.; BOULTER, D. A. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v. 330, n. 6144, p. 160-163, 11/18/print 1987.

HIVRALE, V.; LOMATE, P.; BASAIYYE, S.; KALVE, N. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors from *Albizia lebbek* seeds in the *Helicoverpa armigera* larvae. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 7, n. 3, p. 259-266, 2013/06/01 2013.

ISHIZAKI, T.; MEGUMI, C.; KOMAI, F.; MASUDA, K.; OOSAWA, K. Accumulation of a 31-kDa glycoprotein in association with the expression of embryogenic potential by spinach callus in culture. **Physiologia Plantarum**, v. 114, n. 1, p. 109-115, 2002.

JAKUBOWSKA, A.; VAN OERS, M. M.; ZIEMNICKA, J.; LIPA, J. J.; VLAK, J. M. Molecular characterization of *Agrotis segetum* nucleopolyhedrovirus from Poland. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 90, n. 1, p. 64-68, 9// 2005.

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 inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 17, p. 8041-8045, August 15, 1995 1995.

JONGSMA, M. A.; STIEKEMA, W. J.; BOSCH, D. Combatting inhibitor-insensitive proteases of insect pests. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 9, p. 331-333, 1996.

KOUL, O.; DANIEWSKI, W. M.; MULTANI, J. S.; GUMULKA, M.; SINGH, 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, n. 25, p. 7271-7275, 2003/12/01 2003.

LOMATE, P.; HIVRALE, V. Differential responses of midgut soluble aminopeptidases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host and non-host plant diets. **Arthropod-Plant Interactions**, v. 5, n. 4, p. 359-368, 2011/12/01 2011.

MACEDO, M.; DAS GRAÇAS MACHADO FREIRE, M.; DA SILVA, M.; COELHO, L. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 146, n. 4, p. 486-98, Apr 2007a.

MACEDO, M.; DE MATOS, D.; MACHADO, O.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. **Phytochemistry**, v. 54, n. 6, p. 553-8, Jul 2000.

MACEDO, M.; GARCIA, V.; FREIRE, M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1104-11, Apr 2007b.

MACEDO, M. L. R.; DIZ FILHO, E. B.; FREIRE, M. G.; OLIVA, M. L.; SUMIKAWA, J. T.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S. A Trypsin Inhibitor from *Sapindus saponaria* L. Seeds: Purification, Characterization, and Activity Towards Pest Insect Digestive Enzyme. **The Protein Journal**, v. 30, n. 1, p. 9-19, Jan 2011a.

MACEDO, M. L. R.; DURIGAN, R. A.; SILVA, D. S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M. G. M.; PARRA, J. R. P. *Adenantha pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 73, n. 4, p. 213-231, 2010.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M. Insect digestive enzymes as a target for pest control. **Invertebrate Survival Journal** v. 8, n. 2, p. 190-198, 2011b.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; FRANCO, O. L.; MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, C. F. R. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. **Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry & Molecular Biology**, v. 158, n. 2, p. 164-72, Feb 2011c.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; KUBO, C. E. G.; PARRA, J. R. P. Bioinsecticidal activity of *Talisia esculenta* reserve protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 24-33, 2011d.

MACHADO, S. W.; OLIVEIRA, C. F. R.; BEZERRA, C. D. S.; FREIRE, M. G. M.; KILL, M. R.; MACHADO, O. L. T.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Purification of a Kunitz-type inhibitor from *Acacia polyphylla* DC seeds: Characterization and insecticidal properties against *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013.

MELLO, G.; OLIVA, M.; SUMIKAWA, J.; MACHADO, O.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.; MACEDO, M. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. **J Protein Chem**, v. 20, n. 8, p. 625-32, Nov 2001.

MICHIELS, K.; VAN DAMME, E.; SMAGGHE, G. Plant-insect interactions: what can we learn from plant lectins? **Arch Insect Biochem Physiol**, v. 73, n. 4, p. 193-212, Apr 2010.

MOCHIZUKI, A.; NISHIZAWA, Y.; ONODERA, H.; TABELI, Y.; TOKI, S.; HABU, Y.; UGAKI, M.; OHASHI, Y. Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice

stem borers, *Chilo suppressalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 93, n. 2, p. 173-178, 1999.

NANDI, A.; BASU, D.; DAS, S.; SEN, S. High level expression of soybean trypsin inhibitor gene in transgenic tobacco plants failed to confer resistance against damage caused by *Helicoverpa armigera*. **Journal of Biosciences**, v. 24, n. 4, p. 445-452, 1999/12/01 1999.

NOGUEIRA, F. C. S.; SILVA, C. P.; ALEXANDRE, D.; SAMUELS, R. I.; SOARES, E. L.; ARAGÃO, F. J. L.; PALMISANO, G.; DOMONT, G. B.; ROEPSTORFF, P.; CAMPOS, F. A. P. Global proteome changes in larvae of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera:Chrysomelidae:Bruchinae) following ingestion of a cysteine proteinase inhibitor. **PROTEOMICS**, v. 12, n. 17, p. 2704-2715, 2012.

NORIEGA, F. G.; BARILLAS-MURY, C.; WELLS, M. A. Dietary control of late trypsin gene transcription in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, n. 6, p. 627-631, 6// 1994.

NOVOTNY, V.; BASSET, Y.; MILLER, S. E.; WEIBLEN, G. D.; BREMER, B.; CIZEK, L.; DROZD, P. Low host specificity of herbivorous insects in a tropical forest. **Nature**, v. 416, n. 6883, p. 841-844, 04/25/print 2002.

ØDEGAARD, F. How many species of arthropods? Erwin's estimate revised. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 71, n. 4, p. 583-597, 2000.

OLIVA, M. L. V.; FERREIRA, R. S.; FERREIRA, J. G.; DE PAULA, C. A. A.; SALAS, C. E.; SAMPAIO, M. U. Structural and Functional Properties of Kunitz Proteinase Inhibitors from Leguminosae: A Mini Review. **Current Protein and Peptide Science**, v. 12, p. 348-357, 2011.

OLIVEIRA, C. F. R.; LUZ, L. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 498-504, 2011a.

OLIVEIRA, C. F. R.; MACEDO, M. L. R. Emprego de inibidores de protease vegetais como ferramenta biotecnológica alternativa no controle de pragas. **Perspectivas online**, v. 1, n. 1, p. 11, 2011b.

OLIVEIRA, C. F. R.; PAULA SOUZA, T.; PARRA, J. R. P.; MARANGONI, S.; CASTRO SILVA-FILHO, M.; MACEDO, M. L. R. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 165, n. 1, p. 19-25, 5// 2013.

OLIVEIRA, C. F. R.; VASCONCELOS, I. M.; APARICIO, R.; FREIRE, M. G. M.; BALDASSO, P. A.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 929-935, 2012.

OLSNES, S. The history of ricin, abrin and related toxins. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 361-370, 9/15/ 2004.

OPPERT, B.; MORGAN, T. D.; HARTZER, K.; KRAMER, K. J. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 1, p. 53-58, 2005.

PAIR, S. D. Japanese Honeysuckle (Caprifoliaceae): Newly Discovered Host of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology**, v. 23, n. 4, p. 906-911, // 1994.

PARK, E. Y.; KIM, J.-A.; KIM, H.-W.; KIM, Y. S.; SONG, H. K. Crystal Structure of the Bowman–Birk Inhibitor from Barley Seeds in Ternary Complex with Porcine Trypsin. **Journal of Molecular Biology**, v. 343, n. 1, p. 173-186, 2004.

PAULILLO, L. C.; LOPES, A. R.; CRISTOFOLETTI, P. T.; PARRA, J. R.; TERRA, W. R.; SILVA-FILHO, M. C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **J Econ Entomol**, v. 93, n. 3, p. 892-6, Jun 2000.

PETEK, M.; TURNŠEK, N.; GAŠPARIČ, M. B.; NOVAK, M. P.; GRUDEN, K.; SLAPAR, N.; POPOVIČ, T.; ŠTRUKELJ, B.; JONGSMA, M. A. A Complex of genes involved in adaptation of *Leptinotarsa decemlineata* larvae to induced potato defense. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 79, n. 3, p. 153-181, 2012.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. Lectins as Plant Defense Proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 2, p. 347-352, October 1, 1995 1995.

PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, n. 1, p. 23-29, 9// 2006.

PIUBELLI, G. C.; HOFFMANN-CAMPO, C. B.; MOSCARDI, F.; MIYAKUBO, S. H.; NEVES DE OLIVEIRA, M. C. Are Chemical Compounds Important for Soybean Resistance to *Anticarsia gemmatalis*? **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 7, p. 1509-1525, 2005.

PUEYO, J. J.; MORGAN, T. D.; AMEENUDDIN, N.; LIANG, C.; REECK, G. R.; CHRISPPEELS, M. J.; KRAMER, K. J. Effects of bean and wheat α -amylase inhibitors on α -amylase activity and growth of stored product insect pests*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 75, n. 3, p. 237-244, 1995.

RAJ, S. S. S.; KIBUSHI, E.; KURASAWA, T.; SUZUKI, A.; YAMANE, T.; ODANI, S.; IWASAKI, Y.; YAMANE, T.; ASHIDA, T. Crystal Structure of Bovine Trypsin and Wheat Germ Trypsin Inhibitor (I-2b) Complex (2:1) at 2.3 Å Resolution. **Journal of Biochemistry**, v. 132, n. 6, p. 927-933, 2002.

RAMOS, V. D. S.; CABRERA, O. G.; CAMARGO, E. L. O.; AMBRÓSIO, A. B.; VIDAL, R. O.; DA SILVA, D. S.; GUIMARÃES, L. C.; MARANGONI, S.; PARRA, J. R. P.; PEREIRA, G. A. G.; MACEDO, M. L. R. Molecular cloning and insecticidal effect of *Inga laurina* trypsin inhibitor on *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 156, n. 3–4, p. 148-158, 11// 2012.

RAMOS, V. S.; FREIRE, M.; PARRA, J.; MACEDO, M. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymentia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, v. 152, n. 2, p. 255-61, Feb 2009.

RAO, K. N.; SURESH, C. G. Bowman–Birk protease inhibitor from the seeds of *Vigna unguiculata* forms a highly stable dimeric structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, v. 1774, n. 10, p. 1264-1273, 2007.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzymes inhibitors. **Methodology Plant Biochemistry**, v. 5, p. 259-305, 1991.

RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, n. 1, p. 425-449, 1990.

RYAN, C. A.; PEARCE, G. SYSTEMIN: A Polypeptide Signal for Plant Defensive Genes. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 14, n. 1, p. 1-17, 1998.

SCHOONHOVEN, L. M.; VAN LOON, J. J. A.; DICKE, M. **Insect-Plant Biology**. OUP Oxford, 2005. ISBN 9780198525950. Disponível em: <
<http://books.google.com.br/books?id=P6Z9ZlujLaQC> >.

SCOTT, J. G.; WEN, Z. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. **Pest Management Science**, v. 57, n. 10, p. 958-967, 2001.

SILVA, C. P.; SAMUELS, R. I. Plant Defense Proteins That Inhibit Insect Peptidases. In: (Ed.). **Ecological Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants**: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p.280-307. ISBN 9780470959404.

SILVA, C. P.; TERRA, W. R.; DE SÁ, M. F. G.; SAMUELS, R. I.; ISEJIMA, E. M.; BIFANO, T. D.; ALMEIDA, J. S. Induction of digestive α -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α -amylase inhibitor 1. **Journal of Insect Physiology**, v. 47, n. 11, p. 1283-1290, 2001.

SILVA, W.; FREIRE, M. G. M.; PARRA, J. R. P.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Evaluation of the *Adenantha pavonina* seed proteinase inhibitor (ApTI) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of *Diatraea saccharalis*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 2, p. 257-263, 2012.

SINGH, B. B.; SINGH, S. R. Breeding for Bruchid Resistance in Cowpea. In: FUJII, K.; GATEHOUSE, A. M. R., *et al* (Ed.). **Bruchids and Legumes: Economics, Ecology and Coevolution**: Springer Netherlands, v.46, 1990. cap. 24, p.219-228. (Series Entomologica). ISBN 978-94-010-7398-1.

SOUZA, J. D.; SILVA, M. B. R.; ARGOLO, A. C. C.; NAPOLEÃO, T. H.; SÁ, R. A.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; SILVA, M. D. C.; COELHO, L. C. B. B. A new *Bauhinia monandra* galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 696-702, 2011.

STEVENS, J. A.; DUNSE, K. M.; GUARINO, R. F.; BARBETA, B. L.; EVANS, S. C.; WEST, J. A.; ANDERSON, M. A. The impact of ingested potato type II inhibitors on the production of the major serine proteases in the gut of *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 2, p. 197-208, 2013.

STIRPE, F.; BATTELLI, M. G. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 63, n. 16, p. 1850-1866, 2006/08/01 2006.

TABASHNIK, B. E.; GASSMANN, A. J.; CROWDER, D. W.; CARRIERE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. **Nat Biotech**, v. 26, n. 2, p. 199-202, 02//print 2008.

TABASHNIK, B. E.; PATIN, A. L.; DENNEHY, T. J.; LIU, Y.-B.; CARRIÈRE, Y.; SIMS, M. A.; ANTILLA, L. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 24, p. 12980-12984, November 21, 2000 2000.

TECNIGRAN. Pragás: *Anagasta kuehniella* (traça da farinha). 2013. Disponível em: < <http://www.tecnigran.com.br/index.php/pragas/41> >. Acesso em: 24-10-2013.

TITARENKO, E.; J. CHRISPEELS, M. cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 10, p. 979-990, 10// 2000.

VALENCIA, A.; BUSTILLO, A. E.; OSSA, G. E.; CHRISPEELS, M. J. α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, n. 3, p. 207-213, 3// 2000.

VANDENBORRE, G.; SMAGGHE, G.; VAN DAMME, E. J. M. Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1538-1550, 9// 2011.

VOLPICELLA, M.; CECI, L. R.; CORDEWENER, J.; AMERICA, T.; GALLERANI, R.; BODE, W.; JONGSMA, M. A.; BEEKWILDER, J. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 1, p. 10-19, 2003.

WALDBAUER, G. P. The Consumption and Utilization of Food by Insects. In: J.W.L. BEAMENT, J. E. T. e WIGGLESWORTH, V. B. (Ed.). **Advances in Insect Physiology**: Academic Press, v. Volume 5, 1968. p.229-288. ISBN 0065-2806.

WANG, L.; BEUERLE, T.; TIMBILLA, J.; OBER, D. Independent Recruitment of a Flavin-Dependent Monooxygenase for Safe Accumulation of Sequestered Pyrrolizidine Alkaloids in Grasshoppers and Moths. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31796, 2012.

ZARBIN, P. H. G.; RODRIGUES, M. A. C. M.; LIMA, E. R. Feromônios de insetos: tecnologia e desafios para uma agricultura competitiva no Brasil. **Química Nova**, v. 32, p. 722-731, 2009.

ZHU-SALZMAN, K.; KOIWA, H.; SALZMAN, R. A.; SHADE, R. E.; AHN, J. E. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, v. 12, n. 2, p. 135-145, 2003.

ZHU-SALZMAN, K.; ZENG, R. S. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant defense: Lessons learned from a Bruchid beetle. **Insect Science**, v. 15, n. 6, p. 477-481, 2008.