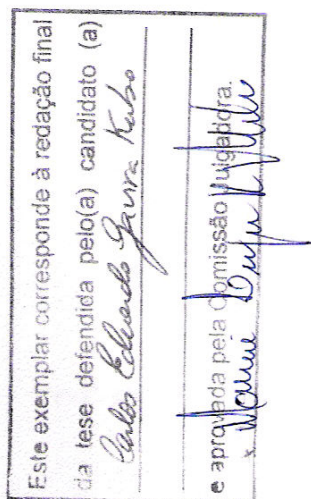


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP

Carlos Eduardo Gavira Kubo

**Efeito de um inibidor de proteinase serínica sobre
o desenvolvimento e atividade enzimática de
Heliothis virescens (Lepidoptera: Noctuidae)**



Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
**Mestre em Biologia Funcional e
Molecular – Área de Bioquímica**

Orientadora: Prof^ª.Dr^ª. Maria Lígia Rodrigues Macedo

Campinas – SP, 2007

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

K892e

Kubo, Carlos Eduardo Gavira

Efeito de um inibidor de proteinase serínica sobre o desenvolvimento e atividade enzimática de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) / Carlos Eduardo Gavira Kubo. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

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

1. Inseticidas. 2. Inibidores de tripsina. 3. *Heliothis virescens*. 4. *Adenanthera pavonina*. I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Effect of a trypsin inhibitor on the development and enzymatic activity of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae).

Palavras-chave em inglês: Insecticides; Trypsin inhibitors; *Heliothis virescens*; *Adenanthera pavonina*.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo, Jose Camillo Novello, Valdirene Moreira Gomes.

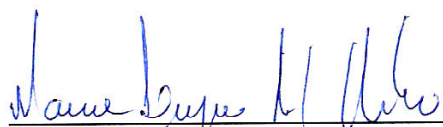
Data da defesa: 27/02/2007.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

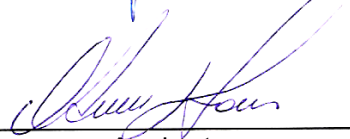
Data da Defesa: 27/02/2007

BANCA EXAMINADORA

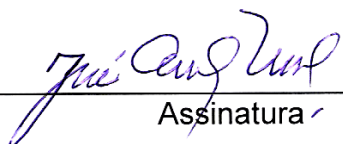
Profa.Dra. Maria Ligia Rodrigues Macedo
(Orientadora)


Assinatura

Profa.Dra. Valdirene Moreira Gomes


Assinatura

Prof.Dr. José Camillo Novello


Assinatura

Profa.Dra. Marilvia Dansa de Alencar Petretski

Assinatura

Prof.Dr. Sérgio Marangoni

Assinatura

Aos meus queridos pais, Maria e Waldemar, que não mediram esforços em toda minha vida, para que eu atingisse os meus objetivos e conquistas.

As minhas irmãs, Luciane e Natália, que sempre me apoiaram e participaram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Maria Lígia Rodrigues Macedo, pela orientação, pelos ensinamentos, que foram fundamentais nessa etapa de minha vida.

À Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Machado Freire, pela valiosa ajuda e sugestões.

Aos professores do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia/UNICAMP, pelos ensinamentos e cooperação.

Aos professores e funcionários do Departamento de Ciências Naturais/UFMS, pelos ensinamentos.

Ao Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB/UFMS), pela realização desse projeto.

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

Aos amigos, que sempre presentes contribuíram de forma direta ou indireta na realização desse trabalho.

Aos demais colegas e funcionários de todas as instituições envolvidas.

À toda minha família pelo amor, dedicação e cooperação.

As Agências de Fomento: CNPq, FINEP e FUNDECT.

ÍNDICE

ABREVIACÕES	vii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Cenário atual	2
1.2 - Proteínas vegetais tóxicas envolvidas na defesa de plantas	4
1.3 - Enzimas Digestivas de Insetos	4
1.3.1 - Classificação	6
1.4 - Inibidores Vegetais de Enzimas Proteolíticas	7
1.4.1 - Características gerais	7
1.4.2 - Utilização de Inibidores de Proteinases de plantas no combate a insetos	9
1.4.3 – Classes de Inibidores de Proteinase	11
1.4.5 - Inibidores de proteinase causam carência de aminoácidos livres	13
1.5 - Genes de IPs em combate a insetos e pragas	14
1.6 - Resistência de insetos a inibidores de proteinases	16
2 - OBJETIVOS	19
3 - MATERIAIS	20
3.1 - Espécie vegetal	20
3.2 - Inseto	22
4 - MÉTODOS	23
4.1 - Extração e purificação do inibidor de <i>Adenanthera pavonina</i> (ApTI)	23
4.1.1 - Obtenção do extrato bruto	23
4.1.2 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75	23
4.1.3 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharose	23
4.1.4 - Cromatografia de Afinidade em Sepharose Tripsina	24
4.2 - Bioensaio	24
4.2.1 - Efeito de ApTI – Sobrevivência, Peso e Índices nutricionais de larvas de 4º instar	25
4.2.2 - Efeito de ApTI no desenvolvimento de <i>Heliothis virescens</i>	26
4.3 - Dissecção das larvas de <i>Heliothis virescens</i>	26
4.4 - Preparação das fezes	27
4.5 - Determinação da atividade enzimática do tipo tripsina	27
4.6 - Efeito de ApTI na atividade proteolítica endógena	27
4.7 - Análise eletroforética das enzimas das larvas de 4º instar de <i>H. virescens</i>	28
4.8 - Análise estatística	28
5 - RESULTADOS	29
5.1 - Efeito de ApTI na sobrevivência, peso e nos índices nutricionais das larvas de 4º instar de <i>Heliothis virescens</i>	29
5.2 - Efeito de ApTI no desenvolvimento de <i>Heliothis virescens</i>	33
5.3 - Determinação da atividade tríptica	39
5.4 - Determinação da atividade antitriptica	40
5.5 - Atividade enzimática em SDS-PAGE contendo gelatina 0,1%	41
6 - DISCUSSÃO	42
7 - CONCLUSÕES	46
8 - REFERÊNCIAS	47

ABREVIACES

AD – digestibilidade aparente
ApTI – inibidor de tripsina de *Adenanthera pavonina*
BApNA – N- α Benzoyl-D-L-Arginine p-Nitroanilide
BBI – inibidor de soja do tipo Bowman-Birk
Bt – *Bacillus thuringiensis*
CCII – inibidor de cisteíno proteinase de milho
CDI - inibidor de aspartato proteinase catepsina-D de tomate
CpTI – inibidor de tripsina de feijão
CM – custo metabólico
Cry – proteína entomot xica de *Bacillus thuringiensis*
DEAE – dietilaminoetil
EB – extrato bruto
ECD – eficiência de conversão do alimento digerido
ECI – eficiência de conversão do alimento ingerido
IM – intestino médio
IP – inibidor de proteinase
kDa - kilodalton
MW – massa molecular relativa
OCI - inibidore de cisteino-proteinase de arroz
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida
PCI – inibidor de carboxipeptidase de batata
PI-II - inibidor de tripsina de batata
PIN-2 – inibidor de serino-proteinase de batata
RIP – proteína inativadora de ribossomo
SDS – dodecil sulfato de sódio
SKTI – inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz
TLCK – N- α -tosyl-L-lysine choromethyl ketone
TRIS – hidroximetil aminometano
UR – umidade relativa

RESUMO

As plantas sintetizam inibidores de proteinases (IPs) como um dos mecanismos de defesa contra o ataque de insetos-praga e patógenos. Os IPs são polipeptídios hábeis em se ligar às enzimas proteolíticas localizadas no intestino médio dos insetos, impedindo sua atividade proteolítica por inibição competitiva. Esse processo leva a uma redução da disponibilidade de aminoácidos para a síntese protéica, e desta maneira, a uma redução no crescimento e desenvolvimento por parte do inseto. Portanto, os IPs são considerados fatores anti-metabólicos. *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) (Lepidoptera: Noctuidae) é uma mariposa, cujas larvas atacam principalmente culturas em campo como: alfafa, algodão, soja e fumo. Entretanto, ocasionalmente podem atacar também culturas como couve, alface, ervilha, pimentão, guandu, abóbora e tomate. Neste trabalho, um inibidor purificado das sementes de *Adenanthera pavonina* L. (Mimosaceae) – ApTI foi utilizado em dietas artificiais, e através de bioensaios seu potencial inseticida contra *H. virescens* foi determinado. A inibição *in vitro* de proteinases do inseto por ApTI sugerem que o inibidor possua efeitos anti-metabólicos quando ingeridos pelas larvas. Entretanto, a ingestão de ApTI não resultou em uma redução significativa no crescimento e desenvolvimento do inseto. Não sendo observadas diferenças na mortalidade larval, no ganho de peso e no tempo de desenvolvimento larval e pupal. A fim de estudar a adaptação das lagartas à presença do inibidor, a atividade das proteinases intestinais das larvas que se alimentaram em dietas livres do inibidor e alimentadas em dieta contendo o inibidor a 0,4% foi comparada através de ensaios enzimáticos e eletroforese em géis de atividade enzimática. As larvas de quarto instar alimentadas em dieta contendo ApTI apresentaram um aumento de cerca de duas vezes na atividade trípica, confirmado por ensaios enzimáticos e na eletroforese de atividade. Além disso, a atividade trípica das larvas que se alimentaram em dieta com ApTI é menos sensível a inibição por ApTI, indicando que novas enzimas mais resistentes ao inibidor foram produzidas. Estes resultados sugerem que as larvas de *H. virescens* foram capazes de se adaptarem fisiologicamente ao inibidor pela superprodução de enzimas do tipo tripsina existente e pela produção de um novo tipo de enzima do tipo tripsina que é menos susceptível a ação inibitória de ApTI.

ABSTRACT

Proteinase inhibitor proteins (PIs) are one of the defensive chemicals produced by plants against pests and pathogens. PIs are polypeptides that are able to bind to insect midgut proteolytic enzymes, rendering them inactive by competitive inhibition. This process leads to a limitation of essential amino acids in protein synthesis, and thus, to reduction in growth and development. Therefore, PIs are known as antinutritional factors. The tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) (Lepidoptera: Noctuidae) is a polyphagous insect larvae that is principally a field crop pest, attacking such crops as alfalfa, cotton, soybean and tobacco. However, it sometimes attacks such vegetables as cabbage, lettuce, pea, pepper, pigeon pea, squash, and tomato, especially when cotton or other favored crops are abundant. In this report, the pure inhibitor from seeds of *Adenanthera pavonina* L. (Mimosaceae) – ApTI was monitoring by an insect bioassay its insecticidal activity toward *H. virescens*. The *in vitro* inhibitions of proteinases activities by ApTI suggest that ApTI would have a potential antimetabolic effect when ingested by insect larvae. However, chronic ingestion of ApTI did not result in a significant reduction of growth and development of tobacco budworm. No differences in larval mortality, weight gain, larval and pupal developmental time were observed. To study this adaptation, the midgut proteinases of *H. virescens* larvae reared on artificial PI-free diet and on a diet containing ApTI at 0.4% were compared by using enzymatic assays and polyacrilamide gel electrophoresis. The fourth instar larvae reared on a diet containing ApTI showed a 2-fold increase in tryptic activity, as confirmed by BApNA as substrate and by activity in gels. In addition, the tryptic activity in ApTI-fed larvae was less sensitive to ApTI, indicating that novel proteolytic form resistant to ApTI was induced in larvae reared on a diet containing this inhibitor. These results suggest that *H. virescens* larvae were able to physiologically adapt to inhibitor by overproduction of an existing trypsin-like enzyme and production of a new type of trypsin-like enzyme that is less susceptible to inhibitory action of ApTI.

1 - INTRODUÇÃO

Insetos do gênero *Heliothis* são grandes causadores de danos na agricultura, das 80 espécies conhecidas 3 são as principais responsáveis por danos: *H. armigera*, *H. zea* e *H. virescens*. Esse gênero pode causar uma redução superior a 90% na produção de algodão quando nenhuma medida de controle é tomada (PEDIBHOTLA *et al.*, 1999).

Heliothis virescens (Lepidoptera: Noctuidae) conhecida como “lagarta da maçã do algodoeiro” é uma praga que ataca culturas economicamente importantes como: soja, algodoeiro, milho, feijoeiro, cana-de-açúcar, sorgo, lentilha, pepino, pimentão, além de plantas ornamentais e hortaliças (BARBER, 1937; HAMBLETON, 1944; METCALF *et al.*, 1962; KINCADE *et al.*, 1967; KOGAN *et al.*, 1978; FITT, 1989).

A lagarta da maçã do algodoeiro tornou-se uma praga de importância econômica a partir de 1960, por ter desenvolvido resistência a vários inseticidas (BOTTRELL & ADKISSON, 1977). Atualmente há registro de que essa praga possui resistência a todos os inseticidas convencionais registrados (MARTIN *et al.*, 1995), inclusive as proteínas CryA(b) e CryA(c) do *Bacillus thuringiensis* (TABASHNICK, 1994).

Dessa forma estratégias alternativas a utilização de inseticidas convencionais necessitam ser desenvolvidas, dentre elas destaca-se a utilização de inibidores vegetais de enzimas digestivas. Apesar de inúmeros estudos *in vitro* identificarem inibidores de proteinases em diferentes famílias de plantas e seus efeitos sobre as enzimas digestivas de insetos, os efeitos *in vivo* nem sempre correspondem com os testes *in vitro* (ABDEEN *et al.*, 2005; GIRARD *et al.*, 1998a; GIRI *et al.*, 1998; TELANG *et al.*, 2005). Devido a esse fato surgiu a necessidade de testes que possam indicar os inibidores mais eficientes para cada praga (HAQ *et al.*, 2004).

O presente trabalho teve como objetivo testar o efeito do inibidor de tripsina presente nas sementes de *Adenanthera pavonina* (ApTI) sobre *H. virescens*, visto que as enzimas do tipo tripsina são majoritárias nesse inseto (JOHNSTON *et al.*, 1995), e que esse inibidor além de bem caracterizado apresentou propriedades inseticidas (RICHARDSON *et al.*, 1986; MACEDO *et al.*, 2004).

1.1 - Cenário atual

De acordo com dados fornecidos pelo Banco Mundial, a população mundial era em torno de 5.8 bilhões de pessoas no ano de 2002, com um crescimento anual esperado em torno de 1.5%. Atualmente a população ultrapassa 6 bilhões de pessoas e mais de 230 milhões de toneladas de proteína por ano são necessários para manter essa população. Considerando que grande parte das proteínas provém de animais, o alimento necessário para manter animais de consumo humano é também aumentado (CARLINI *et al.*, 2002). Em países subdesenvolvidos a fome é consequência de uma explosão no crescimento populacional, o qual acontece sem correspondente aumento na produção de alimento e pastagens para animais de consumo. Em 1961, a área cultivável per capita era de 0,44 ha, atualmente caiu para 0,26 ha e, baseado em projeções até o ano de 2050 diminuirá ainda mais, ficando em torno de 0,15 ha de área cultivável per capita (CARLINI *et al.*, 2002).

Concomitantemente com a explosão populacional e redução na disponibilidade de terras para cultivo em países pobres, há uma tendência em substituir a proteína animal do alimento por proteína de origem vegetal, a qual possui um custo melhor. Até o momento, as proteínas podem corresponder a mais de 40% do peso seco de sementes de alguns legumes. Porém essa produtividade da agricultura pode ser reduzida em torno de 45% pela perda, antes ou depois da colheita devido ao ataque de uma variedade de pragas, como os insetos, nematóides, fungos, doenças causadas por vírus e bactérias, e competição por ervas daninhas (OERKE *et al.*, 1994; CARLINI *et al.*, 2002). Além dos danos causados por insetos na agricultura, ratos e nematóides causam uma perda adicional durante o transporte e infestação das culturas com doenças causadas por patógenos. Durante o armazenamento fungos podem preda sementes de diversas culturas (SCHUCH *et al.*, 2006), como no caso da soja a perda anual pode representar 20% causada por fungos e bactérias (<http://www.cnpso.embrapa.br>). Por todo o mundo mais de 200 doenças de plantas conhecidas são transmitidas por insetos, ratos e nematóides. Essas perdas representam cerca de 100 bilhões de dólares anualmente, sendo o maior prejuízo causado por artrópodes e os métodos disponíveis atualmente para proteger as culturas dependem de compostos químicos que agredem o ambiente e reduzem apenas cerca de 7% a perda (OERKE *et al.*, 1994; CARLINI *et al.*, 2002).

Esses fatos justificam a necessidade de pesquisas e desenvolvimento de abordagens alternativas para esse problema

Visto que as áreas de cultivo são finitas, a produtividade agrícola deve ser aumentada concomitantemente com o aumento da população mundial. Não há dúvidas que a ciência do DNA recombinante e a construção de organismos transgênicos mudarão drasticamente aspectos de nossas vidas. Em relação à agricultura, culturas com alta produtividade, resistentes a pragas além de não danosas ao meio ambiente serão construídas para melhorar o valor nutricional e/ou para a produção de vacinas contra uma variedade de doenças serão alcançadas e tecnicamente possíveis (CARLINI *et al.*, 2002).

A ponto de partida dessa nova agricultura foi estabelecida a cerca de 20 anos com a introdução de uma cultura de tabaco codificando uma proteína entomotóxica da bactéria *Bacillus thuringiensis* (ANDREWS *et al.*, 1987; VAECK *et al.*, 1987). Hoje em dia alguns produtos contendo Bt estão no mercado nos Estados Unidos (www.aphis.usda.gov), bem como em outros países. Apesar do tremendo impacto dessa nova tecnologia, existem algumas dúvidas a respeito da biosegurança das proteínas Bt para mamíferos (VAZQUEZ-PADRON *et al.*, 1999, 2000), bem como algumas questões não resolvidas relacionadas ao impacto ecológico dessa nova classe de bioinseticida.

Esses problemas são geralmente mal interpretados pelos consumidores, os quais têm dificuldades em aceitar os produtos assim denominados “Frankenstein”, na visão popular são antinaturais principalmente por transpor a barreira das espécies. Uma estratégia alternativa seria utilizar os próprios mecanismos de defesa das plantas, por exemplo, através da manipulação da expressão de proteínas de defesa endógenas, ou pela introdução de gene que confira resistência a insetos derivado de outra planta. Nesse contexto, inúmeros diferentes genes que codificam proteínas tóxicas têm sido introduzidos no genoma de culturas com intuito de oferecer resistência a insetos e patógenos. Muitas dessas plantas estão sendo testadas em campo ou aguardando liberação para comercialização (PEFEROEN, 1997; SCHULER *et al.*, 1998; HILDER & BOULTER, 1999; JOUANIN *et al.*, 1998; HAQ *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2006).

1.2 - Proteínas vegetais tóxicas envolvidas na defesa de plantas

As plantas possuem sofisticados mecanismos de defesa, os quais são concentrados nas sementes, e isso se deve porque a semente é o veículo de propagação e sobrevivência da espécie. Os tecidos das sementes podem acumular constitutivamente ou após indução uma ampla variedade de compostos de defesa que conferem resistência contra predadores fitófagos e infecção por vírus, bactéria, fungos, nematóides, etc. As proteínas de plantas mais conhecidas supostamente envolvidas no mecanismo de defesa de plantas são lectinas, RIPs (Proteínas Inativadoras de Ribossomo) do tipo I e II, glicohidrolases, arcelinas (OSBORN *et al.*, 1988), quitinases (COHEN, 1993), canatoxina (CARLINI & UDEDIBIE, 1997), formas modificadas de proteínas de reserva (SALES *et al.*, 2000) e os inibidores de enzimas proteolíticas – IPs (RYAN, 1990; CHRISPEELS & RAIKHEL, 1991; BARBIERI *et al.*, 1993; PEUMANS & VAN DAMME, 1995; KOIWA *et al.*, 1997; HAQ *et al.*, 2004; MACEDO *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2006). Mas para se obter sucesso com a utilização de IPs é necessário conhecer o perfil digestório do inseto, saber quais tipos enzimáticos estão presentes e em quais intensidades. Dessa forma é possível desenvolver estratégias de controle mais eficientes e que dificultem o aparecimento de resistências.

1.3 - Enzimas Digestivas de Insetos

Para um eficiente manejo de controle de pragas através do uso de inibidores de proteinases, é imprescindível saber o tipo de enzima presente no intestino dos insetos e pragas (HAQ *et al.*, 2004). Enzimas proteolíticas catalisam a clivagem das ligações peptídicas em proteínas, elas são classificadas de acordo com seu mecanismo de catálise e do aminoácido presente no centro ativo: (1) Serino proteinase, com uma serina e histidina; (2) Cisteíno proteinase, com uma cisteína; (3) Aspartato proteinase, com um grupo aspartato, e (4) Metaloproteinase, com um íon metálico (Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+}) (NEURATH, 1984; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002).

As duas principais classes de proteinases no sistema digestivo de insetos fitófagos são as serino e cisteíno proteinases. MURDOCK *et al.* (1987) realizaram um elaborado estudo sobre as enzimas presentes no intestino médio de vários insetos da ordem Coleoptera. A maioria dos Lepidópteros possui as serino proteinases como as

principais enzimas digestivas, enquanto que os Coleópteros possuem principalmente cisteíno proteinases (HAQ *et al.*, 2004). Em Heteroptera foram identificadas proteinases do tipo catepsina-D (HOUSEMAN & DOWNE, 1983; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002) e em Sternorrhyncha (Aphididea) proteases do tipo cisteíno foram majoritárias (LEE *et al.*, 1999; FAN & WU, 2005) (Tabela 1).

Tabela 1: Proteases majoritárias de insetos

Ordem	Inseto	Classe Enzimática	Referências
Coleoptera	<i>Tribolium castaneum</i>	Serino/Cisteino	MURDOCK <i>et al.</i> , 1987
Coleoptera	<i>Callosobruchus chinensis</i>	Cisteino	LEE & ANSTEE, 1995
Coleoptera	<i>Anthonomus grandis</i>	Serino/Cisteino	FRANCO <i>et al.</i> , 2004
Coleoptera	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	Cisteino	MURDOCK <i>et al.</i> , 1987
Coleoptera	<i>Tetraopes tetraophthalmus</i>	Serino	KOIWA <i>et al.</i> , 2000
Coleoptera	<i>Diabrotica virgifera</i>	Cisteino	KOIWA <i>et al.</i> , 2000
Coleoptera	<i>Lema trilineata</i>	Cisteino	MURDOCK <i>et al.</i> , 1987
Coleoptera	<i>Callosobruchus maculatus</i>	Serino/Cisteino	CAMPOS <i>et al.</i> , 1989; KITCH & MURDOCK, 1986
Lepidoptera	<i>Manduca sexta</i>	Serino	HEGEDUS <i>et al.</i> , 2003
Lepidoptera	<i>Mamestra configurata</i>	Serino	HEGEDUS <i>et al.</i> , 2003
Lepidoptera	<i>Anagasta kuehniella</i>	Serino	NEGREIROS <i>et al.</i> , 1991
Lepidoptera	<i>Ostrinia nubialis</i>	Serino	HOUSEMAN <i>et al.</i> , 1989
Lepidoptera	<i>Spodoptera littoralis</i>	Serino	LEE <i>et al.</i> , 1995
Lepidoptera	<i>Spodoptera exigua</i>	Serino	JONGSMA <i>et al.</i> , 1996
Lepidoptera	<i>Sesamia nonagrioides</i>	Serino	WOLFSON & MURDOCK, 1990
Diptera	<i>Mayetiola destructor</i>	Serino	SHUKLE <i>et al.</i> , 1985
Diptera	<i>Stomoxys calcitrana</i>	Serino	HOUSEMAN <i>et al.</i> , 1987
Heteroptera	<i>Anasa tristis</i>	Cisteino	HOUSEMAN <i>et al.</i> , 1983
Heteroptera	<i>Coriscus pilosilus</i>	Cisteino	HOUSEMAN <i>et al.</i> , 1983
Homoptera	<i>Nilaparvata lugens</i>	Cisteino	LEE <i>et al.</i> , 1999
Heteroptera	<i>Riptortus clavatus</i>	Cisteino	MCMANUS <i>et al.</i> , 1994

Adaptado por HAQ *et al.*, 2004.

1.3.1 - Classificação

As enzimas digestivas dos insetos são conhecidas como hidrolases e classificadas de acordo com o substrato que degradam: corpos protéicos são desmembrados por proteases e a total degradação dos carboidratos é gerada pela ação das carbohidrases.

As proteases (peptídeo-hidrolases) incluem as proteinases (endopeptidases) e as exopeptidases. Proteinases são divididas em subclasses com base no mecanismo catalítico: serino, cisteíno, aspartato e metalo-proteinases. Por sua vez, as exopeptidases incluem enzimas que hidrolisam aminoácidos da extremidade N-terminal (aminopeptidases) ou da extremidade C-terminal (carboxipeptidases) da cadeia polipeptídica; ocorrem ainda enzimas que são específicas para desmembrar dipeptídeos, como as dipeptídeo-hidrolases (TERRA & FERREIRA, 1994; FAN & WU, 2005).

Serino-proteinases:

As enzimas do tipo serino-proteinases são assim chamadas por apresentarem um aminoácido serina no seu sítio ativo. Esse aminoácido apresenta propriedades especiais que permitem a ligação do substrato e a catálise do mesmo.

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

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

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

Um terceiro tipo enzimático da família das serino-proteinases é as elastases. Com a caracterização enzimática do trato digestivo de *Heliothis virescens*, JOHNSTON *et al.* (1995) demonstraram três tipos de atividades protéicas. Os dois tipos de maior atividade eram as enzimas como as tripsinas e quimotripsinas, enquanto que o terceiro tipo de proteinase encontrada, com menor nível de atividade, era semelhante às elastases. Acredita-se que esses três tipos enzimáticos evoluíram de um ancestral comum e, por esse motivo, sejam estruturalmente semelhantes e apresentam o mesmo mecanismo de ação, diferindo pronunciadamente na especificidade do substrato. *Helicoverpa armigera* também apresenta como principais atividades proteolíticas, tripsinas e quimotripsinas (CHRISTELLER *et al.*, 1992; JOHNSTON *et al.*, 1991 e BOWN *et al.*, 1997).

Os dois principais tipos de enzimas do ventrículo médio (Figura 4) da lagarta *H. virescens* trabalham em um pH ótimo alcalino, em torno de 10. Vários estudos identificam este pH para serino-proteinases de outros insetos da ordem Lepidoptera (WARD, 1995; JOHNSTON *et al.*, 1991; PURCELL *et al.*, 1992; FAN & WU, 2005).

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

1.4 - Inibidores Vegetais de Enzimas Proteolíticas

1.4.1 - Características gerais

A proteólise é um processo chave em todos os organismos vivos, sendo dessa forma extremamente controlado, caso contrário poderia ser muito nocivo ao organismo. Por esta razão não surpreende a inúmera quantidade de inibidores de proteinase que ocorrem naturalmente estudados extensivamente, com intuito de elucidar suas propriedades estruturais e funcionais (RICHARDSON, 1991; BODE & HUBER, 1992; HIBBETTS *et al.*, 1999).

Os inibidores protéicos são moléculas geralmente de baixa massa molecular, sendo a diferenciação dada pela especificidade e mecanismo de ação. A especificidade é uma característica marcante no estudo das interações entre enzima e inibidor. Ela é determinada pela termodinâmica das interações envolvidas e pela estrutura nativa do inibidor e da enzima (RICHARDSON, 1991).

A massa molecular dessas moléculas varia entre 6 e 50 kDa, e a grande maioria dos inibidores apresenta entre 70 e 90 resíduos de aminoácidos. Aqueles de massa molecular relativamente alta, apresenta-se na forma polimérica, associados em dímeros ou tetrameros, cujos monômeros possuem uma massa molecular mínima de aproximadamente 10 kDa (RICHARDSON, 1991; MACEDO & XAVIER-FILHO, 1993). Os inibidores isolados de sementes, frequentemente, podem apresentar isoformas com especificidade de ação e propriedades funcionais similares. Essas isoformas são produtos de múltiplos alelos de um mesmo “locus” no gene, que podem surgir após modificação pós-transducional na molécula do inibidor. Proteólises parciais nas regiões C e N-terminais do inibidor que indubitavelmente ocorrem durante os processos de desenvolvimento e germinação de semente, por exemplo, são responsáveis pelo surgimento de algumas destas isoformas (VALUEVA & MOSOLOV, 1999).

Esses inibidores são considerados moléculas estáveis, podendo apresentar resistência ao calor, a variações de temperatura e de pH, e à proteólise por proteinases diferentes daquelas não inibidas. Esta estabilidade tem sido atribuída em parte às pontes dissulfeto e outras interações não covalentes que contribuem significativamente para a estabilidade dos mesmos (BELITZ & WEDER, 1990).

Os inibidores de enzimas proteolíticas encontram-se amplamente distribuídos em animais, microorganismos e plantas. Nessa última, encontram-se inibidores para quase todos os tipos de enzimas proteolíticas (FAN & WU, 2005).

1.4.2 - Utilização de Inibidores de Proteinases de plantas no combate a insetos

As plantas são capazes de reagir contra uma série de condições estressantes via alteração na expressão de genes capazes de adaptá-las à nova situação. Basicamente, este processo envolve o acúmulo de uma série de proteínas de defesa que incluem os inibidores de proteinases (IPs) (BALANDIN *et al.*, 1995). Entretanto, os IPs podem também apresentar um papel fisiológico na forma de proteína de reserva das sementes (XAVIER-FILHO, 1992). Os IPs são proteínas ou polipeptídeos que ocorrem numa ampla variedade de plantas e apresentam a propriedade de inibir proteinases digestivas encontradas em insetos fitófagos (PEARCE *et al.*, 1982; BROADWAY *et al.*, 1986; BROADWAY & DUFFEY, 1986; HILDER *et al.*, 1987; GEOFFROY *et al.*, 1990; BROADWAY, 1993; GATEHOUSE *et al.*, 1993). O acúmulo de IPs nas plantas é regulado por um pequeno peptídeo de 18 aminoácidos conhecido como sistemina, que é capaz de induzir a síntese de IPs a partir de um ferimento na planta (PEARCE *et al.*, 1991). A sistemina é liberada no local do ferimento sendo transportada ao longo da planta, ativando a expressão sistêmica dos IPs em toda a planta (BISHOP *et al.*, 1984). Portanto, estas proteínas inibem funções catalíticas de enzimas digestivas do trato intestinal de insetos fitófagos (RICHARDSON, 1981), promovendo uma espécie de resistência ao ataque de insetos.

Subsequentemente a observação de MICKEL & STANDISH (1947) do papel de produtos da soja na proteção de culturas, o inibidor de tripsina de soja mostrou ser tóxico a larvas de *Tribolium confusum*. Após estes estudos preliminares, existem inúmeros exemplos de inibidores de proteinases ativos contra certas espécies de insetos, tanto em ensaios *in-vitro* nos quais inibem as proteases do intestino dos insetos, como *in-vivo*, utilizados em dietas artificiais (ASHOURI *et al.*, 1998; FRANCO *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2005; etc) (Tabela 2).

Tabela 2: Inibidores vegetais testados contra insetos-praga

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

Além disso, os inibidores de proteinases por serem produtos primários, se tornam excelentes candidatos para a engenharia genética da resistência de plantas a insetos (BOULTER, 1993). Genes de inibidores de plantas são particularmente promissores, sendo primeiramente demonstrado por HILDER *et al.* (1987) através da transferência de um gene de inibidor de proteinase de *Vigna unguiculata* em plantas de fumo, o qual conferiu resistência a uma ampla variedade de insetos, incluindo Lepidópteros como *Heliothis* e *Spodoptera*, Coleópteros como *Diabrotica* e *Anthonomus*, e Ortópteros como *Locusta migratoria*. Após esses estudos anteriores demonstrando sucesso na resistência de plantas através da engenharia genética, diversos outros IPs de diversas plantas têm sido estudados.

A disponibilidade de diversos genes de inúmeras fontes de plantas é uma vantagem, pois dois ou mais genes podem ser transferidos em combinação (com diferentes alvos fisiológicos) (URWIN *et al.*, 1998). Inibidores de Proteinase são também reportados ativos contra nematóides, vírus, bactérias e fungos; deste modo eles podem servir como uma proteção cumulativa em plantas. Além do mais, não há evidências que os inibidores de proteinase tenham efeitos tóxicos ou deletérios em mamíferos. Essas vantagens tornam os inibidores de proteinases a escolha ideal para ser usada no desenvolvimento de culturas transgênicas resistentes a pragas e insetos.

1.4.3 – Classes de Inibidores de Proteinase

Inúmeras pesquisas sobre inibidores de proteinase têm fornecido um entendimento básico sobre o mecanismo de ação que se aplica a maioria dos inibidores da família de serino proteinases e provavelmente aos da família dos inibidores do tipo serínico e arpático. Todos inibidores do tipo serínico de plantas são inibidores competitivos e todos eles possuem um mecanismo de ação similar proposto por LASKOWSKI & KATO (1980). A inibição ocorre como consequência da ligação ao sítio ativo (região de ligação do substrato) da enzima ao sítio reativo na superfície do inibidor.

Por esta razão os inibidores comportam-se com alta especificidade, limitando a proteólise do substrato por suas enzimas alvo. Na superfície de cada molécula de inibidor existe pelo menos uma ligação peptídica, chamada sítio reativo (OZAWA & LASKOWSKI, 1966), as quais especificamente interagem com o sítio ativo da

respectiva enzima. Eles são classificados de acordo com o tipo de enzima(s) que inibem (RYAN, 1990; BODE & HUBER, 2000).

Inibidores de serino proteinase são encontrados universalmente no reino vegetal e têm sido descritos em várias espécies vegetais. Consequentemente, o número conhecido e parcialmente caracterizado de inibidores é enorme, sendo descritos em uma ampla variedade de plantas e representa a classe mais estudada de inibidores. (HAQ *et al.*, 2004). Eles são encontrados em altas concentrações em sementes de leguminosas e em quantidades menores em cereais e tubérculos (RICHARDSON, 1991). Espécies nativas brasileiras têm sido bastante estudadas e suas estruturas determinadas (OLIVA *et al.*, 1987; SOUZA *et al.*, 1995; TANAKA *et al.*, 1997; FAN & WU, 2005).

Inibidores de serino proteinases são muito difundidos no reino vegetal, seus papéis fisiológicos a regulação de proteinases endógenas durante a dormência das sementes, a mobilização de proteínas de reserva, e a proteção contra enzimas proteolíticas de parasitas e insetos, além disso, eles também podem ter papel como proteínas de reserva. São agrupados em 16 famílias, baseado na similaridade de sua sequência e no mecanismo de ligação a proteína. São inibidores competitivos e, aparentemente, todos inibem proteinases com um mecanismo similar ao modelo antígeno-anticorpo (LASKOWSKI & KATO, 1980; RYAN, 1990).

As duas famílias de inibidores serino proteinases melhor caracterizadas são a do tipo Kunitz e Bowman-Birk. Inibidores do tipo Kunitz possuem massa molecular entre 18-22 kDa, uma ou duas cadeias polipeptídicas, poucos resíduos de cisteína em sua constituição (normalmente com 4 resíduos de cisteína em duas pontes dissulfeto) e um sítio reativo. Em contraste, os inibidores do tipo Bowman-Birk possuem massa molecular menor (8-10 kDa), alta concentração de resíduos de cisteína, e dois sítios reativos.

Plantas de batata e tomate apresentam duas pequenas famílias de genes que codificam dois inibidores de serino-proteinases, chamados inibidores do tipo I e II. O inibidor do tipo I inibe proteinases do tipo quimotripsina, enquanto o do tipo II possui dois sítios de inibição, um para tripsina e um outro para quimotripsina (BRYANT *et al.*, 1976; PLUNKETT *et al.*, 1982; ATKINSON *et al.*, 1993). Nessas plantas, os inibidores são sintetizados nas folhas em resposta à indução ao ataque de insetos (ferimento) ou outro mecanismo de estresse, como infestação por microorganismos (JOHNSON *et al.*, 1989; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002).

Cistatinas ou fitocistatinas é a segunda maior classe de inibidores identificadas e estudadas de inúmeras plantas, como: feijão (FERNANDES *et al.*, 1993), batata (WALDRON *et al.*, 1993), repolho (LIM *et al.*, 1996), cenoura (OJIMA *et al.*, 1997), e de sementes de várias culturas como: arroz (ABE *et al.*, 1987), trigo (KURODA *et al.*, 2001), milho (ABE *et al.*, 1995), soja (MISAKA *et al.*, 1996), etc. Plantas expressando inibidores desse tipo apresentaram excelentes resultados, provavelmente pelo fato de que a maioria dos insetos possui essas proteinases em seu sistema digestivo (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Inibidores de aspartato proteinases são relativamente menos estudados, isso é parcialmente devido a sua ocorrência rara. Túberos de batata possuem um inibidor de aspartato-proteinase, denominado Catepsina D (MARES *et al.*, 1989; FAN & WU, 2005), que compartilha considerável similaridade na sequência de aminoácidos com o inibidor de tripsina de soja SKTI. Catepsina D é o único inibidor de aspartato proteinase bem caracterizada de origem protéica.

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

1.4.5 - Inibidores de proteinase causam carência de aminoácidos livres

No passado dois modelos foram propostos para explicar os efeitos dos IPs sobre o crescimento e desenvolvimento de herbívoros. O primeiro mecanismo, baseado em resultados de experimentos com aves, propunha que a inibição das proteinases digestivas reduz a digestão de dietas protéicas, por conseguinte reduzindo a disponibilidade de aminoácidos essenciais (PEARCE *et al.*, 1979, 1983).

Entretanto, o crescimento de ratos e camundongos foi reduzido pela adição de inibidores de tripsina, até mesmo quando eles foram adicionados em uma dieta contendo aminoácidos livres onde a digestão protéica não era necessária (LIENER *et al.*, 1949). Posteriormente foi mostrado que, embora os IPs tenham um efeito negativo sobre as taxas de crescimento, a atividade proteolítica não diminuiu *in vivo* por estas formulações de inibidores. LYMAN & LEPKOVSKY (1957) então propuseram um segundo mecanismo no qual a diminuição do crescimento foi devida à hiperatividade do pâncreas o qual respondeu à inibição pela síntese de grande quantidade de proteínas

sensíveis, em um modo compensativo à falta de outras proteínas essenciais. A redução do crescimento em roedores foi então causada por um grande incremento na demanda por aminoácidos a qual não poderia ser realizada.

Segundo SCHULER (1998) a inibição direta das enzimas digestivas dos insetos não é considerado o principal efeito antimetabólico dos inibidores. De acordo com o autor o fator mais importante poderia ser a hipersecreção de enzimas digestivas causadas pela presença dos inibidores, resultando numa maior carência de aminoácidos essenciais ao desenvolvimento normal dos insetos.

1.5 - Genes de IPs em combate a insetos e pragas

Inúmeros estudos com inibidores de proteases transgênicos demonstram que os IPs do tipo serínico são efetivos contra Lepidópteros (MCMANUS *et al.*, 1994; FAN & WU, 2005), ao passo que os do tipo cisteína são efetivos a alguns Coleópteros (LECARDONNEL *et al.*, 1999; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002). Os Homopteros (Aphididae) constituem um importante grupo de insetos, ainda que um limitado número de genes que codifiquem toxinas a esses insetos esteja disponível. Visto que os Homopteros se alimentam de dieta pobre em proteína (seiva do floema), e não dependem da digestão de proteínas para seu balanço de nitrogênio, a falta de atividade dos IPs previamente testados não é uma surpresa. Entretanto vários resultados obtidos *in vitro* salientam o interesse dessa ampla classe peptídica. Inicialmente, um membro dos inibidores de proteinase do tipo cisteína, oryzacystatina (gene OCI), mostrou uma baixa, mas significativa redução no crescimento de várias espécies de Homopteros testados *in vitro*. Além do mais, plantas transgênicas de guandu (*Cajanus cajan*) (Leguminosae) expressando OCI na seiva do floema afetaram o crescimento de *Myzus persicae*, e induziu uma significativa redução na fecundidade desse inseto (RAHBÉ *et al.*, 2003). As enzimas e tecidos alvo de OCI foram identificados com sucesso através de imunolocalização e ensaios enzimáticos com os insetos que se alimentaram com OCI, e as proteases majoritárias presentes no trato digestivo desses insetos mostraram ser do tipo cisteína. O inibidor das sementes de ervilha do tipo Bowman-Birk (tripsina e quimotripsina) mostrou ser tóxico a *Acyrtosiphon pisum* uma praga da ervilha (RAHBÉ *et al.*, 2003). Plantas transgênicas expressando IPs como o arroz mostrou reduzir a predação por seus inimigos naturais (Tabela 3).

Tabela 3: Plantas transgênicas expressando inibidores de proteinases

Gene	Planta	Inseto alvo	Referência
CpTI	Tabaco	<i>Heliothis virescens</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	GATEHOUSE <i>et al.</i> , 1993
CpTI	Tabaco	<i>Spodoptera litura</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	SANE <i>et al.</i> , 1997
CpTI	Algodão	<i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	LI <i>et al.</i> , 1998
CpTI	Arroz	<i>Chilo suppressalis</i> (Lepidoptera: Pyralidae), <i>Sesamia inferens</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	XU <i>et al.</i> , 1996
CpTI	Batata	<i>Lacanobia oleracea</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	GATEHOUSE <i>et al.</i> , 1997
CpTI	Morango	<i>Otiorynchus sulcatus</i> (Coleoptera:Curculionidae)	GRAHAM <i>et al.</i> , 1997
CpTI	Guandu	<i>Helicoverpa armigera</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	LAWRENCE & KOUNDAL, 2001
SKTI	Tabaco	<i>Spodoptera litura</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	Mcmanus <i>et al.</i> , 1999
SKTI	Arroz	<i>Nilaparvata lugens</i> (Homoptera: Delphacidae)	LEE <i>et al.</i> , 1999
Inibidor de <i>Vigna unguiculata</i>	Tabaco	<i>Heliothis virescens</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	HILDER <i>et al.</i> , 1987
Inibidor de <i>Vigna unguiculata</i>	Tabaco	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	HILDER <i>et al.</i> , 1987
Inibidor de <i>Vigna unguiculata</i>	Tabaco	<i>Anthonomus grandis</i> (Coleoptera:Curculionidae)	HILDER <i>et al.</i> , 1987
Inibidor de <i>Vigna unguiculata</i>	Tabaco	<i>Locusta migratoria</i> (Orthoptera: Acrididae)	HILDER <i>et al.</i> , 1987
Inibidor de tripsina de cevada	Arroz	<i>Sitophilus oryzae</i> (Coleoptera: Curculionidae)	ALFONSO-RUBI <i>et al.</i> , 2003
Inibidor de tripsina de cevada	Gérmen	<i>Spodoptera littoralis</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	ALPTETER <i>et al.</i> , 1999
Inibidor de tripsina de mostarda	Tabaco	<i>Plutella xylostella</i> (Lepidoptera: Plutellidae)	DeLEO <i>et al.</i> , 2001
Inibidor de tripsina de mostarda	Arabidopsis	<i>Mamestra brassicae</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	DeLEO <i>et al.</i> , 2001
Inibidor de tripsina de mostarda	Canola	<i>Spodoptera littoralis</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	DeLEO <i>et al.</i> , 2001
Oryzacistatina I	Álamo	<i>Chrysomela tremulae</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	LEPLÈ <i>et al.</i> , 1995
Oryzacistatina I	Batata	<i>Myzus persicae</i> (Homoptera: Aphididea)	GATEHOUSE <i>et al.</i> , 1996

Tabela 3 - Continuação

Oryzacistatina I	Batata	<i>Leptinotarsa decemlineata</i> (Coleoptera: Chrysomelidae)	LECARDONNEL <i>et al.</i> , 1999
Inibidor de tomate I e II	Tabaco	<i>Manduca sexta</i> (Lepidoptera: Sphingidae)	JOHNSON <i>et al.</i> , 1989
Inibidor II de Batata	Tabaco	<i>Chrysodeisus eriosoma</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	MCMANUS <i>et al.</i> , 1994
Inibidor II de Batata	Arroz	<i>Sesamia inferens</i> (Lepidoptera: Noctuidae)	DUAN <i>et al.</i> , 1996
Inibidor II de Batata	Cana-de-açúcar	<i>Antitrogus consanguineus</i> (Coleoptera: Scarabaeidae)	NUTT <i>et al.</i> , 1999

Adaptado por HAQ *et al.*, 2004.

1.6 - Resistência de insetos a inibidores de proteinases

Inúmeros trabalhos têm demonstrado a utilização de inibidores de proteinases como uma estratégia eficiente no controle de pragas (DUAN *et al.*, 1996; GATEHOUSE *et al.*, 1997; HILDER *et al.*, 1987; MACEDO *et al.*, 2004; FAN & WU, 2005; PILON *et al.*, 2006). Entretanto, até o presente momento foram identificados três mecanismos capazes de proporcionar a aclimação dos insetos aos inibidores de suas plantas hospedeiras. O primeiro mecanismo consiste em um aumento da expressão da enzima inibida. BROADWAY & DUFFEY (1986) mostraram que não há redução da atividade proteolítica das enzimas digestivas de *Spodoptera exigua* e *Heliothis zea*, o que ocorre é a super produção da enzima sensível ao inibidor de proteinase. Resultados semelhantes foram obtidos por BURGESS *et al.* (1991), LAROCQUE & HOUSEMAN (1990), MCMANUS & BURGESS (1995). Para *Lacanobia oleracea*, GATEHOUSE *et al.* (1999), mostraram que a atividade proteolítica do tubo digestivo da lagarta era aumentada de até quatro vezes quando em presença de SKTI (inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz).

O segundo mecanismo utilizado pelos insetos é baseado na síntese e/ou secreção de proteinases menos sensíveis ao inibidor. BOLTER & JONGSMA (1995) observaram que *Leptinotarsa decemlineata* quando criadas em dieta à base de plantas de batata, apresentaram uma atividade proteolítica reduzida em 42%. Entretanto, os autores observaram um aumento de uma atividade trípica insensível ao inibidor de cerca de duas vezes quando comparadas aos insetos controle. O mesmo resultado foi obtido por

JONGSMA *et al.* (1995) e BROADWAY (1996) trabalhando com *Spodoptera exigua* e *Heliothis zea* alimentadas com inibidor do tipo II de batata. Os autores observaram que as lagartas foram capazes de aumentar de 2,5 a 3 vezes a produção de uma proteinase pouco sensível ao inibidor, numa interessante forma de adaptação. Mais recentemente, BOWN *et al.* (1997), verificaram que *Helicoverpa armigera* apresentava variantes de enzimas digestivas pertencentes ao grupo das serino-proteinases. Resultados semelhantes foram obtidos por GATEHOUSE *et al.* (1997) demonstrando que *H. armigera* apresenta 18 genes que codificam para tripsina e 14 que codificam para quimotripsinas. O nível das proteinases do tipo das quimotripsinas foi significativamente aumentado enquanto que o nível das tripsinas não foi alterado 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. O mecanismo regulatório responsável pela secreção de diferentes enzimas não é conhecido, e pode ser um conjunto de fatores indutores, cada um responsável pela produção de uma enzimas ou um grupo de enzimas. Novas evidências da adaptação dos insetos a presença de inibidores foram verificadas em um estudo envolvendo outro inseto polífago (múltiplos hospedeiros), a lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*. Nesse estudo, inibidores de serino-proteinases do tipo Bowman-Birk e Kunitz de soja foram incorporados em dietas artificiais que foram utilizadas na alimentação das lagartas desde as primeiras fases do desenvolvimento. Embora os ensaios de inibição *in vitro* tenham mostrado uma alta eficiência contra as proteinases da lagarta, os ensaios biológicos mostraram que não houve alterações significativas no desenvolvimento e metabolismo de lagartas alimentadas em dietas artificiais contendo esses inibidores. Esse fato levou a investigação do mecanismo responsável pela aclimação dos insetos à presença dos inibidores. O mecanismo de aclimação desenvolvido pelas lagartas de *S. frugiperda* estava relacionado à alteração na expressão das serino-proteinases. Os resultados mostraram o aparecimento de uma nova atividade trípica e um aumento significativo na atividade quimotríptica do inseto. A polifagia do inseto pode ter facilitado o desenvolvimento de proteinases que tenham reduzido afinidade aos IPs da soja. Como a eficiência de um inibidor específico é dependente da compatibilidade estrutural do seu sítio reativo com o sítio ativo da proteinase, é provável que as enzimas digestivas tenham sofrido alterações nos

aminoácidos que circundam o sítio de ligação, resultando em uma fraca interação com os inibidores (PAULILLO *et al.*, 2000).

O terceiro mecanismo consiste na síntese de proteinases que promovem a degradação dos inibidores das plantas no lúmen intestinal dos insetos. MICHAUD (1997) mostrou que a degradação proteolítica de orizacistatina II por proteinases de *Otiorynchus sulcatus*, uma praga que ataca cotilédones de plantas ornamentais como *Taxus capitata*. GIRI *et al.* (1998) observaram que *H. armigera*, além de ser capaz de produzir enzimas insensíveis ao inibidor, sintetizou proteinases capazes de degradar os inibidores de sementes de *Cicer arietinum*. O mesmo mecanismo foi encontrado por GIRARD *et al.* (1998a) no trato digestivo de *Phaedon cochleariae* (Coleoptera).

Apesar dos inibidores não apresentar a mesma eficiência para todos os insetos, BALDWIN & PRESTON (1999) propõem que os inibidores são eficientes e participam da defesa direta das plantas, mas sua eficiência depende de um conjunto de fatores abióticos e de outros componentes de defesa secundários (produção de metabólitos), além da presença de inimigos naturais e patógenos. Na natureza, esse conjunto de fatores completaria a tolerância das plantas aos insetos.

2 - OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do inibidor do tipo Kunitz encontrado nas sementes de *Adenanthera pavonina* sobre o desenvolvimento de *Heliothis virescens*, pretendeu-se:

- Verificar seu efeito no peso, sobrevivência e parâmetros nutricionais de larvas de 4º instar;
- Determinar seu efeito na duração e viabilidade dos diferentes estágios de desenvolvimento do inseto;
- Avaliar se houve alterações no perfil enzimático digestório, com intuito de elucidar uma possível resposta do inseto ao inibidor presente na dieta.

3 - MATERIAIS

3.1 - Espécie vegetal

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

A madeira é durável sendo úteis para construir armários e produzir materiais decorativos (BENTHALL, 1946). Estudos nutricionais mostraram que um quarto do peso da semente é devido ao óleo e há uma porcentagem elevada de proteínas e uma composição que favorece a digestibilidade para seres humanos e animais domésticos (BALOGUM & FETUGA, 1985, BURKILL, 1966). Historicamente a semente foi usada como medida de peso para jóias devido a sua pequena variação de peso (BURKILL, 1966).

Na Polinésia é conhecida como “árvore-alimento”, pois mesmo sendo de consistência dura, as sementes destas árvores são torradas e comidas por crianças e adultos.

A. pavonina é da família das Leguminosas, plantas reconhecidas na literatura por possuírem uma grande quantidade de inibidores, sendo a maioria dos inibidores da família Kunitz (RICHARDSON *et al.*, 1986).



Figura 1 - *Adenanthera pavonina* (Carolina): (a) árvore, (b) frutos, (c) fruto e sementes e (d) sementes (Fotos de H. Lorenzi).

3.2 - Inseto

Ovos de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) foram fornecidas do setor de Biologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – (ESALQ), da Universidade de São Paulo (USP).

H. virescens conhecida como “lagarta da maçã do algodoeiro” é uma espécie praga que ocorre nas Américas do Norte e do Sul com populações freqüentes em áreas entre latitude 40°N e 40°S. Esta praga ataca culturas economicamente importantes como: soja, algodoeiro, milho, feijoeiro, cana-de-açúcar, sorgo, lentilha, pepino, pimentão, além de plantas ornamentais e hortaliças (BARBER, 1937; HAMBLETON, 1944; METCALF *et al.*, 1962; KINCADE *et al.*, 1967; KOGAN *et al.*, 1978; FITT, 1989). Segundo METCALF *et al.* (1962), a polifagia natural da espécie dificulta a determinação das culturas que ataca. Além da polifagia, FITT (1989) atribui mais três características que tornam este gênero uma praga importante: alta mobilidade, alta fecundidade e uma diapausa facultativa.

H. virescens tornou-se uma praga de importância econômica a partir de 1960, por ter desenvolvido resistência a vários inseticidas (BOTTRELL & ADKISSON, 1977). Atualmente há registro de que essa praga possui resistência a todos os inseticidas convencionais registrados (MARTIN *et al.*, 1995), inclusive as proteínas CryA(b) e CryA(c) do *Bacillus thuringiensis* (TABASHNICK, 1994).



Figura 2 – *Heliothis virescens*: (a) larva e (b) inseto adulto (Fotos: John Capinera).

4 - MÉTODOS

4.1 - Extração e purificação do inibidor de *Adenanthera pavonina* (ApTI)

ApTI é inibidor do tipo Kunitz que inibe de forma não competitiva enzimas do tipo tripsina, quimotripsina e papaína e apresenta massa molecular relativa de 21 kDa (MACEDO *et al.*, 2004), foi isolado através de métodos clássicos de purificação de proteínas (cromatografia de exclusão molecular, cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade em coluna de sepharose tripsina), segundo o método de RICHARDSON *et al.* (1986) com algumas modificações (MACEDO *et al.*, 2004), como se segue.

4.1.1 - Obtenção do extrato bruto

Sementes de *Adenanthera pavonina* sem tegumento foram moídas e peneiradas para se obter uma farinha fina, a qual foi submetida à delipidação com hexano. Cerca de 100 gramas de farinha delipidada foi então agitada com 700 ml de tampão fosfato 0,1 M pH 7,6 por duas horas, e em seguida centrifugada por 30 minutos a 10.000 g. O sobrenadante foi submetido à precipitação com sulfato de amônio 0 – 40% por 12 horas. Em seguida o material foi homogeneizado e centrifugado novamente por 30 minutos. O precipitado foi dissolvido em água destilada, dialisado e liofilizado, obtendo-se o chamado extrato bruto (EB), o qual foi armazenado a -20 °C para uso posterior.

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

Amostras de 300 mg do EB foram aplicadas em coluna de exclusão molecular Sephadex G-75 (2,0 x 50 cm) a qual estava equilibrada com tampão fosfato 0,1 M com NaCl 0,1 M, pH 7,6. Foram coletadas frações de 3,0 ml em fluxo de 40 ml por hora, efetuando-se a leitura das mesmas em espectrofotômetro a 280 nm. Em seguida foi realizado o ensaio antitriptico de acordo com ERLANGER *et al.* (1961).

4.1.3 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Sepharese

O pico com atividade antitriptica detectado na Sephadex G-75 após ser dialisado e liofilizado foi aplicado em coluna de troca iônica DEAE-Sepharese, equilibrada previamente com tampão Tris/HCl 0,05 M pH 8,0. Utilizando-se um gradiente salino

(NaCl de 0 – 10 M) ocorreu a eluição, na qual frações de 3,0 ml foram coletadas (fluxo = 40 ml/h). O perfil cromatográfico foi determinado utilizando-se um comprimento de onda de 280 nm, e o pico de atividade antitriptica foi o primeiro da eluição, denominado P1, o qual foi utilizado nos passos posteriores após diálise e liofilização.

4.1.4 - Cromatografia de Afinidade em Sepharose Tripsina

A um gel de Sepharose ativado com brometo de cianogênio foi acoplada a enzima tripsina, de acordo com as recomendações do fabricante (GE). Esta resina foi equilibrada com tampão fosfato de potássio 0,3 M com NaCl 0,1 M, pH 7,6 e colocada em coluna de vidro (2 x 5 cm). A fração P1 proveniente do passo de purificação anterior foi aplicada nessa coluna, frações de 3,0 ml foram coletadas até que a absorbância permanecesse próximo de zero, subsequentemente o material retido foi eluído com HCl 0,1 M contendo NaCl 0,1 M em fluxo de 40 ml por hora, o qual se referia ao inibidor (ApTI) que foi detectado através de ensaio de atividade antitriptica.

4.2 - Bioensaio

Para as larvas neonatas foram oferecidas dietas artificiais (PARRA, 1996) com diversas concentrações do inibidor (0,2 – 0,8%) e na ausência do inibidor como tratamento controle, em tubos de vidro de fundo chato de 2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura, fechados com algodão hidrófugo e mantidos a 25 ± 2 °C, UR $60 \pm 10\%$, fotofase de 14 horas, tendo apenas uma larva para cada tubo com dieta.

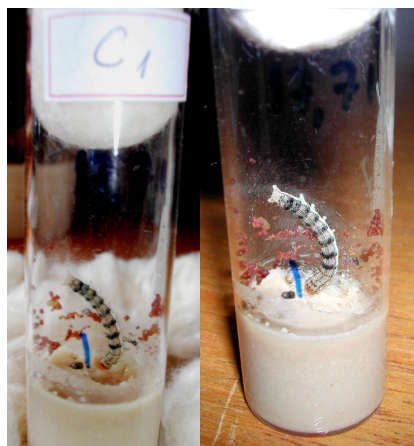


Figura 3: Dieta artificial segundo PARRA (1996).

4.2.1 - Efeito de ApTI – Sobrevivência, Peso e Índices nutricionais de larvas de 4º instar

Ao atingirem o quarto instar de desenvolvimento a sobrevivência e o peso médio das larvas foram determinados (n = 40). Em relação aos índices nutricionais, quatro parâmetros foram analisados: Eficiência de Conversão do alimento Ingerido (ECI), Eficiência de Conversão do alimento Digerido (ECD), Custo Metabólico (CM) e Digestibilidade aparente (AD), todos se referem ao consumo e utilização do alimento, e foram calculados de acordo com PANIZZI & PARRA 1991, como se segue:

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

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

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

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

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

$$CM = 100 - ECD$$

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

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

Onde,

B = peso médio das larvas

I = alimento consumido

F = alimento não digerido + produtos de excreção

I-F = alimento assimilado

4.2.2 - Efeito de ApTI no desenvolvimento de *Heliothis virescens*

Dietas contendo ApTI a 0,4 e 0,8%, bem como dietas sem a presença do inibidor (dieta controle) foram utilizadas, cada tubo continha uma larva (como descrito no item 4.2) e foram avaliados os seguintes parâmetros: (1) Duração da fase larval, (2) Peso pupal, (3) Viabilidade Pupal, (4) Duração da fase pupal e (5) Emergência. Objetivou-se avaliar se a presença do inibidor alteraria o desenvolvimento e viabilidade dos insetos.

4.3 - Dissecção das larvas de *Heliothis virescens*

Larvas de quarto instar foram imobilizadas em gelo e dissecadas em NaCl 250 mM. Os intestinos médios (Figura 4) foram cirurgicamente removidos das larvas com a utilização de pinças, a região do intestino retirada foi a posterior ao proventrículo e anterior aos túbulos de Malpighi. Os intestinos médios obtidos foram homogeneizados e centrifugados a 17.000 g por 10 minutos a 4 °C, os sobrenadantes obtidos (IM) foram imediatamente utilizados como fonte das enzimas para os ensaios enzimáticos, e quando necessário foram armazenados a -20 °C.

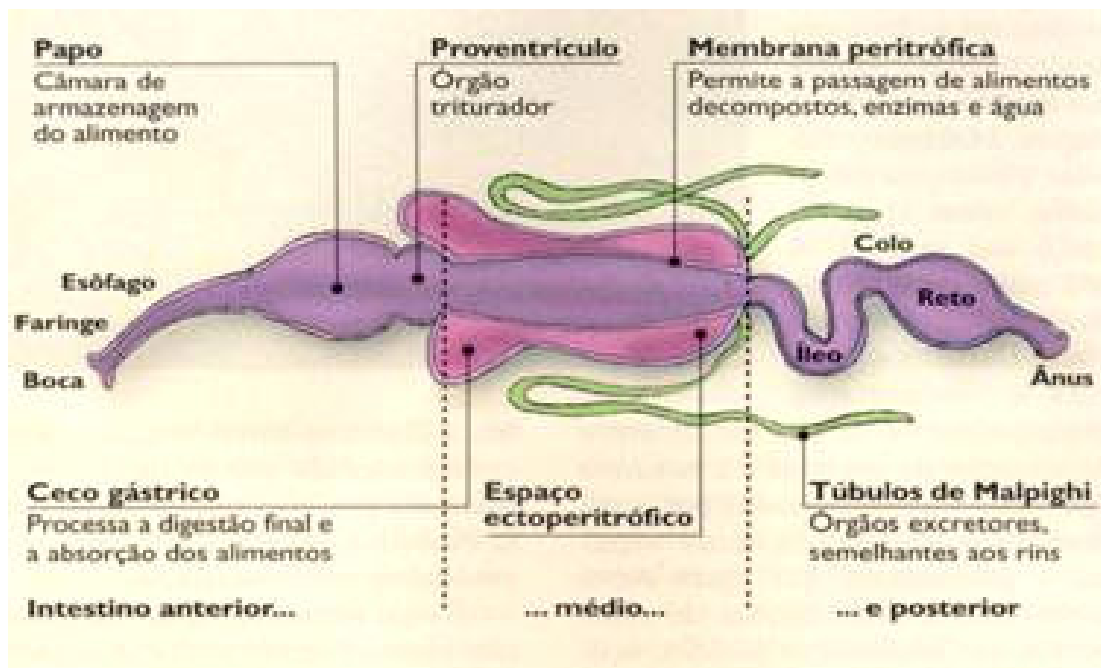


Figura 4: Diagrama do intestino de inseto.

4.4 - Preparação das fezes

As fezes das larvas de quarto instar alimentadas em dieta controle e dieta contendo ApTI a 0,4% após a separação foram estocadas a – 8 °C. Para utilização nos ensaios, foram homogeneizadas em tampão Tris 0,1 M pH 8,0 e centrifugadas a 17.000 g por 10 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes foram imediatamente utilizados nos ensaios bioquímicos como fonte das enzimas para os ensaios enzimáticos.

4.5 - Determinação da atividade enzimática do tipo tripsina

A atividade de enzimas do tipo tripsina foi determinada pela hidrólise do substrato específico BApNA (N- α Benzoyl-D-L-Arginine p-Nitroanilide). IM e fezes (20 μ g de proteína) das larvas alimentadas em dieta controle e dieta contendo ApTI a 0,4% foram incubados com tampão Tris 0,1 M pH 8,0 por 10 minutos antes da adição de 1 mM do substrato. Após a adição do substrato a reação ocorreu por 20 minutos a 37 °C e posteriormente foi parada com a adição de ácido acético (30%, v/v). A absorbância resultante foi determinada a 410 nm e a atividade enzimática foi determinada em nmol BApNA hidrolisado/minuto/ μ g proteína. Esse experimento foi realizado em triplicatas com seus apropriados brancos.

4.6 - Efeito de ApTI na atividade proteolítica endógena

O efeito de ApTI na atividade proteolítica foi determinada para verificar a sensibilidade das larvas ao inibidor após contato com o mesmo nas dietas artificiais e dessa forma inferir se houve uma aclimação do inseto. Esse ensaio foi realizado com tampão Tris 0,1 M pH 8,0 e como substrato BApNA à 1 mM. ApTI (1–6 μ g) foi incubado com as enzimas totais do intestino médio – IM (20 μ g) a 37 °C por 15 minutos antes da adição do substrato. Após a adição do substrato a reação ocorreu por 20 minutos a 37 °C e posteriormente foi parada com a adição de ácido acético (30%, v/v). A absorbância resultante foi determinada a 410 nm e a atividade enzimática foi mensurada em nmol BApNA hidrolisado/minuto/ μ g proteína. Esse experimento foi realizado em triplicatas com seus apropriados brancos.

4.7 - Análise eletroforética das enzimas das larvas de 4º instar de *H. virescens*

Eletroforese em PAGE – SDS (10%) contendo gelatina 0,1% foi realizada para a análise da atividade enzimática do IM das larvas de 4º instar alimentadas em dieta artificial controle e com ApTI à 0,4%. Amostras de IM (2 µg proteína) contendo 10 µl de Tampão Tris 0,05 M pH 8,0 foram incubadas por 30 minutos a 37 °C. Para analisar a atividade das enzimas do tipo tripsina, amostras foram incubadas com um inibidor específico – TLCK (N- α -tosyl-L-lysine choromethyl ketone) nas mesmas condições descritas acima. A corrida ocorreu a 5 °C e em seguida o gel foi lavado com solução 2,5 % de Triton X-100 por 30 minutos sob agitação constante para remover o SDS, após isso o gel foi incubado em tampão Tris 0,05 M pH 8,0 por 2 horas para atividade enzimática. Para o coramento foi utilizado Cromassie brilliant blue R-250.

4.8 - Análise estatística

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

5 - RESULTADOS

5.1 - Efeito de ApTI na sobrevivência, peso e nos índices nutricionais das larvas de 4º instar de *Heliothis virescens*

Não houve diferenças significativas estatisticamente na sobrevivência das larvas de quarto instar de *H. virescens* alimentadas em dietas artificiais. A taxa de sobrevivência das larvas que se desenvolveram em dieta sem a presença do inibidor foi de 85% aproximadamente, enquanto que as larvas alimentadas com dietas contendo ApTI (0,2; 0,4 e 0,8%) obtiveram uma taxa de sobrevivência em torno de 86% (Figura 5).

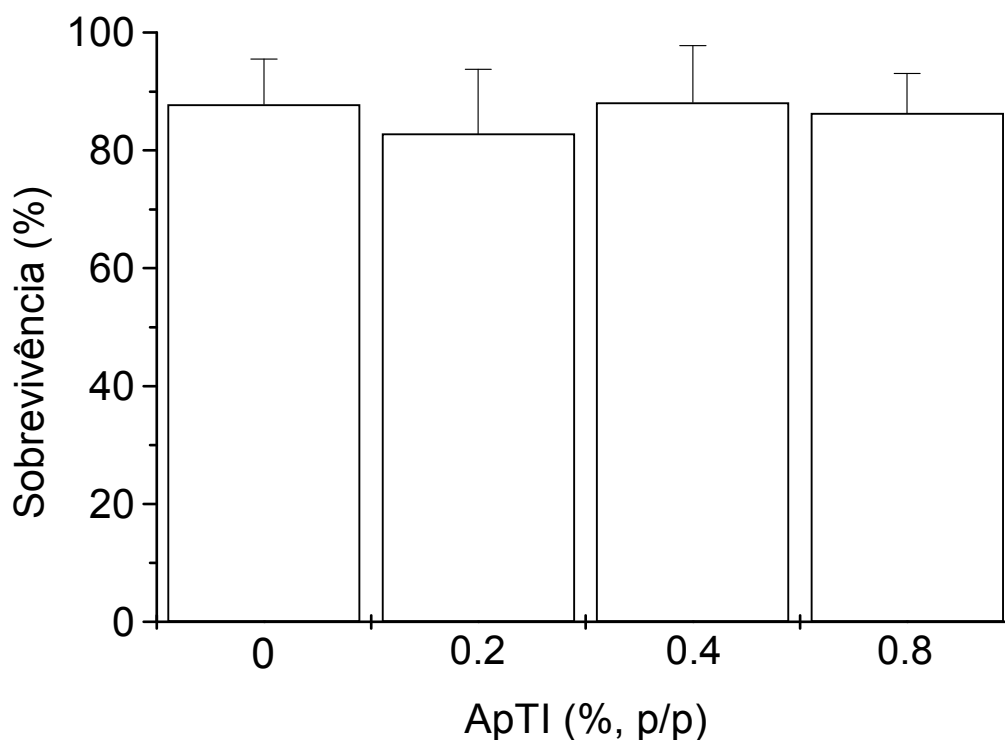


Figura 5: Sobrevivência das larvas de 4º instar de *Heliothis virescens* alimentadas em dietas artificiais contendo ApTI em diversas concentrações.

Em relação ao peso médio das larvas de quarto instar não foi observada alterações significativas, o peso médio das larvas alimentadas em dieta controle foi de 395 mg e das larvas alimentadas em dieta contendo ApTI a 0,4% foi de 415 mg aproximadamente (Figura 6). A figura 6 ilustra o efeito do inibidor no ganho de massa das larvas de *H. virescens*.

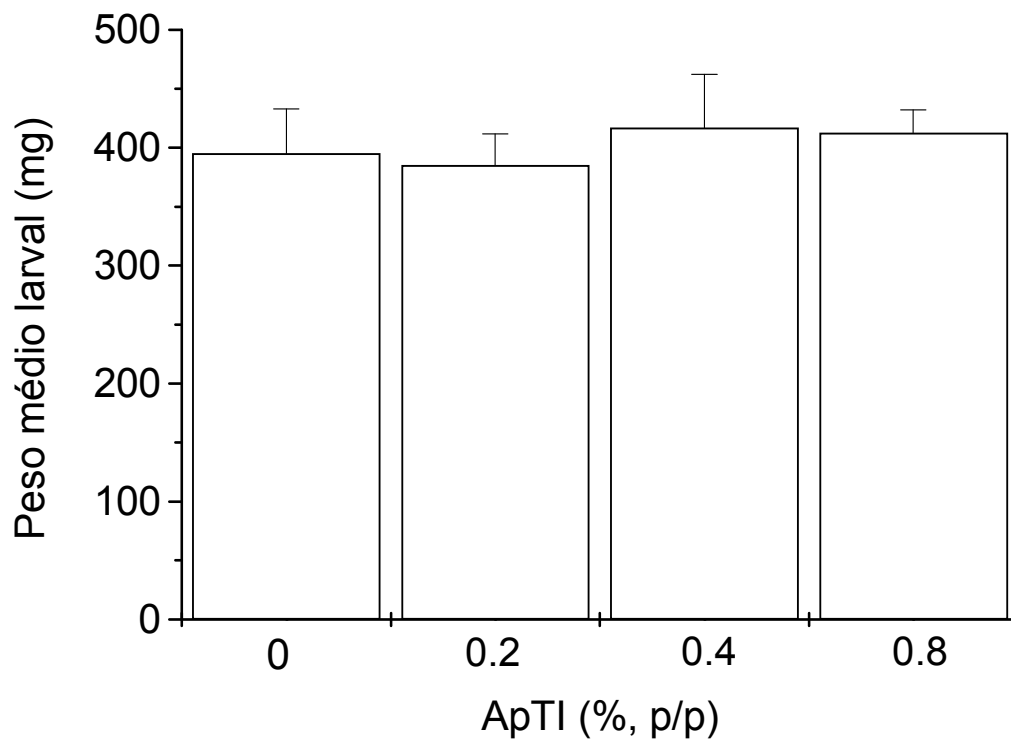


Figura 6: Peso médio das larvas de 4º instar de *Heliothis virescens* alimentadas em dietas artificiais contendo ApTI em diversas concentrações.



Figura 7: Foto ilustrando o efeito de ApTI no peso larval de *Heliothis virescens*. [A] Larva alimentada em dieta controle [B] Larva alimentada em dieta contendo ApTI 0,2% [C] Larva alimentada em dieta contendo ApTI 0,4% [D] Larva alimentada em dieta contendo ApTI 0,8%. Barra = 3 cm.

Os índices nutricionais, que se referem ao consumo e utilização do alimento não foram alterados devido à presença do inibidor, os quatro parâmetros analisados apresentaram taxas similares (Tabela 4). Indicando que as eficiências em utilizar o alimento no ganho de massa corporal, bem como o custo metabólico não foram alteradas na presença do inibidor.

Tabela 4: Eficiência de Conversão do alimento Ingerido (ECI), Eficiência de Conversão do alimento Digerido (ECD), Custo Metabólico (CM), Digestibilidade Aparente (AD) das larvas de *Heliothis virescens* alimentadas em dietas artificiais contendo ApTI ou na sua ausência.

Índices nutricionais	Controle	ApTI 0,2%	ApTI 0,4%	ApTI 0,8%
ECI (%)	21,34 ± 2,45	19,09 ± 4,56	24,26 ± 3,41	20,33 ± 10,61
ECD (%)	46,60 ± 9,17	42,87 ± 7,86	48,55 ± 2,94	44,77 ± 8,19
CM (%)	53,40 ± 9,17	57,13 ± 7,86	51,45 ± 2,94	55,23 ± 8,19
AD (%)	52,75 ± 3,77	58,02 ± 6,32	49,09 ± 5,05	50,68 ± 7,49

5.2 - Efeito de ApTI no desenvolvimento de *Heliothis virescens*

Esses experimentos foram realizados com intuito de avaliar se o inibidor interferia nos estágios de desenvolvimento do inseto, apesar de não ter alterado o peso e a sobrevivência das larvas de quarto instar. Em relação ao desenvolvimento do inseto nenhum dos parâmetros analisados foi modificado, a duração da fase larval (Figura 8) e pupal (Figura 12) mensurada em dias, a taxa de pupação (Figura 9), o peso das pupas (Figura 10) e a emergência (Figura 13) apresentaram resultados similares entre os tratamentos, indicando que o inibidor não interfere em nenhum estágio de desenvolvimento do inseto.

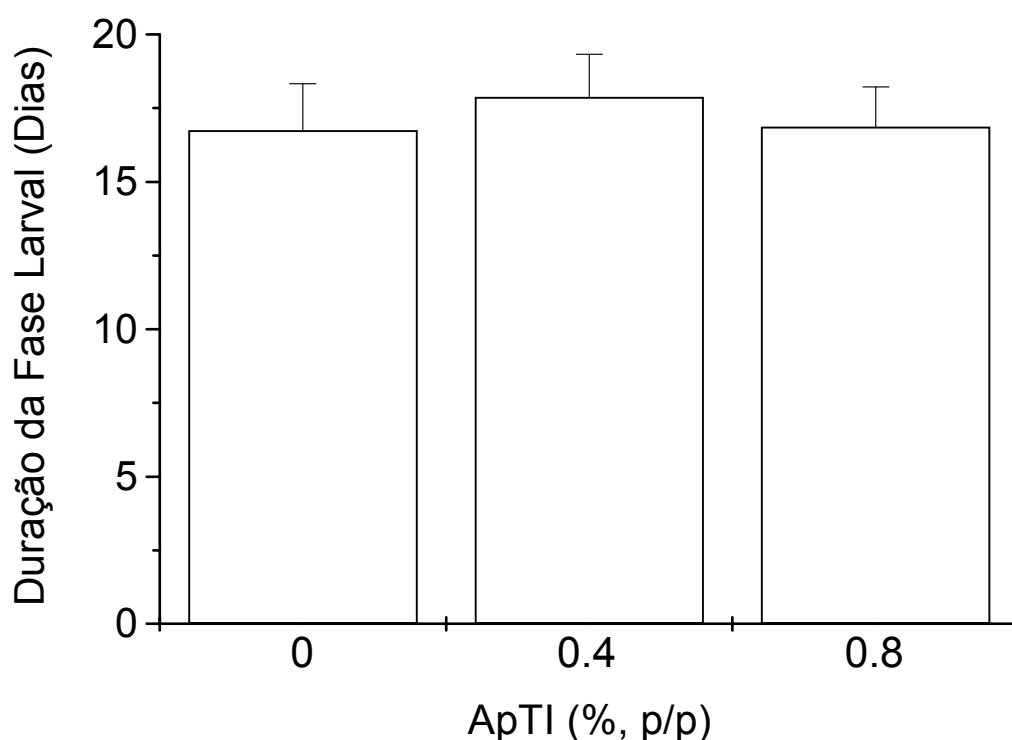


Figura 8: Duração da fase larval de *Heliothis virescens* alimentadas em dietas artificiais contendo ApTI em diversas concentrações.

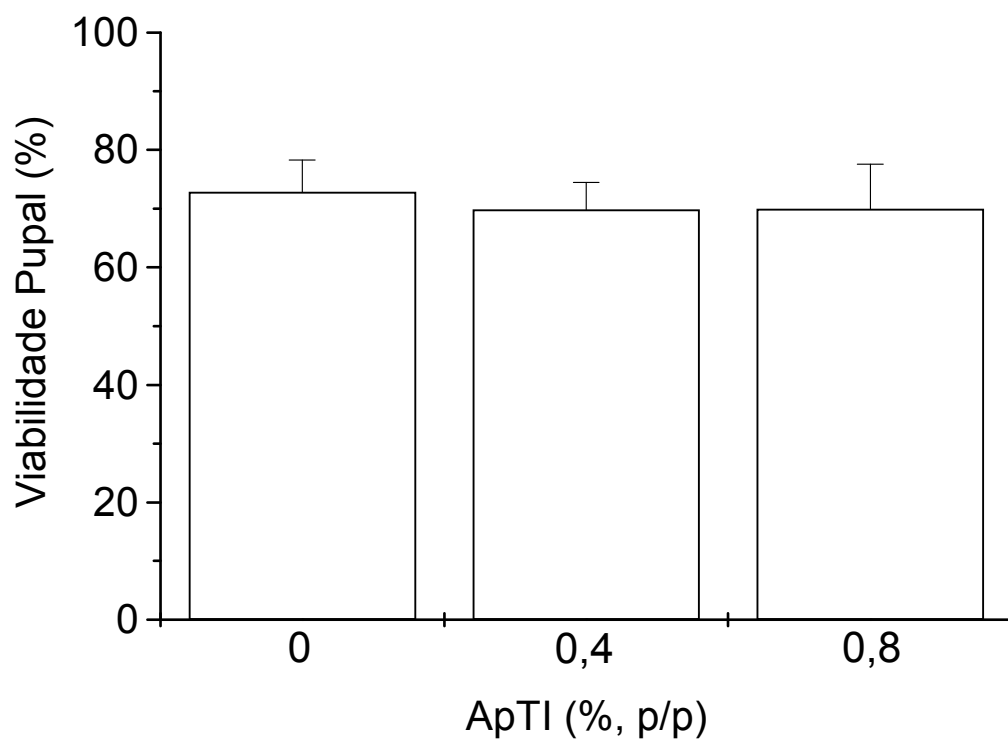


Figura 9: Viabilidade pupal de *Heliothis virescens* alimentadas em dietas artificiais contendo ApTI em diversas concentrações.

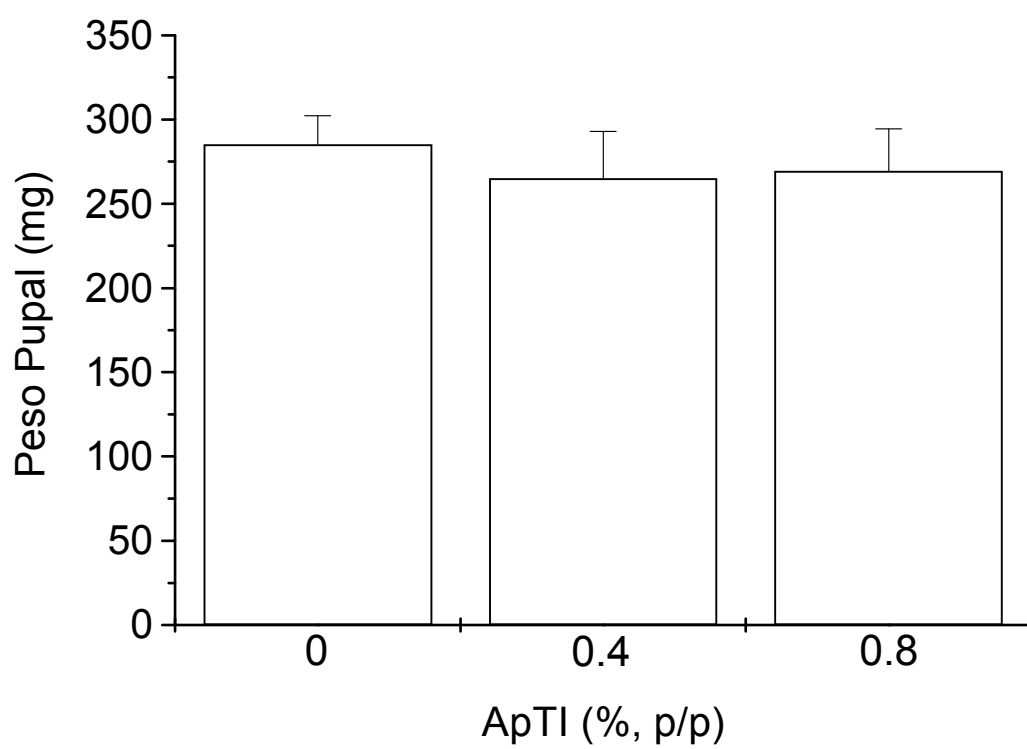


Figura 10: Peso das pupas de *Heliothis virescens* alimentadas em dietas artificiais contendo ApTI em diversas concentrações.

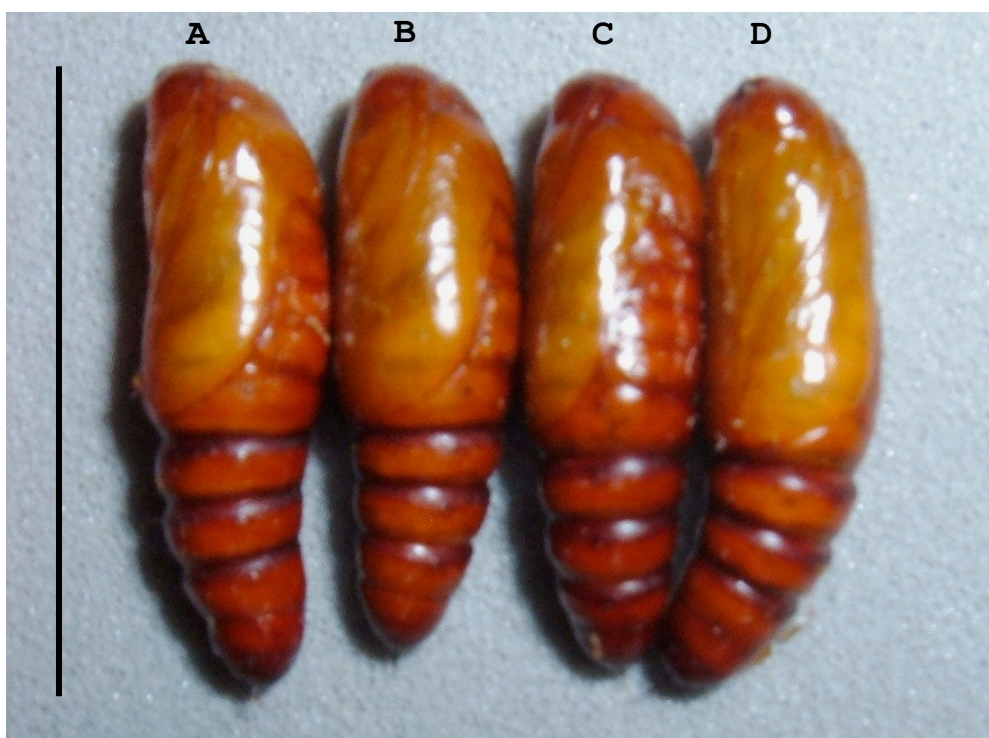


Figura 11: Foto ilustrando o efeito de ApTI no peso das pupas de *Heliothis virescens*. [A] Larva alimentada em dieta controle [B] Larva alimentada em dieta contendo ApTI 0,2% [C] Larva alimentada em dieta contendo ApTI 0,4% [D] Larva alimentada em dieta contendo ApTI 0,8%. Barra = 2 cm.

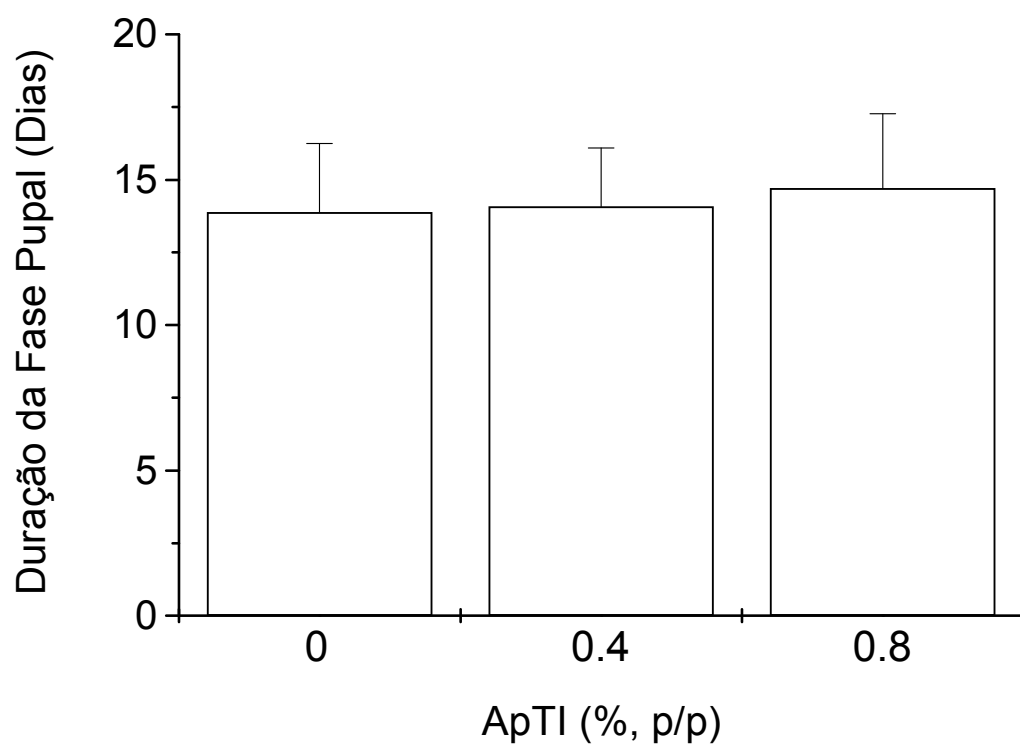


Figura 12: Duração da fase pupal de *Heliothis virescens* alimentadas em dietas artificiais contendo ApTI em diversas concentrações.

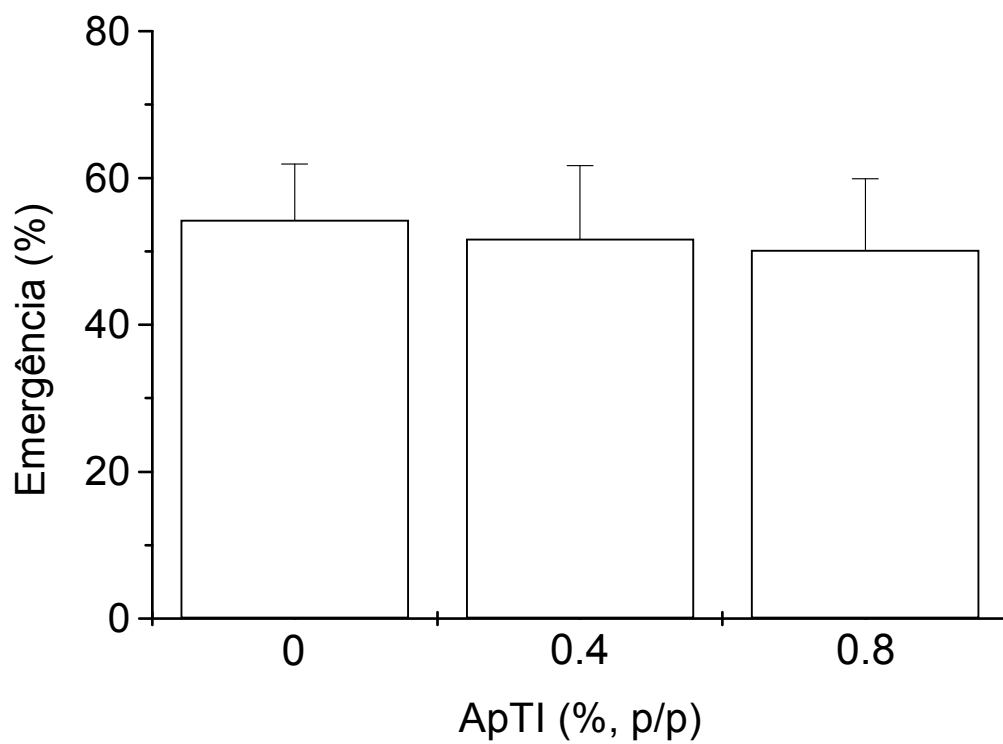


Figura 13: Emergência das pupas de *Heliothis virescens* alimentadas em dietas artificiais contendo ApTI em diversas concentrações.

5.3 - Determinação da atividade tríptica

Ensaio enzimáticos foram realizados para tentar elucidar os mecanismos pelos quais as larvas de *H. virescens* utilizaram para driblar a presença do inibidor na dieta, já que não foi observado nenhum efeito negativo no desenvolvimento larval. Extratos intestinais de larvas de quarto instar foram utilizados como fonte de enzimas (20µg de proteína), as quais foram incubadas com BApNA por 20 minutos. Foi observado um aumento de quase 100% na atividade de enzimas do tipo tripsina das larvas alimentadas em dieta contendo ApTI a 0,4% (Figura 14), sugerindo a resposta do inseto a presença do inibidor de forma a super expressar enzimas do tipo tripsina.

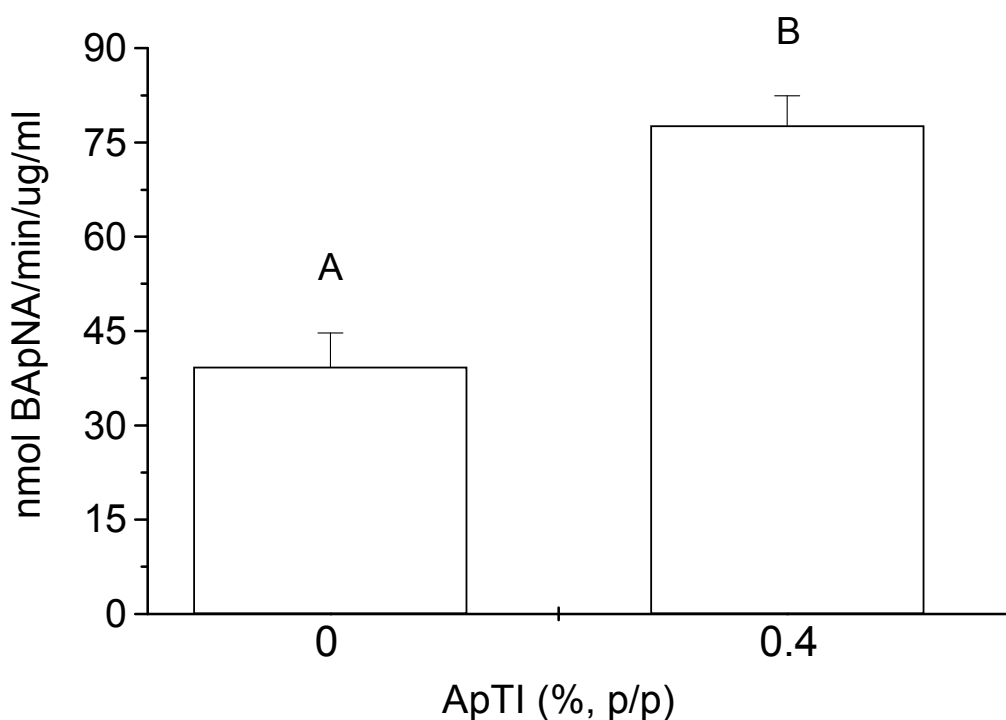


Figura 14: Atividade tríptica das larvas de 4º instar de *H. virescens* alimentadas em dietas artificiais contendo ApTI. Foram utilizadas triplicatas para cada tratamento. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

5.4 - Determinação da atividade antitriptica

Como a resposta de insetos a presença de inibidor pode ser de várias maneiras, foi pré-incubada as enzimas das larvas e *H. virescens* com diversas concentrações de ApTI por 15 minutos antes da adição do substrato, seguindo os mesmos parâmetros descritos anteriormente. Nesse ensaio pode-se observar que as enzimas presentes nas larvas alimentadas em dieta contendo ApTI a 0,4% eram 13% menos sensíveis (inibidas) por ApTI em relação as enzimas das larvas alimentadas em dieta controle (Figura 15), demonstrando que além da super expressão de enzimas (Figura 14), enzimas insensíveis foram expressas.

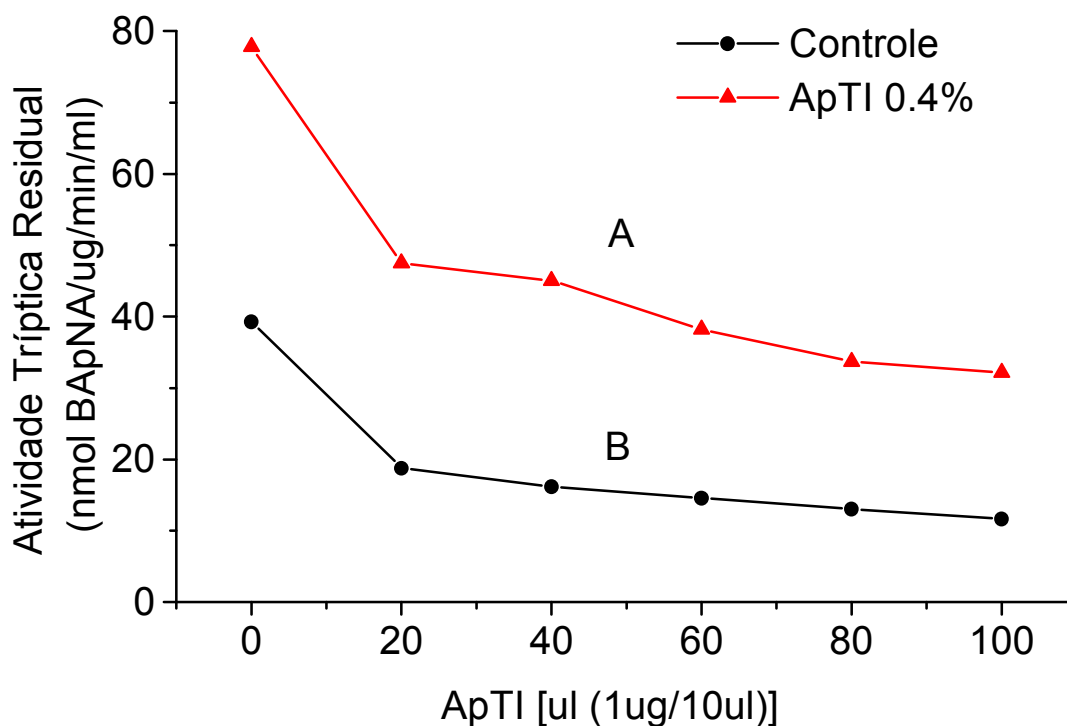


Figura 15: Inibição das enzimas das larvas de 4º instar de *H. virescens*, utilizando ApTI como inibidor. Foram utilizadas triplicatas para cada tratamento. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

5.5 - Atividade enzimática em SDS-PAGE contendo gelatina 0,1%

Para confirmação e melhor visualização dos resultados obtidos nos itens 4.2 e 4.3 um gel de atividade enzimática (zimograma) foi realizado, amostras de enzimas (2 µg) foram aplicadas na eletroforese, na ausência ou presença do inibidor (ApTI). Após a corrida o gel foi lavado com solução Triton X-100 para remoção do SDS e subsequentemente incubado para atividade enzimática e corado. Nesse experimento fica visível a super expressão enzimática das larvas que se alimentaram em dieta contendo ApTI (linha 3) e também a menor sensibilidade ao inibidor (linha 5) (Figura 16).

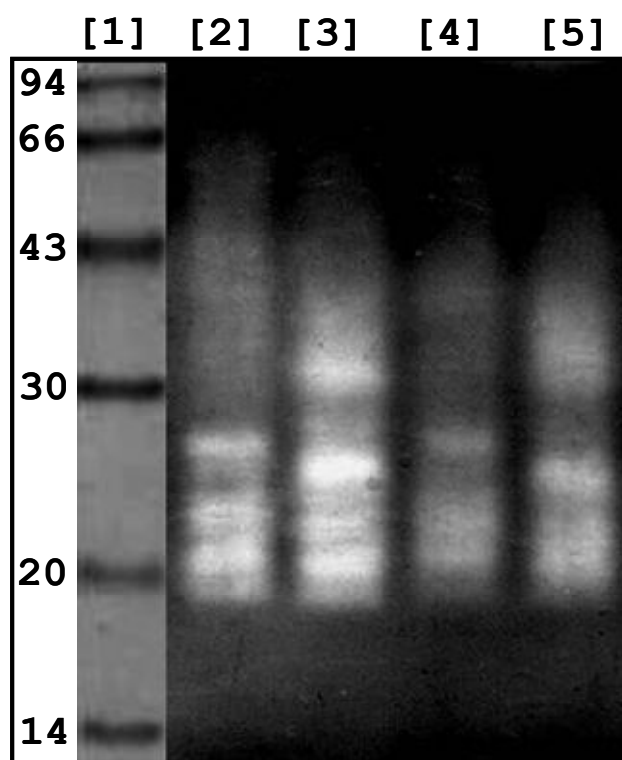


Figura 16: SDS-PAGE contendo gelatina 0,1%.
[1] Padrões de MM [2] IM Controle [3] IM ApTI
0,4% [4] IM Controle + 2ug ApTI [5] IM ApTI
0,4% + 2ug ApTI.

6 - DISCUSSÃO

Inibidores de proteinases de uma ampla variedade de plantas e animais reduzem o crescimento e a sobrevivência de vários insetos quando adicionados em dietas artificiais (JOHNSTON *et al.*, 1995; CHRISTELLER *et al.*, 1992; DeLEO *et al.*, 2001, MACEDO *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2005) e também diminuem a fertilidade e fecundidade dos insetos adultos (DeLEO & GALLERANI, 2002; TELANG *et al.*, 2003; TAMHANE *et al.*, 2005). Recentemente um inibidor de tripsina presente nas sementes de *Peltophorum dubium* reduziu em 50% o ganho de peso de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera) quando presente a 1% em dieta artificial (MACEDO *et al.*, 2003).

A identificação de novos inibidores de proteinase, os quais sejam eficazes no combate a insetos-alvo requer o prévio conhecimento dos tipos de proteases presentes no intestino do inseto. No caso de *Heliothis virescens* JOHNSTON *et al.* (1995) demonstrou que havia três tipos de atividades enzimáticas, sendo a atividade de enzimas do tipo tripsina e quimotripsina majoritárias.

De acordo com esses dados, no presente trabalho foi utilizado um inibidor do tipo Kunitz (ApTI) que inibe de forma não competitiva enzimas do tipo tripsina, quimotripsina e papaína, e apresentou propriedades inseticidas. ApTI utilizado a 0,5% em dietas artificiais causou mortalidade de 50% e reduziu o ganho de peso em 40% das larvas de quarto instar de *Callosobruchus maculatus* (MACEDO *et al.*, 2004).

A presença do inibidor na dieta (até a concentração utilizada) não afetou o desempenho de *Heliothis virescens*, sugerindo que o inibidor não tem efeito em nenhum estágio de desenvolvimento do inseto. Resultados similares foram obtidos por DeLEO & GALLERANI (2002) quando utilizaram plantas transgênicas de fumo expressando o inibidor de tripsina de mostarda contra o lepidóptero *Spodoptera littoralis*; a presença do inibidor não causou mortalidade e diminuição no ganho de peso das larvas, e também não alterou o tempo de duração do estágio larval, a viabilidade e peso das pupas.

Da mesma forma, os índices nutricionais não apresentaram taxas diferentes, a eficiência no consumo e utilização do alimento foi semelhante em todos os tratamentos. Trabalhando com *Heliothis virescens* alimentado com fumo transgênico expressando o inibidor de serino-proteinase de batata (PIN-2), BRITO (2000) obteve resultados semelhantes, a presença do inibidor não diminuiu o ganho de peso, a sobrevivência, não

atrasou o desenvolvimento do inseto e por consequência, os índices nutricionais não foram alterados, apenas uma pequena variação na sobrevivência das pupas foi observada.

Vários trabalhos na literatura têm demonstrado que os insetos apresentam a capacidade de se aclimatarem as plantas transgênicas ou dietas artificiais contendo inibidores de proteinase (BRITO *et al.*, 2001; HAQ *et al.*, 2004; FAN & WU, 2005; PILON *et al.*, 2006). Basicamente são quatro os mecanismos empregados. Primeiramente, pode ocorrer a superexpressão de proteinases nativas (BROADWAY, 1996) de forma a fornecer uma quantidade de enzimas superior a de inibidor, e dessa forma ocorrendo à digestão do alimento.

O segundo mecanismo é a síntese de proteinases insensíveis ao inibidor. Resultados recentes têm demonstrado que alguns insetos polípagos apresentam uma grande família multigênica responsável pela síntese de dezenas de proteinases do tipo das tripsinas e quimotripsinas (JONGSMA *et al.*, 1995; GATEHOUSE *et al.*, 1997; BROADWAY, 1997).

O terceiro mecanismo foi observado em larvas de coleópteros (GIRARD *et al.*, 1998), e em lagartas de *Helicoverpa armigera* (GIRI *et al.*, 1998) as quais desenvolveram a capacidade de clivar os inibidores via proteinases digestivas, esse mecanismo além de reduzir os efeitos antinutricionais dos inibidores utiliza-os como fonte de aminoácidos.

Finalmente um quarto mecanismo foi recentemente observado em lagartas de *H. virescens* alimentadas com discos foliares de plantas transgênicas ou não transformadas de fumo. Neste caso, os resultados indicam que as lagartas são capazes de formar complexos de alto peso molecular (oligômeros) com as proteinases do tipo das tripsinas, o que impediria o acesso do inibidor (BRITO *et al.*, 2001).

O fato de *H. virescens* ser um inseto polífago (FITT, 1989) sugere que, durante a sua história evolutiva, as lagartas tiveram contato com diferentes espécies e gêneros vegetais os quais, apresentavam uma ampla gama de inibidores de proteinase. Este contato proporcionou o desenvolvimento de mecanismos adaptativos que sobrepõem o efeito nocivo dos inibidores, além disso, esse inseto se alimenta de folhas de fumo, as quais possuem pelo menos 6 inibidores induzidos por injúria (PEARCE *et al.*, 1993) demonstrando mais uma vez sua capacidade em driblar a presença de inibidores. Assim sendo, tornou-se de suma importância um estudo bioquímico das enzimas digestivas das lagartas a fim de fornecer subsídios ao entendimento dos resultados.

Primeiramente foi detectada uma atividade de enzimas do tipo tripsina duas vezes maior no intestino médio das larvas que se alimentaram em dieta que continha o inibidor, demonstrando a resposta do inseto à presença do inibidor, superexpressando enzimas. O próximo passo foi avaliar se essas enzimas superexpressas eram nativas ou apresentavam uma maior insensibilidade ao inibidor.

Foi detectado em ensaio antitriptico que a inibição por ApTI das enzimas do intestino médio das larvas foi aproximadamente 13% maior nas larvas controle, sugerindo a presença de enzimas insensíveis ao inibidor nas larvas que tiveram contato com o mesmo durante seu desenvolvimento. Esses resultados são comprovados e melhor visualizados em gel de atividade enzimática que foi realizado, no qual podemos observar uma maior atividade enzimática, além de uma menor inibição quando as amostras foram incubadas com o inibidor (ApTI), além disso o que chama a atenção é uma banda de atividade em torno de 30 kDa presente nos insetos que se alimentaram de ApTI, e não esta presente nos insetos controle, a qual foi inibida por ApTI, sugerindo ser uma enzima do tipo tripsina.

BRITO *et al.* (2001) demonstraram em seu trabalho que *H. virescens* aclimata-se a presença de inibidores de protease através da síntese de enzimas tripsina aparentemente menos sensíveis aos inibidores. Resultado semelhante foi observado em outro lepidóptero, *Spodoptera exigua* aclimatou-se a fumo expressando um inibidor de tripsina de cevada (LARA *et al.*, 2000), assim como outros inúmeros trabalhos demonstram essa aclimação aos inibidores (CLOUTIER *et al.*, 2000; LECARDONNEL *et al.*, 1999; ABDEEN *et al.*, 2005).

A expressão de enzimas insensíveis ao inibidor é possível devido à família multigênica presente em lepidópteros responsável pela síntese das proteinases (GATEHOUSE *et al.*, 1997). Além disso, uma pequena variação em uma enzima pode resultar em uma proteinase insensível, essas mudanças não necessariamente precisam ser no sítio ativo da enzima, mas podem ser na região ligante, o que de qualquer forma poderia resultar em diferentes afinidades (TELANG *et al.*, 2005).

Devido a essa capacidade dos insetos em se aclimatarem a presença dos inibidores diversos trabalhos têm demonstrado que larvas de insetos substituem enzimas inibidas por outras proteases insensíveis, essas larvas podem, além disso, exibir uma taxa de ingestão aumentada além de se desenvolverem mais rápido que as larvas controle (GIRARD *et al.*, 1998b; CLOUTIER *et al.*, 1999; ABDEEN *et al.*, 2005).

Conclui-se, portanto, que ApTI não alterou a sobrevivência e o peso das larvas de quarto instar e não atrasou o desenvolvimento do inseto até a fase adulta, porém modificou o padrão de enzimas presentes no intestino médio, sendo possivelmente enzimas do tipo tripsina, as quais possibilitaram o desenvolvimento aparentemente normal das larvas mesmo na presença do inibidor.

Essas observações sugerem alternativas, como o uso combinado de mais de um inibidor, efetivos contra diferentes classes enzimáticas, o que levaria a um aumento na resistência das plantas e dificultaria aos insetos a expressão de proteases insensíveis a diversas famílias de inibidores ao mesmo tempo, como trabalhos recentes demonstram o sucesso dessa abordagem. ABDEEN *et al.* (2005) expressou em tomate o inibidor de tripsina (PI-II) e de carboxipeptidase (PCI) de batata e testaram contra dois insetos, *Heliothis obsoleta* e *Liriomyza trifolii*, em ambos os casos obtiveram sucesso, aumentando a resistência da planta aos insetos quando os inibidores foram expressos em homozigose. Em outro trabalho BRUNELLE *et al.* (2005) expressaram em *Escherichia coli* dois inibidores fusionados, o inibidor de aspartato proteinase catepsina-D de tomate (CDI) e o inibidor de cisteína proteinase de milho (CCII). O híbrido demonstrou manter as propriedades inibitórias, inibindo com mesma intensidade enzimas do tipo das cisteínas e aspárticas, além de diminuir em mais de 50% o consumo do alimento e o crescimento das larvas de *Leptinotarsa decemlineata*.

7 - CONCLUSÕES

- ✚ ApTI não alterou o desenvolvimento de *Heliothis virescens* até a fase adulta,
- ✚ Porém modificou o padrão de enzimas presentes no intestino médio,
- ✚ Ocorrendo superexpressão de enzimas do tipo tripsina,
- ✚ Além da expressão de enzimas insensíveis a ApTI.

8 - REFERÊNCIAS

- ABDEEN, A.; VIRGÓS, A.; OLIVELLA, E.; VILLANUEVA, J.; AVILÉS, X.; GABARRA, R.; PRAT, S. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology** v. 57, p. 189-202. 2005.
- ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; SUZUKI, K.; ARAI, S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 16793-16797. 1987.
- ABE, M.; ABE, K.; DOMOTO, C.; ARAI, S. Two distinct species of corn cystatin in corn kernels. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 59, p. 756-758. 1995.
- ALFONSO-RUBI, J.; ORTEGO, F.; CASTANERA, P.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. Transgenic expression of trypsin inhibitor CMe from barley in indica and japonica rice confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*. **Transgenic Research**, v. 12, p. 23-31. 2003.
- ALTPETER, F.; DIAZ, I.; MCAUSLANE, H.; GADDOUR, K.; CARBONERO, P.; VASIL, I.K. Increased insect resistance in transgenic wheat stably expressing trypsin inhibitor CMe. **Molecular Breeding**, v. 5, n. 1, p. 53-63. 1999.
- ANDREWS, R.E.; FAUST, R.M.; WABIKO, H.; RAYMOND, K.C.; BULLA, L.A. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 6, p. 163-232. 1987.
- ASHOURI, A.; OVERNEY, S.; MICHAUD, D.; CLOUTIER, C. Fitness and feeding are affected in the two-spotted stinkbug, *Perillus bioculatus*, by the cysteine proteinase inhibitor, oryzacystatin I. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 38, p. 74-83. 1998.

- ATKINSON, A.H.; HEALTH, R.L.; SIMPSON, R.J.; CLARKE, A.E.; ANDERSON, M.A. Proteinase inhibitors in *Nicotiana glauca* stigmas are derived from a precursor protein which is processed into 5 homologous inhibitors. **Plant Cell**, v. 5, p. 203-213. 1993.
- BALANDIN, T.; DOES, C.V.; ALBERT, J.M.B.; BOL, J.F.; LINTHORST, H.J.M. Structure and induction pattern of a novel proteinase inhibitor class II gene of Tobacco. **Plant Molecular Biology**, v. 27, p. 1197-1204. 1995.
- BALOGUN, A.M. & FETUGA, B.L. Fatty acid composition of seed oils of some members of the Meliaceae and Combretaceae families. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 62, n. 33, p. 529-531. 1985.
- BARBER, G.W. Seasonal availability of food plants of two species of *Heliothis* in Eastern Georgia. **Journal of Economic Entomology**, v. 30, p. 150-158. 1937.
- BARBIERI, L.; BATTELLI, M.G.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins from plants. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1154, p. 237-282. 1993.
- BALDWIN, I.T. & PRESTON, C.A. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. **Planta**, v. 208, p. 137-145. 1999.
- BELITZ, H.D. & WEDER, J.K.P. Protein inhibitors of hydrolases in plants foodstuffs. **Food Reviews International**, v. 6, p. 151-211. 1990.
- BENTHALL, A.P. The trees of Calcutta. Calcutta, India: **Thacker Spink & Co Ltd.**, p. 513. 1946.
- BISHOP, P.D.; PEARCE, G.; BRYANT, J.E.; RYAN, C.A. Isolation and characterization of the proteinase inhibitor-inducing factor from tomato leaves. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 13172-13177. 1984.
- BODE, W. & HUBER, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1477, p. 241-252. 2000.

- BOLTER, C.J. & JONGSMA, M.A. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. **Journal of Insect Physiology**, v. 41, n. 12, p. 1071-1078. 1995.
- BOULTER, D. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. **Biochemistry**, v. 34, p. 1453-1466. 1993.
- BOTTRELL, D.G. & ADKISSON, P.L. Cotton insect pest management. **Annual Review of Entomology**, v. 22, p. 541-582. 1977.
- BOWLES, D.J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Reviews of Biochemistry**, v. 59, p. 873-907. 1990.
- BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, p. 625-638. 1997.
- BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Regulation of expression of genes encoding digestive protease in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. **Physiological Entomology**, v. 29, p. 278-290. 2004.
- BRITO, L.O. Adaptação de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) a inibidores de proteinases de plantas transgênicas de fumo. Piracicaba, 2000. 64p. Tese (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Universidade de São Paulo.
- BRITO, L.O.; LOPES, A.R.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 128, p. 365-375. 2001.

- BROADWAY, R.M.; DUFFEY, S.S.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. Plant Proteinase Inhibitors: A Defense against Herbivorous Insect? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 41, p. 33-38. 1986.
- BROADWAY, R.M. & DUFFEY, S.S. The effect of dietary protein on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, v. 32, p. 673-680. 1986.
- BROADWAY, R.M. Purification and partial characterization of trypsin/chymotrypsin inhibitors from cabbage. **Phytochemistry**, v. 33, p. 21-27. 1993.
- BROADWAY, R.M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitor? **Journal of Insect Physiology**, v. 41, p. 107-116. 1995.
- BROADWAY, R. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 32, p. 39-53. 1996.
- BROADWAY, R.M. Dietary regulation of serine that are resistant to serine proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, p. 855-874. 1997.
- BRUNELLE, F.; GIRARD, C.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. A Hybrid, Broad-Spectrum Inhibitor of Colorado Potato Beetle Aspartate and Cysteine Digestive Proteinases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 60, p. 20-31. 2005.
- BRYANT, J.; GREEN, T.R.; GURUSADDAIAH, T.; RYAN, C.A. Proteinase inhibitor II from potatoes: isolation and characterization of its promoter components. **Biochemistry**, v. 15, p. 3418-3424. 1976.
- BURGESS, E.P.J.; STEVENS, P.S.; KEEN, G.K.; LAING, W.A.; CHRISTELLER, J.T. Effects of proteinase inhibitors and dietary protein level on the black field cricket *Teleogryllus commodus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 61, p. 123-130. 1991.

- BURKILL, I.H. (1966). A dictionary of the economic products of the Malay Peninsula. *Governments of Malaysia and Singapore*, Kuala Lumpur, Malaysia.
- CAMPOS, F.A.P.; XAVIER-FILHO, J.; SILVA, C.P.; ARY, M.B. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F). **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 92, p. 51-57. 1989.
- CARLINI, C.R. & UDEDIBIE, A.B. Comparative effects of processing methods on hemagglutinating and antitryptic activities of *Canavalia ensiformis* and *Canavalia braziliensis* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4372-4377. 1997.
- CARLINI, C.R. & GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539. 2002.
- CHRISPEELS, M.J. & RAIKHEL, N.V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. **Plant Cell**, v. 3, p. 1-9. 1991.
- CHRISTELLER, J.T.; LAING, W.A.; MARKWICK, N.P.; BURGESS, E.P.J. Midgut proteases activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, p. 735-746. 1992.
- CLOUTIER, C.; FOURNIER, M.; JEAN, C.; YELLE, S.; MICHAUD, D. Growth compensation and faster development of Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding on potato foliage expressing oryzacystatin I. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 40, p. 69-79. 1999.
- CLOUTIER, C.; JEAN, C.; FOURNIER, M.; YELLE, S.; MICHAUD, D. Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* compensate for nutritional stress on Oryzacystatin I-transgene potato plants by hypertrophic behavior and

over-production of insensitive proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 44, p. 69-81. 2000.

COHEN, E. Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 22, p. 245-261. 1993.

DeLEO, F.; BONADÉ-BOTTINO, M.; CECI, L.R.; GALLERANI, R.; JOAUNIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 593-602. 2001.

DeLEO, F. & GALLERANI, R. The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis* larvae fed on transgenic plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, p. 489-496. 2002.

DUAN, X.; LI, X.; XUE, Q.; ABO-EL-SAAD, M.; XU, D.; WU, R. Transgenic Rice Plants Harboring and Introduced Potato Proteinase Inhibitors II Gene are Insect Resistant. **Nature Biotechnology**, v. 14, p. 494-498. 1996.

ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271-278. 1961.

FAN, S.G. & WU, G.J. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, 273-292. 2005.

FERNANDES, K.V.S.; SABELLI, P.A.; BARRATT, D.H.P.; RICHARDSON, M.; XAVIER-FILHO, J.; SHEWRY, P.R. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase - inhibitors. **Plant Molecular Biology**, v. 23, 215-219. 1993.

FITT, G.P. The ecology of *Heliothis* species in relation to agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, v. 34, p. 17-52. 1989.

- FRANCO, O.L.; SANTOS, R.C.; BATISTA, J.A.; MENDES, A.C.; ARAÚJO, M.A.M.; MONNERAT, R.G.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; FRIETAS, S.M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 3, 343-349. 2003.
- FRANCO, O.L.; DIAS, S.C.; MAGALHÃES, C.P.; MONTEIRO, A.C.S.; BLOCH-JR, C.; MELO, F.R.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; MONNERAT, R.G.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry**, v. 65, n. 1, p. 81-89. 2004.
- GATEHOUSE, A.M.R.; SHI, Y.; POWELL, K.S.; BROUGH, C.; HILDER, V.A.; HAMILTON, W.D.O.; NEWELL, C.A.; BOULTER, D.; GATEHOUSE, J.A. Approach to Insect Resistance Using Transgenic Plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 342, p. 279-286. 1993.
- GATEHOUSE, A.M.R.; DOWN, R.E.; POWELL, K.S.; SAUVION, N.; RAHBE, Y.; NEWELL, C.A.; MERRYWEATHER, A.; HAMILTON, W.D.O.; GATEHOUSE, J.A. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the peach-potato aphid *Myzus persicae*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 79, n. 3, p. 295-307. 1996.
- GATEHOUSE, L.N.; SHANNON, A.L.; BURGESS, E.P.J.; CHRISTELLER, J.T. Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitor in diet. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 11, p. 929-944. 1997.
- GATEHOUSE, A.M.R.; NORTON, E.; DAVISON, G.M.; BABBE, S.M.; NEWELL, C.A.; GATEHOUSE, J.A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*: effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, p. 545-558. 1999.
- GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITING, B. Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive

reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 3, p. 327-333. 1990.

GIRARD, C.; MÉTAYER, M.L.; BONADÉ-BOTINO, M.; DELEGUÈ, M.P.; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, p. 229-237. 1998a.

GIRARD, C.; MÉTAYER, M.L.; ZACCOMER, B.; BARTLET, E.; WILLIAMS, I.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM-DELEGUE, M.H.; JOUANIN, L. Growth stimulation of beetle larvae reared on a transgenic oilseed rape expressing a cysteine protease inhibitor. **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 263-270. 1998b.

GIRI, A.P.; HARSULKAR, A.M.; DESHPANDE, V.V.; SAINANI, M.N.; GUPTA, V.S.; RANJEKAR, P.K. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. **Plant Physiology**, v. 116, p. 393-401. 1998.

GOMES, A.P.G.; DIAS, S.C.; BLOCH JR, C.; MELO, F.R.; FURTADO-JR, J.R.; MONNERAT, R.G.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; FRANCO, O.L. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 140, p. 313-319. 2005.

GRAHAM, J.S. & RYAN, C.A. Accumulation of a metallo-carboxypeptidase inhibitor in leaves of wounded potato plants. **Biochemistry Biophysics Research Communications**, v. 101, n. 4, p. 1164-1170. 1981.

GRAHAM, J.; GORDON, S.C.; NICOL, R.J. The effect of the CpTi gene in strawberry against attack by vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus* F. Coleoptera: Curculionidae). **Annals of Applied Botanical**, v. 131, p. 133-139. 1997.

- HAQ, S.K.; ATIF, S.M.; KHAN, R.H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 431, p. 145-159. 2004.
- HAMBLETON, E.J. *Heliothis virescens* as a Pest of Cotton, with Notes on Host Plants in Peru. **Journal of Economic Entomology**, v. 37, p. 660-666. 1944.
- HEGEDUS, D.; BALDWIN, D.; O'GRADY, M.; BRAUN, L.; GLEDDIE, S.; SHARPE, A.; LYDIATE, D.; ERLANDSON, M. Midgut proteases from *Mamestra configurata* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: Characterization, cDNA cloning, and expressed sequence tag analysis. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 53, n. 1, p. 30-47. 2003.
- HIBBETTS, K.; HINES, B.; WILLIAMS, D. An overview of proteinase inhibitors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 302-308. 1999.
- HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v. 330, p. 161-163. 1987.
- HILDER, V.A. & BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance - a critical review. **Crop Protection**, v. 18, p. 177-191. 1999.
- HOUSEMAN, J.G. & DOWNE, A.E.R. Cathepsin D-like activity in the posterior gut of hemipteran insects. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 75, p. 509-512. 1983.
- HOUSEMAN, J.G.; CAMPBELL, F.C.; MORRISON, P.E. A preliminary characterization of digestive proteases in the posterior midgut of the stable fly *Stomoxys calcitrans* (L.) (Diptera: Muscidae). **Insect Biochemistry**, v. 17, p. 213-218. 1987.
- HOUSEMAN, J.G.; PHILOGENE, B.J.R.; DOWNE, A.E.R. Partial characterization of proteinase activity in the larval midgut of the European corn borer, *Ostrinia*

nubilalis Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). **Canadian Journal of Zoology**, v. 67, p. 864-868. 1989.

JANY, K.D.; HAUG, H.; PFLEIDER, G.; ISAHAY, J. Enzymatic and chemical properties of an endopeptidases from the larvae of the hornet, *Vespa cabro*. **Biochemistry**, v. 17, p. 4675-4682. 1978.

JANY, K.D.; BEKELAER, K.; PFLEIDER, G.; ISAHAY, J. Amino acid sequence of an insect chymotrypsin from the larvae of the hornet, *Vespa orientalis*. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, v. 110, p. 1-7. 1983.

JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; GYNHEUNG, A.N.; RYAN, C. Expression of proteinase inhibitor I and it in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy Science USA**, v. 86, p. 9871-9875. 1989.

JOHNSTON, K.A.; LEE, M.J.; GATEHOUSE, J.A.; ANSTEE, J.H. The partial purification and characterization of serine protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry**, v. 21, n. 4, p. 389-397. 1991.

JOHNSTON, K.A.; LEE, M.J.; BROUGH, C.; HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Proteinase activities in the larval midgut of *Heliothis virescens*: Evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, p. 375-383. 1995.

JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibiton. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 92, p. 8041-8045. 1995.

JONGSMA, M.A.; PETERS, J.; STIEKEMA, W.J.; BOSCH, D. Characterization and partial purification of gut proteinases of *Spodoptera exigua* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, p. 185-193. 1996.

- JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M.
Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v. 131, p. 1-11. 1998.
- KINCADE, R.T.; LASTER, M.L.; BRAZZEL, J.R. Damage two cotton by the tobacco
budworm. **Journal of Economic Entomology**, v. 60, p. 1163-1164. 1967.
- KITCH, L.W. & MURDOCK, L.L. Partial characterization of a major gut thiol
proteinase from larvae of *Callosobruchus maculatus* F. **Archives of Insect
Biochemistry and Physiology**, v. 3, p. 561-575. 1986.
- KOGAN, J.; SELL, D.K.; STINNER, R.E.; BRADLEY; KOGAN, M.V. Bibliography
the *Heliothis zea* (Boddie) and *Heliothis virescens* (F) (Lepidoptera: Noctuidae).
Intsoy, v. 17. 1978.
- KOIWA, H.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Regulation of proteinase inhibitors
and plant defense. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 379-384. 1997.
- KOIWA, H.; SHADE, R.E.; ZHU-SALZMAN, K.; SUBRAMANIAN, L.;
MURDOCK, L.L.; NIELSEN, S.S.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Phage
display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. **Plant
Journal**, v. 14, p. 371-379. 1998.
- KOIWA, H.; SHADE, R.E.; ZHU-SALZMAN, K.; DURSO, M.P.; MURDOCK, L.L.;
BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. A plant defensive cystatin (soyacystatin)
targets cathepsin L-like digestive cysteine proteinases (DvCALs) in the larval
midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). **FEBS Letters**,
v. 471, p. 67-70. 2000.
- KURODA, M.; ISHIMOTO, M.; SUZUKI, K.; KONDO, H.; ABE, K.; KITAMURA,
K.; ARAI, S. Oryzacystatins exhibit growth-inhibitory and lethal effects on
different species of bean insect pests *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) and
Riptortus clavatus (Hemiptera). **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.
60, p. 209-212. 1996.

- KURODA, M.; KIYOSAKI, T.; MATSUMOTO, I.; MISAKA, T.; ARAI, S.; ABE, K.
Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, p. 22-28. 2001.
- LARA, P.; ORTEGO, F.; GONZALEZ-HIDALGO, E.; CASTANERA, P.; CARBONERA, P.; DIAZ, I. Adaptation of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to barley trypsin inhibitor BTI-CMe expressed in transgenic tobacco. **Transgenic Research**, v. 9, p. 169-178. 2000.
- LAROCQUE, A.M. & HOUSEMAN, J.G. Effect of ingested soybean, ovomucoid and corn protease inhibitors on digestive processes of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 36, n. 9, p. 691-697. 1990.
- LASKOWSKI, M.J. & KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 593-626. 1980.
- LAWRENCE, P.K. & KOUNDAL, K.R. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of pigeon pea (*Cajanus cajan* L. Millsp.) and molecular analysis of regenerated plants. **Current Science**, v. 80, n. 11, p. 1428-1432. 2001.
- LAWRENCE, P.K. & KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 93-109. 2002.
- LECARDONNEL, A.; CHAUVIN, L.; JOUANIN, L.; BEAUJEAN, A.; PRÉVOST, G.; SANGWAN-NORREEL, B. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. **Plant Science**, v. 140, p. 87-98. 1999.
- LEE, M.J. & ANSTEE, J.H. Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, p. 49-61. 1995.
- LEE, S. I.; LEE, S.; KOO, J.C.; CHUN, H.J.; LIM, C.O.; MUN, J.H.; SONG, Y.H.; CHO, M.J. Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the

brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stael) in transgenic rice. **Molecular Breeding**, v. 5, n. 1, p. 1-9. 1999.

LEMOS, F.J.A. & TERRA, W.R. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, p. 613-619. 1992.

LEPLÈ, J.C.; BONADÉ-BOTTINO, M.; AUGUSTIN, S.; PILATE, G.; LE TAN, V.D.; DELPLANQUE, A.; CORNU, D.; JONANIN, L. Toxicity of *Chrysomila tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. **Molecular Breeding**, v. 1, p. 319-328. 1995.

LI, Y.E.; ZHU, Z.; CHEN, Z.X.; WU, X.; WANG, W.; LI, S.J. Obtaining transgenic cotton plants with cowpea trypsin inhibitor gene. **Acta Gossyp Sinica**, v. 10, p. 237-243. 1998.

LIENER, I.E.; DEUEL, H.J.; FEVOLD, H.L. The effect of supplemental methionine on the nutritive value of diets containing concentrates of the soybean trypsin inhibitor. **Journal of Nutrition**, v. 39, n. 3, p. 325-339. 1949.

LIM, C.O.; LEE, S.I.; CHUNG, W.S.; PARK, S.H.; HWANG, I.; CHO, M.J. Characterization of a cDNA encoding cysteine proteinase inhibitor from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) flower buds. **Plant Molecular Biology**, v. 30, p. 373-379. 1996.

LORENZI, H. (1992). Árvores brasileiras – Manual de identificação e cultivo de plantas nativas do Brasil. Editora Plantarum LTDA, 1.

LYMAN, R.L. & LEPKOVSKY, S. The effect of raw soybean meal and trypsin inhibitor diets on pancreatic enzyme secretion in the rat. **Journal of Nutrition**, v. 62, n. 2, p. 269-284. 1957.

- MACEDO, M.L.R. & XAVIER-FILHO, J. Purification and partial characterization of trypsin inhibitors from seeds of *Clitoris ternatea*. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 58, p. 55-58. 1993.
- MACEDO, M.L.R.; MELLO, G.C.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MATOS, D.G.G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 891-898. 2002.
- MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; CABRINI, E.C.; TOYAMA, M.H.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1621, p. 170-182. 2003.
- MACEDO, M.R.L.; SÁ, C.M.; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J.R.P. A Kunitz-Type Inhibitor of Coleopteran Proteases, Isolated from *Adenantha pavonina* L. Seeds and Its Effect on *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2533-2540. 2004.
- MARCHETTI, S.; DELLEDONNE, M.; FOGHER, C.; CHIABA, C.; CHIESA, F.; SAVAZZINI, F.; GIORDANO, A. Soybean Kunitz, C-II and PIIV inhibitor genes confer different levels of insect resistance to tobacco and potato transgenic plants. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 519-526. 2000.
- MARES, M.; MELOUN, B.; PAVLIK, M.; KOSTKA, V.; BAUDYS, M. Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. **FEBS Letters**, v. 251, n. 1-2, p. 94-98. 1989.
- MARTIN, S.H.; ELZEN, G.W.; GRAVES, J.B.; MICINSKI, S.; LEONARD, B.R.; BURRIS, E. Toxicological responses of tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) from Louisiana, Mississippi and Texas to selected insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 88, p. 505-511. 1995.

- MCMANUS, M.T.; WHITE, D.W.R.; MCGREGOR, P.G. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. **Transgenic Research**, v. 3, p. 50-58. 1994.
- MCMANUS, M.T. & BURGESS, E.P.J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive protease of the larvae of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**, v. 41, n. 9, p. 731-738. 1995.
- MCMANUS, M.T.; BURGESS, E.P.J.; PHILIP, B.; WATSON, L.M.; LAING, W.A.; VOISEY, C.R.; WHITE, D.W.R. Expression of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor in transgenic tobacco: Effects on larval development of *Spodoptera litura*. **Transgenic Research**, v. 8, p. 383-395. 1999.
- METCALF, C.L.; FLINT, W.P.; METCALF, R.L. Destructive and useful insects. New York: *McGRAW-HILL*. 1962.
- MICHAUD, D. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 4-6. 1997.
- MICKEL, C.E. & STANDISH, J. Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum*. **University of Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin**, v. 178, p. 1-20. 1947.
- MISAKA, T.; KURODA, M.; IWABUCHI, K.; ABE, K.; ARAI, S. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. **European Journal of Biochemistry**, v. 240, p. 609-614. 1996.
- MURDOCK, L.L.; BROOKHART, G.; DUNN, P.E.; FOARD, D.E.; KELLEY, S.; KITCH, L.; SHADE, R.E.; SHUKLE, R.H.; WOLFSON, J.L. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 87, p. 783-787. 1987.

- NANDEESHA, P. & PRASAD, D.T. Characterization of serine proteinase inhibitor from subabul (*Leucaena leucocephala* Lam) seeds. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, v. 10, p. 75-78. 2001.
- NEGREIROS, A.N.; CARVALHO, M.M.; XAVIER-FILHO, J.; BLANCO-LABRA, A.; SHEWRY, P.R.; RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the major Kunitz trypsin inhibitor from the seeds of *Prosopis juliflora*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2829-2833. 1991.
- NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. **Science**, v. 224, 350-357. 1984.
- NUTT, K.A.; ALLSOPP, P.G.; MCGHIE, T.K.; SHEPHERD, K.M.; JOYCE, P.A.; TAYLO, G.O.; MCQUATTER, R.B.; SMITH, G.R.; OGARTH, D. M. (1999). In: **Proceedings of the 1999 Conference of the Australian Society of Sugarcane Technologists**, Townsville, Brisbane, Australia, p. 171-176. 1999.
- OERKE, E.C.; DEHNE, H.W.; SCHONBECK, F.; WEBER, A. Crop Production and Crop Protection: **Estimated Losses in Major Food and Cash Crops**, Elsevier, Amsterdam. 1994.
- OJIMA, A.; SHIOTA, H.; HIGASHI, K.; KAMADA, H.; SHIMMA, WADAMASATA, P.; SATOH, S. An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell cultures and seeds of carrot. **Plant Molecular Biology**, v. 34, p. 99-109. 1997.
- OLIVA, M.L.V.; GRISOLIA, D.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. Serine and SH-proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* beans. **Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 767-770. 1987.
- OLIVEIRA, A.S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M.P. Cysteine Proteinases and Cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, n. 1, p. 91-104. 2003.

- OSBORN, T.C.; ALEXANDER, D.C.; SUN, S.S.M.; CARDONA, C.; BLISS, F.A. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. **Science**, v. 240, p. 207-210. 1988.
- OZAWA, K. & LASKOWSKI, M. The Reactive Site of Trypsin Inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, p. 3955-3961. 1966.
- PANIZZI, A.R. & PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. **Ecologia nutricional de insetos e suas aplicações no manejo de pragas**. São Paulo: Editora Manole LTDA, Capítulo II, p. 9-65. 1991.
- PARRA, J.R.P. Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico. 3ª edição. Piracicaba: FEALQ, p. 137. 1996.
- PAULILLO, L.C.M.S.; LOPES, A.R.; CRISTOFOLETTI, P.T.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* Lepidoptera: Noctuidae is responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, p. 892-896. 2000.
- PEARCE, G.; MCGINNIS, J.; RYAN, C.A. Utilization by chicks of half-cystine from native and denatured proteinase inhibitor protein from potatoes. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 160, n. 2, p. 180-184. 1979.
- PEARCE, G.; SY, L.; RUSSEL, C.; RYAN, C.A.; HASS, G.M. Isolation and characterization from potato tubers of two polypeptide inhibitors of serine proteinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 213, p. 456-462. 1982.
- PEARCE, G.; MCGINNIS, J.; RYAN, C.A. Effects of feeding a carboxypeptidase inhibitor from potatoes to newly hatched chicks. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 173, n. 3, p. 447-453. 1983.

- PEARCE, G.; STRYDOM, D.; JOHNSON, S.; RYAN, C.A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, v. 253, p. 895-898. 1991.
- PEARCE, G.; JOHNSON, S.; RYAN, C.A. Purification and characterization from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves of six small, wound-inducible, proteinase inhibitors of the potato inhibitor-II family. **Plant Physiology**, v. 102, p. 639-644. 1993.
- PEDIBHOTLA, V.K.; HALL, F.R.; HOLMSEN, J. Deposit characteristics and toxicity of “pronil” formulations for tobacco budworm (Lepidoptera: Noctuidae) control on cotton. **Crop Protection**, v. 18, p. 493-499. 1999.
- PEFEROEN, M. Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 173-177. 1997.
- PEREIRA, R.A.; BATISTA, J.A.N.; SILVA, M.C.M.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; FIGUEIRA, E.L.Z.; JIMÉNEZ, A.V.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. An α -amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). **Phytochemistry**, v. 67, p. 2009-2016. 2006.
- PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. Lectin as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352. 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 gemmatilis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 86, p. 23-29. 2006.
- POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatrea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 99, p. 79-85. 2001.

- PLUNKETT, G.; SENEAR, D.F.; ZUROSKE, G.; RYAN, C.A. Proteinase inhibitor I and II from leaves of wounded tomato plants: purification and properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 213, p. 463-472. 1982.
- PURCELL, J.P.; GREENPLATE, J.T.; SAMMONS, R.D. (1992). Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 1, p. 41-47. 1992.
- RAHBÉ, Y.; FERRASSON, E.; RABESONA, H.; QUILLIEN, L. (2003). Toxicity to the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* of anti-chymotrypsin isoforms and fragments of Bowman-Birk protease inhibitors from pea seeds. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, p. 299-306. 2003.
- RANCOUR, J.M. & RYAN, C.A. Isolation of a carboxypeptidase B inhibitor from potatoes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, n. 1, p. 380-383. 1968.
- RICHARDSON, M. Proteins inhibitors of enzymes. **Food Chemistry**, v. 6, p. 235-253. 1981.
- RICHARDSON, M.; CAMPOS, F. A. P.; XAVIER-FILHO, J.; MACEDO, M. L. R.; MAIA, G. M. C.; YARWOOD, A. The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin isoinhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian carolina tree *Adenanthera pavonina* (L.). **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 872, p. 134-140. 1986.
- RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. **Methods in Plant Biochemistry**, v. 5, p. 259-306. 1991.
- RYAN, C.A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for improving defenses against insect and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 425-449. 1990.

- SALES, M.P.; GERHARDT, I.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; XAVIER-FILHO, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**, v. 124, p. 515-522. 2000.
- SANE, V.A.; NATH, P.; AMINUDDIN, SANE, P.V. Development of insect-resistant transgenic plants using plant genes: expression of cowpea trypsin inhibitor in transgenic tobacco plants. **Current Science**, v. 72, p. 741-747. 1997.
- SCHUCH, J.Z.; LUCCA FILHO, O.A.; PESKE, S.T.; DUTRA, L.M.C.; BRANCÃO, M.F.; ROSENTHAL, M.D. Physiological and sanitary quality of rice seeds stored with different seed moisture contents and fungicide treated. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, p. 45-53. 2006.
- SCHULER, T.H.; POPPY, G.M.; KERRY, B.R.; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 168-175. 1998.
- SOUZA, E.M.T.; MIZUTA, K.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **Phytochemistry**, v. 39, p. 521-525. 1995.
- SHUKLE, R.H.; MURDOCK, L.L.; GALLUN, R.L. Identification and partial characterization of a major gut proteinase from larvae of the Hessian fly *Mayetiola destructor* (Say) (Diptera: Cecidomyiidae). **Insect Biochemistry**, v. 15, p. 93-101. 1985.
- TABASHNIK, E. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 39, p. 47-49. 1994.
- TAMHANE, V.A.; CHOUGULE, N.P.; GIRI, A.P.; DIXIT, A.R.; SAINANI, M.N.; GUPTA, V.S. In vitro and in vivo effects of *Capsicum annum* proteinase inhibitors on *Helicoverpa armigera* gut proteinases. **Biochimica et Biophysica Acta: General Subjects**, v. 1722, p. 155-167. 2005.

- TANAKA, A.S.; SAMPAIO, M.U.; MARANGONI, S.; DE OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J.C.; OLIVA, M.L.V.; FINK, E.; SAMPAIO, C.A.M. Purification and primary structure determination of a Bowman-Birk trypsin inhibitor from *Torresea cearensis*. **Biological Biochemistry**, v. 378, p. 273-281. 1997.
- TELANG, M.A.; SRINIVASAN, A.; PATANKAR, A.G.; HARSULKAR, A.M.; JOSHI, V.; DAMLE, A.; DESHPANDE, V.V.; SAINANI, M.N.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, G.P.; BIRAH, A.; RANI, S.; KACHOLE, M.; GIRI, A.P.; GUPTA, V.S. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Phytochemistry**, v. 63, p. 643-652. 2003.
- TELANG, M.A.; GIRI, A.P.; SAINAMI, M.N.; GUPTA, V.S. Characterization of two midgut proteinase of *Helicoverpa armigera* and their interaction with proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 51, p. 513-522. 2005.
- TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, v. 109, p. 1-62. 1994.
- URWIN, P.E.; MCPHERSON, M.J.; ATKINSON, H.J. Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual proteinase inhibitor constructs. **Planta**, v. 204, p. 472-479. 1998.
- VAECK, M.; REYNAERTS, A.; HOFTE, H.; JANSENS, S.; DE BEUCKLEER, M.; DEAN, C.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 328, p. 33-37. 1987.
- VALUEVA, T.A. & MOSOLOV, V.V. Reactive sites of the 21-kD protein inhibitor of serine proteinases from potato tubers. **Biochemistry (Mosc)**, v. 64, n. 9, p. 1074-1078. 1999.
- VAZQUEZ-PADRON, R.I.; MORENO-FIERROS, L.; NERI-BAZAN, L.; DE LA RIVA, G.A.; LOPEZ-REVILLA, R. Intra gastric and intraperitoneal administration

of Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* induces systemic and mucosal antibody responses in mice. **Life Science**, v. 64, p. 1897-1912. 1999.

VAZQUEZ-PADRON, R.I.; GONZALES-CABRERA, J.; GARCIA-TOVAR, C.; NERI-BAZAN, L.; LOPEZ-REVILLA, R.; HERNANDEZ, M.; MORENO-FIERRO, L.; DE LA RIVA, G.A. Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* sp kurstaki HD73 binds to surface proteins in the mouse small intestine. **Biochemistry Biophysics and Research Communications**, v. 271, p. 54-58. 2000.

XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, p. 1-6. 1992.

XU, D.; XUE, Q.; MCELROY, D.; MAWAL, Y.; HILDER, V.A.; WU, R. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTi, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. **Molecular Breeding**, v. 2, p. 167-173. 1996.

WALDRON, C.; WEGRICH, L.M.; MERLO, P.A.; WALSH, T.A. Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. **Plant Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 801-812. 1993.

WARD, C.W. Resolution of proteases in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. **Australian Journal of Biology Science**, v. 28, p. 1-23. 1975.

WARD, C.W. Properties and specificity of the major anionic trypsin-like enzyme in the keratinolytic larvae of the webbing clothes moth. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 319, p. 201-211. 1995.

WOLFSON, J.L. & MURDOCK, L.L. Diversity in digestive proteinase activity among insects. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, p. 1089-1102. 1990.