

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



VANESSA DA SILVEIRA RAMOS

“Efeito de um inibidor de tripsina de sementes de *Plathymenia foliolosa* sobre o desenvolvimento e atividade enzimática de *Anagasta kuehniella*”

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
VANESSA DA SILVEIRA RAMOS
Maria Lígia Rodrigues Macedo
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profª. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

Campinas, 2008

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

R147e

Ramos, Vanessa da Silveira

Efeito de um inibidor de tripsina de sementes de *Plathymenia foliolosa* sobre o desenvolvimento e atividade enzimática de *Anagasta kuehniella* / Vanessa da Silveira Ramos. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Anagasta. 2. Nutrição - Índices. 3. *Plathymenia foliolosa*. 4. Inibidores de tripsina. I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Effect of the trypsin inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on *Anagasta kuehniella* development and enzymatic activity.

Palavras-chave em inglês: Anagasta; Nutrition - Indexes; *Plathymenia foliolosa*; Trypsin inhibitors.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo, Sérgio Marangoni, Valdirene Moreira Gomes.

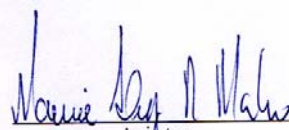
Data da defesa: 19/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

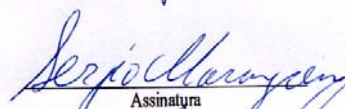
Campinas, 19 de fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). Maria Lígia Rodrigues Macedo


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Sérgio Marangoni


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Valdirene Moreira Gomes


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Cláudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Prof(a). Dr(a). Maristela Cesquini Oliveira

Assinatura

A Deus por me conceder tranqüilidade e a perseverança necessária para enfrentar os momentos de atribulações.

Aos meus queridos pais, Cleonice e Geraldo, que nunca mediram esforços em toda minha vida, para que eu atingisse os meus objetivos e conquistas. Amo vocês.

A minha irmã, Aline, que sempre me apoiou e participou em todos os momentos. Obrigada pelo seu amor e carinho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Maria Lígia Rodrigues Macedo, pela orientação, pelos ensinamentos, e por acreditar em mim e permitir que eu vencesse mais uma etapa da minha vida, engrandecendo o meu desenvolvimento profissional.

Aos professores Dr. Sérgio Marangoni e Dr. José Camillo Novello por terem me recebido em seu laboratório colaborando assim com meu crescimento científico.

Aos professores Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo, Dr. Sérgio Marangoni e Dra. Valdirene Moreira Gomes por participarem da banca examinadora desta tese, valorizando assim meu trabalho.

Aos professores Dr. Sérgio Marangoni, Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck e Dra. Gláucia Coelho de Mello pela participação no exame de qualificação onde puderam apresentar valiosas sugestões e observações importantes para cuidadosa revisão deste trabalho.

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

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali 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.

A toda minha família pelo amor, dedicação e cooperação.

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

ÍNDICE

ABREVIACÕES.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ix
I – INTRODUÇÃO.....	1
1 - Cenário Atual	2
2 - Proteínas Vegetais Tóxicas Envolvidas na Defesa de Plantas	4
3 - Enzimas Digestivas de Insetos	5
4 - Inibidores de Proteinases de Plantas	6
4.1 - Características Gerais dos Inibidores de Proteinases	7
4.2 - Classes de Inibidores de Proteinases	8
5 - Insetos Considerados Pragas de Plantas	10
6 - Morfofisiologia da Digestão de Insetos	12
7 - Inibidores de Proteinases no Mecanismo de Defesa de Plantas contra Insetos	14
8 - Adaptação dos Insetos aos Inibidores de Proteinases	15
II – OBJETIVOS	17
III – MATERIAIS	18
1 - Espécie Vegetal	18
2 – Inseto (<i>Anagasta kuehniella</i>)	20
IV – MÉTODOS	21
1 - Obtenção do Extrato Bruto	21
2 - Purificação do Inibidor	21
2.1 - Cromatografia de Exclusão Molecular em Coluna de Sephadex G-100.....	21
2.2 - Cromatografia de Troca Iônica DEAE-Sepharose	22
2.3 - Cromatografia de Afinidade em Sepharose-Tripsina	22
2.4 - Cromatografia de Troca Iônica Source 15 Q	22
3 – Bioensaio	22
4 - Efeito de PFIT – Sobrevivência, Peso e Índices nutricionais de Larvas de 4º instar	23
5 - Efeito de PFIT no Desenvolvimento de <i>A. kuehniella</i>	24
6 - Obtenção das Enzimas do Fluido Intestinal do Inseto	24
7 - Preparação das Fezes	24
8 - Determinação da Atividade Enzimática do Tipo Tripsina	25
9 - Efeito de PFIT na Atividade Proteolítica Endógena	25
10 - Análise Eletroforética das Enzimas das Larvas de 4º instar de <i>A. kuehniella</i>	25
11 - Análise Estatística	26
V – RESULTADOS	27
1 - Efeito de PFIT na Sobrevivência e Peso das Larvas de 4º instar de <i>Anagasta kuehniella</i>	27
2 - Análises do Consumo e Utilização de Alimento	30
3 - Determinação da Atividade Triptica	33
4 - Determinação da Atividade Antitriptica	35
5 - Atividade de Proteinases em SDS-PAGE na Presença de Gelatina 0,1%	36
6 - Efeito de PFIT no Desenvolvimento de <i>A. kuehniella</i>	37
VI – DISCUSSÃO.....	44
VII - CONCLUSÕES	48
VIII- REFERÊNCIAS.....	49

ABREVIATÓES

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

RESUMO

Inibidores de proteinases (IPs) são amplamente distribuídos em animais, microorganismos e plantas. IPs de plantas são geralmente proteínas pequenas que tem sido principalmente descritas como ocorrendo em órgãos de reserva, tais como sementes e tubérculos, mas eles também foram encontrados nas partes aéreas da planta, nas folhas, flores e raízes. O possível papel sugerido para inibidores de proteinase de sementes inclui a função como parte do sistema defensivo da planta contra pragas via inibição de suas enzimas proteolíticas. A atividade dos IPs é devido a sua capacidade de formar complexos estáveis com as proteases alvos, bloqueando, alterando ou prevenindo o acesso ao sítio ativo da enzima. Lepidoptera são insetos que frequentemente atacam uma ampla variedade de culturas, causando alto dano econômico. *A. kuehniella* é encontrada mundialmente, este inseto ataca grão estocados e produtos de arroz, aveia, centeio, milho e trigo. Neste trabalho, um inibidor purificado das sementes de *Plathymenia foliolosa* (Mimosoideae) – PFIT foi utilizado em dietas artificiais, e através de bioensaios seu potencial tóxico contra *A. kuehniella* foi determinado. A ingestão de PFIT resultou em uma redução significativa na sobrevivência e no peso larval (32,3% e 66,1% respectivamente) e também reduziu a viabilidade larval e o peso das pupas (35,7% e 9,1% respectivamente). Os resultados dos experimentos nutricionais realizados com larvas de *A. kuehniella* apresentaram uma redução na eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e alimento digerido (ECD), e um aumento na digestibilidade aproximada (AD) e no CM (custo metabólico). Para examinar o efeito da proteína sobre o inseto, a atividade das proteinases intestinais das larvas que se alimentaram em dietas livres do inibidor e alimentadas em dieta contendo o inibidor a 0,7% foi comparada através de ensaios enzimáticos e eletroforese em géis de atividade enzimática. As larvas de quarto instar alimentadas em dieta contendo PFIT apresentaram uma diminuição na atividade trípica do intestino e um aumento na atividade trípica das fezes, confirmado por ensaios enzimáticos e na eletroforese de atividade. Além disso, a atividade trípica das larvas que se alimentaram em dieta com PFIT foi sensível à inibição por PFIT. Estes resultados sugerem que PFIT possui efeitos anti-metabólicos quando ingeridos por *A. kuehniella*.

ABSTRACT

Proteinase inhibitors (PIs) are widely distributed in animals, microorganisms, and plants. Plant PIs are generally small proteins that have mainly been described as occurring in storage tissues, such as tubers and seeds, but they have also been found in the aerial parts of plants, in the leaves, flowers and roots. The possible roles suggested for seed proteinase inhibitors include the function as a part of the plant defensive system against pest via inhibition of their proteolytic enzymes. The activity of PIs is due to their capacity to form stable complexes with target proteases, blocking, altering or preventing access to the enzyme active site. Lepidoptera are often insects which attack a wide range of crops, causing damage high economic value. *A. kuehniella* is found worldwide, this insect attacks stored grains, and products of rice, oat, rye, corn and wheat. In this report, the pure inhibitor from seeds of *Plathymenia foliolosa* (Mimosoideae) – PFTI was monitoring by an insect bioassay its toxic activity toward *A. kuehniella*. The chronic ingestion of PFTI did result in a significant reduction in larval survival and weight (32.3% and 66.1% respectively) and also reduced the larval viability and the weight of pupae (35.7% and 9.1% respectively). The results from nutritional experiments realized with *A. kuehniella* larvae presented a reduction in efficiency of conversion of ingested food (ECI) and digested food (ECD), and an increase in approximate digestibility (AD) and CM (metabolic cost). To examine the protein effects on insect, the midgut proteinases of *A. kuehniella* larvae reared on artificial PI-free diet and on a diet containing PFTI at 0.7% were compared by using enzymatic assays and polyacrilamide gel electrophoresis. The fourth instar larvae reared on a diet containing PFTI showed a decrease in tryptic activity of gut and increase in tryptic activity of faeces, as confirmed by BApNA as substrate and by activity in gels. In addition, the tryptic activity in PFTI-fed larvae was sensitive to PFTI. These results suggest that PFTI have a potential antimetabolic effect when ingested by *A. kuehniella*.

I – INTRODUÇÃO

Com um aumento calculado da população mundial de 10 bilhões de pessoas para as próximas quatro décadas, uma prioridade imediata na agricultura é atingir a produção máxima de grãos e de outros produtos seguindo o conceito do manejo sustentável. Estima-se que há perdas de 10 a 20% nas principais produções agrícolas devido à presença de insetos herbívoros, o que é um fator significativo na limitação da produção de alimento (FERRY *et al.*, 2004).

Anagasta kuehniella (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), conhecida como traça-de-farinha, destaca-se como um dos principais predadores de produtos armazenados, tais como milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativum*) e amendoim (*Arachis hypogea*). Porém mostra uma preferência alimentar para farinhas, farelos e outros produtos deixando-os, na maioria das vezes, imprestáveis para o consumo, além de atacar lavouras nos campos (GALLO *et al.*, 2002).

O reconhecimento de que as plantas utilizam substâncias químicas para se defenderem das agressões dos insetos estimulou o interesse nos estudos das interações entre plantas e insetos. Em muitos casos, os estudos enfatizam a importância de entender os efeitos antimetabólicos dos inibidores de proteinases sobre os insetos e as formas pelas quais esses podem se adaptar. Atualmente o interesse em estratégias alternativas para controlar as pragas agrícolas tem crescido consideravelmente em resposta aos problemas de saúde pública e dos ambientes causados pelo uso de agrotóxicos na proteção do rendimento agrícola (CAPALBO *et al.*, 2003).

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. As proteínas de plantas mais conhecidas supostamente envolvidas no mecanismo de defesa de plantas contra insetos 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)

Os inibidores de proteinases são um grupo de proteínas que funcionam como substratos específicos das proteases digestivas, formando um complexo estável na qual a proteólise é limitada e extremamente lenta. A especificidade e eficiência dos inibidores são determinadas pela ligação entre o sítio ativo da proteinase e o sítio reativo do inibidor, principal responsável pela especificidade inibitória, causando a inibição competitiva de todas suas funções catalíticas (TIFFIN & GAUT, 2001).

1 - Cenário Atual

São calculadas perdas na colheita mundial sem o uso de pesticidas e de outras estratégias de controles não-químicas em cerca de 70% da produção mundial, chegando a 400 bilhões de dólares. As perdas da pré-colheita devido à ação de insetos, apesar da utilização de inseticidas, são estimadas em 15% da produção total representando o valor de 100 bilhões de dólares. O custo anual do controle de insetos equivale a 8 bilhões de dólares, justificando assim medidas econômicas e urgentes de controle (LAWRENCE & KOUNDAL, 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. Por todo o mundo mais de 200 doenças de plantas conhecidas são transmitidas por insetos, ratos e nematóides (HAQ *et al.*, 2004).

Atualmente os métodos de controle de insetos concentram-se basicamente na utilização de agrotóxicos, sendo gasto mundialmente 10 bilhões a cada ano no manejo e controle químico de insetos (BABU *et al.*, 2003). Os inseticidas são compostos químicos ou biológicos que podem ter ação fisiológica sobre os organismos vivos. A excessiva liberação dos pesticidas químicos pode não ser viável, podendo promover benefícios passageiros no controle dos organismos alvos, efeitos sobre organismo não alvo, entre estes o envenenamento de insetos polinizadores e de espécies predadoras que naturalmente controlam as populações de pragas agrícolas, levando a erupção da própria praga contra a qual os agentes foram empregados (BARRETT *et al.*, 1994).

Esses fatos justificam a necessidade de pesquisas e desenvolvimento de abordagens alternativas para esse problema. Segundo LAWRENCE & KOUNDAL (2002), a busca pelo desenvolvimento de técnicas favoráveis ambientalmente torna-se a solução para diminuir, além dos gastos em energia, a utilização de produtos químicos, e

portanto a produção de materiais prejudiciais, tais como os resíduos de pesticidas deixariam de ocorrer. Sendo assim, um programa de manejo integrado proporcionaria a melhor opção, pois ele seria baseado na combinação de práticas onde ocorra o uso criterioso de pesticidas, rotação de culturas, medidas sanitárias no campo e acima de tudo a exploração de variedades de plantas resistentes.

O controle genético ou o uso de plantas transgênicas poderia trazer uma contribuição significativa para a agricultura sustentável além de ser um importante componente do programa de manejo integrado (HAQ *et al.*, 2004; FERRY *et al.*, 2004). A engenharia genética de plantas trabalha para que um gene responsável por uma determinada característica, que foi identificado, isolado e seqüenciado, seja clonado e expresso, tornando possível o melhoramento de plantas através da transformação genética (HILDER & BOULTER, 1999).

Controle atual conta com o uso de culturas transgênicas contendo *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) (HAQ *et al.*, 2004). Culturas *Bt* têm sido comercializadas em muitos países, mas há preocupação de que a expressão constitutiva dessa proteína inseticida possa levar a uma seleção de resistência entre as populações de insetos (EIZAGUIRRE *et al.*, 2006). Um grupo de proteínas derivadas de plantas mostrou exercer baixa pressão seletiva a insetos pragas em plantas transgênicas, são os inibidores de proteinase (IPs) e o uso dos IPs é considerado uma alternativa viável às endotoxinas *Bt* no controle de insetos pragas (FERRY *et al.*, 2006). IPs são usados para aumentar a resistência a insetos pragas, devido ao seu tamanho pequeno, abundância, estabilidade e alta especificidade a uma classe particular das enzimas digestivas de insetos (USSUF *et al.*, 2001; ABDEEN *et al.*, 2005).

Inibidores de proteinases (IPs) são proteínas relacionadas ao sistema de defesa natural da planta, frequentemente presentes nas sementes e induzidos em certos tecidos da planta por herbívoros (RYAN, 1990; KOIWA, 1997). O provável papel dos inibidores na defesa vegetal foi investigado já em 1947, quando MICKEL E STANDISH observaram que as larvas de certos insetos não eram capazes de se desenvolverem normalmente sobre produtos de soja (HAQ *et al.*, 2004).

2 - Proteínas Vegetais Tóxicas Envolvidas na Defesa de Plantas

Ao observarmos a natureza temos a impressão de que os vegetais são os organismos mais passivos que existem em qualquer ambiente, aquático ou terrestre, pois não se movem, não se comunicam e dependem muitas vezes dos animais, do vento ou da chuva para se reproduzirem e se dispersarem. Esta imagem, construída a partir de nossa percepção visual, esconde uma riqueza de fatos extremamente dinâmicos. Entre eles, observam-se importantes mecanismos de defesas, que tem suficientemente defendido-lhes da diversidade de ameaças dos seus potenciais herbívoros (CURSINO-SANTOS *et al.*, 2003).

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

Inibidores de proteinases são de ocorrência muito comum, eles têm sido isolados e caracterizados de um grande número de organismos, incluindo animais, microorganismos e plantas (VALUEVA & MOSOLOV, 2004; CHRISTELLER, 2005; HAQ *et al.*, 2004; SUPURAN *et al.*, 2002; MOSOLOV & VALUEVA, 2005; MOSOLOV *et al.*, 2001), onde são encontrados inibidores para quase todos os tipos de enzimas proteolíticas (FAN & WU, 2005; SAMPAIO *et al.*, 1996). Os inibidores concentram-se principalmente nos órgãos de reserva, tais como sementes e tubérculos, mas já foram detectados nas partes aéreas da planta (DE LEO *et al.*, 2002). Um número crescente de IPs também é encontrado em tecidos que não são de reserva, tais como folhas, flores e raízes (BRZIN & KIDRIC, 1995; XU *et al.*, 2001; SIN & CHYE, 2004).

Além dos inibidores, lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), glicohidrolases, arcelinas, quitinases, canatoxina e formas modificadas de proteínas de reserva, tais como as vicilinas também estão envolvidas no complexo mecanismo de defesa vegetal contra insetos (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

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). Dessa forma é possível desenvolver estratégias de controle mais eficientes e que dificultem o aparecimento de resistências.

3 - Enzimas Digestivas de Insetos

A busca do possível alvo na fisiologia de insetos que poderia ser usado como estratégia de controle foi um importante avanço na década de 1970. Um estudo de GATEHOUSE *et al.* (1979) sugerindo que inibidores de tripsina estariam envolvidos na resistência de um cultivar de *Vigna unguiculata* ao ataque de *Callosobruchus maculatus*, estimulou outros pesquisadores a procurar entender as proteinases digestivas dos insetos (SILVA *et al.*, 1999).

As enzimas digestivas dos insetos são conhecidas como hidrolases e classificadas de acordo com o substrato que degradam. As proteinases digestivas catalisam a quebra de proteínas ingeridas através do processo de hidrólise, garantindo assim o melhor aproveitamento e a absorção dessas macromoléculas na forma de peptídeos e aminoácidos, que serão destinados para muitos outros eventos fisiológicos. Essas enzimas são amplamente distribuídas em quase todas as plantas, animais e microorganismos (JOANITTI *et al.*, 2006; NEURATH, 1989; VALUEVA & MOSOLOV, 2004; CHRISTELLER, 2005; HAQ *et al.*, 2004; SUPURAN *et al.*, 2002; MOSOLOV & VALUEVA, 2005; MOSOLOV *et al.*, 2001; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002; RYAN, 1990). Nos insetos são encontradas abundantemente na região do intestino médio; e estão subdivididas em endopeptidases, que clivam ligações peptídicas internas e exopeptidases que removem aminoácidos da região C-terminal ou N-terminal (FAN & WU, 2005; JONGSMA & BOLTER, 1997). As endopeptidases são conhecidas também por proteinases.

Proteinases são divididas em subclasses com base no mecanismo catalítico: serino, cisteíno, aspartato e metalo-proteinases. (TERRA & FERREIRA, 1994; FAN & WU, 2005). As duas principais classes de proteinases no sistema digestivo de insetos fitófagos são as serino e cisteíno proteinases. A maioria dos Lepidópteros possui as serinoproteinases como as principais enzimas digestivas, enquanto que os Coleópteros possuem principalmente cisteínoproteinases (HAQ *et al.*, 2004).

Serinoproteinases:

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

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

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

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

A especificidade das tripsinas de insetos contrasta, em algumas características, com as mesmas dos vertebrados (LEMOES & 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.

4 - Inibidores de Proteinases de Plantas

Os inibidores de proteinases são uma classe de substâncias, naturalmente produzidas pelas plantas e estão intimamente relacionados à sua defesa. A diversidade das famílias de espécies vegetais onde os inibidores ocorrem é muito ampla (VALUEVA *et al.*, 1997). São encontrados em praticamente todos os grupos vegetais. Sabe-se que as angiospermas dicotiledôneas englobam o maior número de espécies contendo estas macromoléculas, merecendo destaque as famílias Leguminosae e Solanaceae; enquanto que entre as monocotiledôneas, os inibidores estão mais amplamente distribuídos na família Gramineae (RYAN, 1981). Apesar desta ocorrência generalizada, a quantidade de inibidores é extremamente variável, mesmo entre espécies do mesmo gênero, e até mesmo entre variedades de uma mesma espécie (XAVIER-

FILHO *et al.*, 1989). Entretanto, a presença de inibidores vegetais destaca-se principalmente em sementes de leguminosas onde são encontrados em altas concentrações (XAVIER-FILHO, 1992; MACEDO *et al.*, 2000).

Os inibidores de proteinases de plantas desempenham várias funções importantes, principalmente na defesa contra ataque dos herbívoros, que dependem das proteinases para digerir as proteínas que consomem (TIFFIN & GAUT, 2001) e também limitam severamente as infecções causadas por patógenos. Os inibidores de proteinases podem também estar envolvidos na regulação das proteinases da própria planta, dentre as quais relacionadas ao processo de germinação, dormência das sementes e reserva de aminoácidos sulfurados (BAEK *et al.*, 1994; TIFFIN & GAUT, 2001).

A capacidade defensiva dos IPs conta com a inibição das proteinases presentes no intestino dos insetos, causando uma redução na disponibilidade de aminoácidos necessários ao seu crescimento e desenvolvimento (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002). Testes de incorporação desses inibidores em dieta artificial e estudos de inibição *in vitro* com proteinases digestivas de insetos revelaram seu potencial em interferir no desenvolvimento larval de insetos (MACEDO *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2004).

BLANCO-LABRA *et al.* (1995) demonstraram que um inibidor de tripsina de milho de 12 kDa é capaz de diminuir a atividade enzimática de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*. Essas duas espécies de fungos, principalmente a segunda, causam sérios problemas durante a armazenagem de diferentes tipos de gramíneas. Os resultados sugerem a possibilidade da utilização destes inibidores contra o ataque de microorganismos fitopatogênicos.

4.1 - Características Gerais dos Inibidores de Proteinases

Os inibidores protéicos são moléculas, geralmente, de baixa massa molecular, sendo a classificação 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 (MACEDO & XAVIER-FILHO, 1993).

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, apresentam-se na forma polimérica, associados em dímeros ou tetrâmeros, cujos monômeros possuem uma massa molecular mínima de aproximadamente 10 kDa (RICHARDSON, 1991; BLANCO-LABRA *et al.*, 1995).

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 são agrupados segundo as proteinases que inibem, podemos encontrar os inibidores das serinoproteinases (quimotripsina, tripsina, elastase, calicreína e subtilisina), cisteinoproteinases (papaína, catepsina B e actinidina), asparticoproteinases (pepsina e catepsina D) e metaloproteinases (carboxipeptidase A e B e termolisina). Entre estes, os inibidores mais estudados e caracterizados são os inibidores que inibem as enzimas do tipo serinoproteinases. Eles são encontrados em alta concentração em sementes de leguminosas e têm sido bastante estudados e suas estruturas determinadas de várias espécies de plantas nativas do Brasil (MACEDO *et al.*, 2000; MELLO *et al.*, 2001).

4.2 - Classes de Inibidores de Proteinases

Tendo em base a homologia na estrutura primária, localização das pontes dissulfetos e posição do sítio reativo, os inibidores de serinoproteinases de plantas têm sido agrupados em famílias distintas: Kunitz, Bownan-Birk, Batata I, Batata II, Abóbora, Superfamília Cereal, Ragi 1-2 e Taumatina-proteínas relacionadas à patogênese (RICHARDSON, 1991). Essas famílias diferem principalmente na massa molecular, conteúdo das ligações dissulfetos, estrutura tridimensional e estabilidade ao calor e a agentes desnaturantes (TELES *et al.*, 2004).

O mecanismo de ação dos inibidores de serinoproteinases ocorre através da interação entre a enzima alvo e a molécula do inibidor, formando um complexo enzima-inibidor muito estável, unido por uma ligação altamente específica (LASKOWSKI & QASIM, 2000). Este contato é restrito a uma pequena porção da molécula do inibidor, denominada de sítio reativo, principal responsável pela especificidade inibitória, que se

liga ao sítio ativo da enzima, causando a inibição competitiva de todas suas funções catalíticas (RYAN, 1981). Os inibidores são classificados de acordo com o tipo de enzima(s) que inibem (RYAN, 1990; BODE & HUBER, 2000).

Inibidores de serinoproteínase 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). Inibidores de serinoproteínases são muito difundidos no reino vegetal, seus papéis fisiológicos incluindo a regulação de proteínases endógenas durante a dormência das sementes, a mobilização de proteínas de reserva e a proteção contra enzimas proteolíticas de parasitas e insetos (HAQ *et al.*, 2004).

As duas famílias de inibidores serinoproteínases 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 (BIRK *et al.*, 1994).

Inibidores de cisteinoproteínase: 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 proteínases em seu sistema digestivo (HAQ *et al.*, 2004).

Inibidores de asparticoproteínases são relativamente menos estudados, isso é parcialmente devido a sua rara ocorrência. Túberos de batata possuem um inibidor de asparticoproteínase, 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 asparticoproteinase bem caracterizada de origem protéica.

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

5 - Insetos Considerados Pragas de Plantas

O número de espécies de insetos descritas é estimado em aproximadamente um milhão, dos quais cerca de 10% são pragas. E os danos causados pelos insetos fitófagos às plantas são variáveis, podendo ser observados em todos os órgãos vegetais. Dependendo da espécie e da densidade populacional da praga, do estágio de desenvolvimento e estrutura vegetal atacada e da duração do ataque, poderá haver maior ou menor prejuízo quantitativo e qualitativo (GALLO *et al.*, 2002).

Em termos mundiais, os prejuízos causados por pragas e doenças são bastante elevados e juntamente com as plantas daninhas, chegam a causar perdas da ordem de 38%, sendo os insetos responsáveis por uma taxa de perda de 13% (JOUANIN *et al.*, 1998). Além dos insetos serem considerados os maiores causadores das perdas massivas na produção, eles podem agir de forma indireta, pois existe a possibilidade de atuarem como vetores de vários outros microorganismos fitopatógenos, como por exemplo, fungos, agravando assim a perda da produção (HILDER & BOULTER, 1999).

Os insetos que se alimentam de plantas podem ser classificados em herbívoros generalistas e especialistas (BERNAYS & CHAPMAN, 1994). Os insetos herbívoros generalistas se alimentam de uma ampla variedade de espécies de plantas e seus mecanismos adaptativos são mais complexos, pois tendem responder a uma série de diferentes substâncias químicas e proteínas de plantas. No outro lado, espécies de insetos herbívoros especialistas que hospedam somente poucas espécies de plantas relacionadas podem apresentar uma eficiente forma de adaptação à planta hospedeira, envolvendo a produção de grandes quantidades de enzimas para desintoxicação de seus alimentos ou evoluem mecanismos de reservas de toxinas da planta hospedeira (PRICE, 1997; PATANKAR *et al.* 2001).

Insetos pertencentes às ordens Coleoptera e Lepidoptera representam os principais responsáveis pelos danos causados no campo e no armazenamento de culturas de importância sócio-econômica. Os coleópteros da família Bruchidae são de maior importância em relação à infestação de feijões, sendo mencionadas as principais espécies predadoras dos grãos estocados: *Acanthoscelides clandestinus* (Most), *Zabrotes subfasciatus* (Borh) e *Callosobruchus maculatus* (Fabr) (SINGH *et al.*, 1985). Esta última representa a principal praga de *V. unguiculata* durante o seu armazenamento (SALES *et al.*, 1992; MACEDO *et al.*, 1993; FERNANDES *et al.*, 1993). HALL *et al.* (1997) revelaram que este inseto, conhecido como gorgulho ou caruncho do feijão-de-corda, freqüentemente danifica de 50 a 100% das sementes estocadas num período de 3 a 6 meses, em condições de infestações severas. A infestação dos grãos ocorre com maior intensidade em climas quentes e áreas tropicais, onde os problemas começam no campo.

Em relação aos lepidópteros podemos citar alguns exemplos de espécies que afetam culturas importantes. Esta ordem agrupa as mariposas e borboletas, cujos adultos não podem consumir materiais sólidos, sendo os danos causados pelas larvas, que possuem aparato mastigador. As larvas das espécies do gênero *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) são consideradas pestes na Ásia, Austrália e nas Américas. Elas causam perdas em muitas culturas importantes tais como de algodão, grão-de-bico, milho, tomate e girassol (VOLPICELLA *et al.*, 2003).

Um outro exemplo é a espécie cosmopolita *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) que é predominante em zona de clima temperado, sendo nativa da Europa. Ela ataca grãos e farinha já processada e armazenada, sendo que poucos produtos vegetais secos e armazenados estão protegidos desta pequena traça voraz. As larvas vivem em cereais moídos, e muitas vezes em produtos já processados como farinhas, fubás, chocolates em pó, biscoitos, doces e rações. Quando presente em moinhos, a farinha aglutinada muitas vezes obstrui o maquinário causando interrupção da moagem e em armazenagem a granel podem cobrir as paredes com teias que podem servir de abrigo para outros insetos (PACHECO & DE PAULA, 1995).

Pertencente a mesma família Pyralidae, a *Corcyra cephalonica* é uma outra espécie com características semelhantes a *A. kuehniella*. Ela é conhecida popularmente como traça do arroz e é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, atacando um

grande número de produtos armazenados como amendoim, sorgo, trigo, arroz, café, cacau, farinhas, frutos secos e algodão (PACHECO & DE PAULA, 1995).

6 - Morfofisiologia da Digestão de Insetos

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

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

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

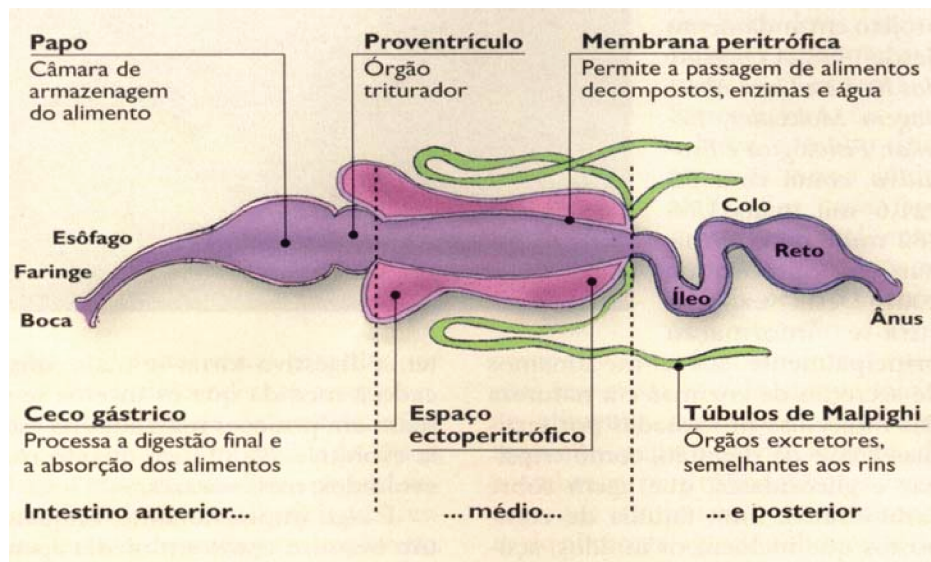


Figura 1. Diagrama geral de intestino de inseto lepidóptero (adaptado de TERRA & FERREIRA, 1994).

Formada de proteínas, glicoproteínas e microfibrilas de quitina numa matriz proteoglicana, a membrana peritrófica separa o alimento do epitélio que reveste o intestino médio. Ela está presente em muitos insetos, mas não em todos e sua formação, geralmente é devida à distensão do intestino causada pela ingestão de alimento (LEHANE, 1997).

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

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

A compartimentalização das enzimas é outra propriedade importante. Aquelas envolvidas na digestão inicial são encontradas no espaço endoperitrófico o qual é envolvido pela membrana peritrófica, cuja capacidade em compartimentalizar as enzimas digestivas depende de sua permeabilidade (TERRA & FERREIRA, 1994). Portanto, a integridade desta membrana quando afetada pode interferir no processo de

digestão e absorção de nutrientes e, conseqüentemente, causar danos no desenvolvimento do inseto (SHEWRY & LUCAS, 1997; HABIBI *et al.*, 2000; PAES *et al.*, 2000).

7 - Inibidores de Proteinases no Mecanismo de Defesa de Plantas contra Insetos

Inibidores de proteinases de plantas fazem parte do sistema de defesa natural das plantas contra o ataque de insetos (LARRY & RICHARD, 2002). Reduzem a atividade proteolítica de enzimas digestivas de um grande número de insetos pragas de importância econômica (CHRISTELLER & SHAW, 1989; WOLFSON & MURDOCK, 1995).

O acúmulo de inibidores de serinoproteinases 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.

Estudos foram feitos para comprovar que o crescimento de algumas espécies de insetos é significativamente reduzido pela ingestão crônica destes inibidores incorporados em dietas artificiais. Um inibidor de tripsina de sementes de *Adenantha pavonina* quando incorporado em dieta artificial a 0,5% e oferecido a *Callosobruchus maculatus* causou diminuição de 40% no peso e reduziu em 50% a sobrevivência larval. (MACEDO *et al.* 2004). POMPERMAYER *et al.* (2001), demonstraram que *D. saccharalis* teve seu desenvolvimento larval retardado, aumento na longevidade e número de ínstar, como também diminuição na longevidade das fêmeas quando alimentados com dieta artificial contendo inibidor de tripsina de soja.

A identificação das proteínas responsáveis pela defesa vegetal e a utilização de seus genes para criar plantas resistentes são a chave no melhoramento vegetal e no aumento da produção agrícola (HAQ *et al.*, 2004; FERRY *et al.*, 2004; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002). Na produção de plantas resistentes a insetos, a partir de proteínas vegetais, duas grandes classes são utilizadas para conferir esta resistência: lectinas e

inibidores de enzimas digestivas. Grande parte dessas pesquisas concentra-se na expressão de inibidores de proteinases em plantas transgênicas (SCHULER *et al.* 1998; JONGSMA & BOULTER, 1997).

A primeira transferência de gene bem sucedida para outra espécie vegetal, foi realizada em 1987, por HILDER *et al.* O gene, isolado de feijão-de-corda (*V. unguiculata*), codifica um inibidor de tripsina, o CpTI, que quando incorporado no tabaco (*Nicotiana tabacum*) produziu uma espécie transgênica resistente a *Manduca sexta*, um inseto pertencente à ordem Lepidoptera.

Em 1997, YEH *et al.* produziram plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) resistentes a *Spodoptera litura*, um lepidóptero predador das folhas desta espécie. As plantas foram modificadas com a introdução do gene TI, que codifica um inibidor de tripsina presente em *Ipomoea batatas*, a batata-doce. FALCO & SILVA (2003) produziram plantas transgênicas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) expressando ambos inibidores de soja Bowman Birk e Kunitz e puderam verificar que o crescimento das larvas neonatas de *Diatraea saccharalis* que se alimentaram das folhas transformadas foi significativamente retardado em comparação às larvas que se alimentaram de folhas de planta não transformada.

Atuais pesquisas têm proposto a utilização de múltiplos inibidores com a finalidade de agir contra todas as proteinases intestinais. Esta combinação aumentaria a estabilidade destes no intestino, prevenindo a degradação pelas proteinases presentes, e às vezes prejudicando a digestão de proteínas ingeridas na dieta (HARSULKAR *et al.*, 1999). Assim, a combinação de inibidores que atuam sobre diferentes tipos de proteinases ou a associação de inibidores de proteinases com outros genes de resistência são estratégias que merecem ser pesquisadas e exploradas (JOUANIN *et al.*, 1998; DE LEO *et al.*, 2001).

8 - Adaptação dos Insetos aos Inibidores de Proteinases

Os insetos podem se adaptar à presença de inibidores de proteinases por três diferentes mecanismos. O primeiro mecanismo consiste em um aumento da expressão da enzima inibida. BROADWAY & DUFFEY (1986) mostraram que não há redução da atividade proteolítica das enzimas digestivas de *Spodoptera exigua* e *Heliothis zea*, o que ocorre é a superprodução da enzima sensível ao inibidor de proteinase. Resultados

semelhantes foram obtidos por MCMANUS & BURGESS (1995) e BROADWAY (1997).

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

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

Considerando estas respostas dos insetos, a eficácia de um inibidor contra um determinado inseto está relacionada ao seu nível de expressão na planta, sua atividade em relação às proteinases do inseto e a capacidade do inseto alvo em superar suas ingestões (DE LEO *et al.*, 2001). Por isso, é necessário compreender melhor a interação planta–inseto, o modo de ação dos IPs sobre os insetos e as formas pelas quais eles se adaptam. Além disso, o efeito sobre os inimigos naturais e o monitoramento ambiental, de forma a coletar informações sobre os impactos e o desenvolvimento de pesquisas científicas interdisciplinares.

II – OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo analisar o efeito do inibidor do tipo Kunitz encontrado nas sementes de *Plathymenia foliolosa* sobre o desenvolvimento de *Anagasta kuehniella*, pretendeu-se:

- Incorporar a proteína isolada de sementes de *P. foliolosa* (PFIT) em dietas artificiais e fornecê-las a *A. kuehniella* como única fonte de alimentação;
- 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 digestivo, com intuito de elucidar uma possível resposta do inseto ao inibidor presente na dieta.

III – MATERIAIS

1 - Espécie Vegetal

Sementes de *Plathymenia foliolosa* coletadas na cidade de Campinas, Estado de São Paulo, foram utilizadas para extração do inibidor – PFIT (SILVA *et al.*, 2003).

P. foliolosa, conhecida vulgarmente como “Vinhático”, pertence à família Leguminosae, sub-família Mimosoideae, com ocorrência de Pernambuco ao Rio de Janeiro incluindo Mato Grosso do Sul (LORENZI, 1992). A árvore é bastante ornamental, podendo ser empregada com sucesso no paisagismo. Sua madeira é indicada para a fabricação de móveis, construção civil, etc.

A escolha desta família para o estudo de inibidores de tripsina relaciona-se não só ao fato de outros trabalhos terem demonstrado a riqueza destas proteínas nas sementes de leguminosas, mas também, termos uma ferramenta para o estudo de algum dos diferentes papéis biológicos desempenhados pelos inibidores de plantas.

A família Leguminosae compreende 650 gêneros e aproximadamente 18.000 espécies. Esta família engloba plantas cuja morfologia é bastante variada, desde árvores de grande porte até arbustos, ervas e trepadeiras. A principal característica desta família são frutos que, quando secos, abrem-se por fendas para liberarem as sementes. Entre as leguminosas destacam-se algumas espécies economicamente importantes, promovendo uma ampla variedade de fontes de alimento para o homem (soja, feijão, amendoim, ervilha) e para o gado (alfafa), além de muitas espécies utilizadas em reflorestamento. A família Leguminosae é subdividida em três importantes subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinoideae e Papilionoideae (HEYWOOD, 1971).



Figura 2. *Plathymenia foliolosa*. **A-** Árvore, **B-** ramos e flores, **C-** frutos e sementes e **D-** caule (LORENZI, 1992).

2 – Inseto (*Anagasta kuehniella*)

Entre as diversas famílias pertencentes à ordem Lepidoptera que causam danos à agricultura uma delas é a Pyralidae, muito numerosa e de distribuição mundial, seus integrantes são bastantes pequenos e se comportam de maneira muito diversa, com grande capacidade adaptativa a diferentes ambientes. Dentre as diversas espécies a *Anagasta kuehniella* (Figura 2), conhecida como traça-de-farinha, destaca-se como um dos principais predadores de produtos armazenados, tais como milho, trigo, arroz e amendoim (GALLO *et al.*, 2002).

As lagartas de *A. kuehniella* foram fornecidas pelo Dr. J.R.P. Parra (Laboratório de Biologia dos Insetos da Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, SP) e são mantidas em condições ideais e rigorosamente controladas no Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB) no Centro Universitário de Três Lagoas da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul. Essa colônia foi mantida na temperatura de $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e uma umidade relativa de 65 - 75% e em períodos diários de iluminação de 16 horas, com dieta padrão de gérmen de trigo.

A espécie *A. kuehniella* requer ambiente fechado e de alta temperatura ao longo do ano para obter pleno desenvolvimento. Possui envergadura de asas de 20 a 25 mm e quando larvas chegam a medir 15 a 20 mm. As larvas apresentam coloração branca, às vezes rosada com a parte posterior da cabeça marrom. A pupa mede em torno de 9 mm, em forma de fuso também de cor marrom, alojando-se num casulo. A fêmea deposita cerca de 200 a 300 ovos, mas dependendo da temperatura e umidade, uma fêmea pode depositar até 562 ovos. A temperatura favorável é de 26°C e a temperatura limite para o desenvolvimento deste inseto é de 35°C . Já a umidade relativa ideal é de 70%. O ciclo de vida total dura em torno de 3 a 4 meses. As larvas movem-se rapidamente, alimentando-se e lançando fios de seda, formando teias (GALLO *et al.*, 2002).

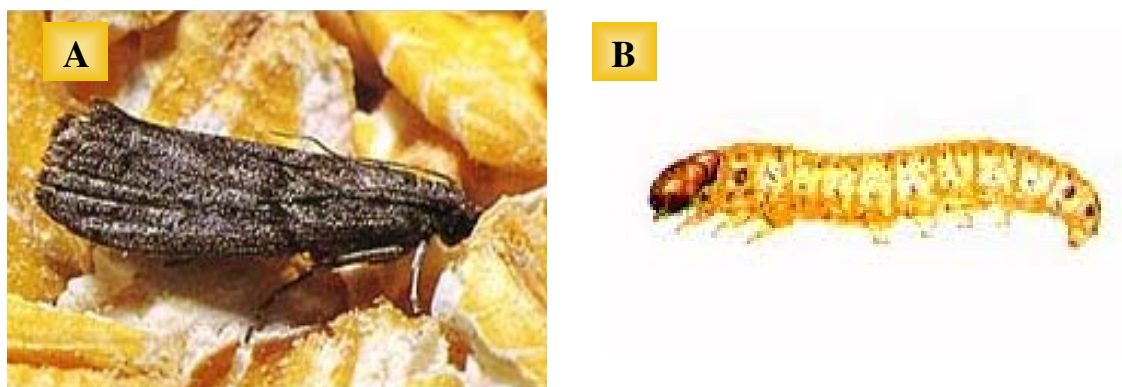


Figura 3. *Anagasta kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae): **A-** Inseto adulto sobre grãos de milho; **B-** larva de 4º instar (Van Waters G. Rogers).

IV – MÉTODOS

1 - Obtenção do Extrato Bruto

Sementes de *Plathymenia foliolosa* sem tegumento foram moídas e peneiradas para se obter uma farinha fina, a qual foi submetida à delipidação com hexano. Após a delipidação a farinha de sementes de *P. foliolosa* foi submetida a uma extração com tampão fosfato 0,1M contendo NaCl 0,1M, pH 7,6, na proporção de 1:20 (p/v), sob agitação constante por 24h a 4°C. Após a homogeneização, o material foi centrifugado a 5.000 x g durante 30 minutos, sobrenadante foi separado e dialisado contra água destilada. Após diálise o material foi liofilizado, obtendo o Extrato Bruto (EB) e estocado a -20°C até o uso posterior.

2 - Purificação do Inibidor

2.1 - Cromatografia de Exclusão Molecular em Coluna de Sephadex G-100

Amostra de 300 mg de E.B. foi aplicada em uma coluna de exclusão molecular Sephadex G-100 (2,0 x 50 cm), a qual estava equilibrada com o tampão fosfato 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 7,6. Foram coletadas frações de 3,0 mL por tubo, num fluxo de 40 mL por hora, efetuando-se a leitura das mesmas em espectrofotômetro, a 280 nm. Em seguida, foi realizado o ensaio antitriptico, utilizando o método de ERLANGER *et al.* (1961).

2.2 - Cromatografia de Troca Iônica DEAE-Sepharose

O pico com atividade antitriptica detectado na Sephadex G-100 após ser dialisado e liofilizado foi aplicado em uma coluna de troca iônica DEAE-Sepharose equilibrada inicialmente com o tampão Tris/HCl 0,05 M, pH 8,0. Utilizando-se um gradiente salino (NaCl de 0 – 1 M) ocorreu a eluição, na qual frações de 3,0 mL foram coletadas (fluxo = 40 mL/h). O perfil cromatográfico foi determinado utilizando-se um comprimento de onda de 280 nm, resultando no segundo pico com atividade denominado de DEAE II.

2.3 - Cromatografia de Afinidade em Sepharose-Tripsina

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 o tampão fosfato de potássio 1M com NaCl 0,3M, pH 7,6 e colocada em coluna de vidro (2 x 15 cm). A fração DEAE II 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 0,3 M em fluxo de 40 mL por hora. A absorbância foi acompanhada em 280nm.

2.4 - Cromatografia de Troca Iônica Source 15 Q

O pico com atividade antitriptica ST-III, detectado na Sepharose tripsina, foi dialisado, liofilizado e aplicado em uma coluna de troca iônica Source 15 Q, equilibrada previamente com o tampão fosfato de sódio 0,02 M, pH 6,8 e eluída com o mesmo tampão acrescido de NaCl 0,5 M. Sendo que o pico com atividade, foi eluído antes do gradiente salino, denominado PFIT, obtendo-se dessa forma a purificação do inibidor (SILVA *et al.*, 2003).

3 – Bioensaio

Para as larvas neonatas foram oferecidas dietas artificiais contendo inibidor na concentração de 0,7% e na ausência do inibidor como tratamento controle. De acordo com estudos anteriores realizados por SILVA *et al.* (2003), 1% de PFIT incorporado em

dietas para *A. kuehniella* causou elevada mortalidade larval, sendo a concentração 0,7% de PFIT a que permitiu termos o número de larvas e sobreviventes necessários. A dieta artificial de *A. kuehniella* foi preparada pela mistura de trigo integral, germe de trigo e farelo de trigo (8:1:1). Os insetos *A. kuehniella* foram mantidos em uma sala de criação em temperatura relativa de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 65 - 75%. Cada tratamento foi composto por 15 repetições contendo 5 lagartas neonatas ($n = 75$).

4 - Efeito de PFIT – 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. Para realização dos estudos de consumo e utilização de alimento, ao fim do período de alimentação necessário para as larvas atingirem o 4º instar, a dieta restante foi retirada do pote plástico e pesada, assim como as fezes depositadas pelas larvas. 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), que 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 – 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 = produtos de excreção

I-F = alimento assimilado

5 - Efeito de PFIT no Desenvolvimento de *A. kuehniella*

Dietas contendo PFIT a 0,7%, bem como dietas sem a presença do inibidor (dieta controle) foram utilizadas, e foram avaliados os seguintes parâmetros: (1) Viabilidade larval, (2) Duração da fase larval, (3) Peso pupal, (4) Viabilidade Pupal, (5) Duração da fase pupal e (6) Duração da fase adulta. Objetivou-se avaliar se a presença do inibidor alteraria o desenvolvimento e viabilidade dos insetos.

6 - Obtenção das Enzimas do Fluido Intestinal do Inseto

Larvas de quarto instar foram imobilizadas em gelo e dissecadas em NaCl 0,15 M. Os intestinos médios obtidos foram homogeneizados e centrifugados a 18.000 g por 30 minutos a 5 °C, os sobrenadantes obtidos (IM) foram imediatamente utilizados como fonte das enzimas para os ensaios enzimáticos, e quando necessário foram armazenados a -20 °C.

7 - Preparação das Fezes

As fezes das larvas de quarto instar alimentadas em dieta controle e dieta contendo PFIT a 0,7% após a separação foram estocadas a – 8 °C. Para utilização nos ensaios, as fezes foram homogeneizadas em tampão Tris 0,1 M pH 8,0 e centrifugadas a 10.000 g por 15 minutos a 5 °C, e os sobrenadantes foram imediatamente utilizados nos ensaios bioquímicos.

8 - 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 (20 μ g de proteína) e fezes (10 μ g de proteína) das larvas alimentadas em dieta controle e dieta contendo PFIT a 0,7% 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/mg proteína. Esse experimento foi realizado em triplicatas com seus apropriados brancos.

9 - Efeito de PFIT na Atividade Proteolítica Endógena

O efeito de PFIT na atividade proteolítica foi determinado para verificar a sensibilidade das larvas ao inibidor após contato com o mesmo nas dietas artificiais e dessa forma inferir se houve uma aclimação do inseto. Esse ensaio foi realizado com tampão Tris 0,1 M pH 8,0 e como substrato BApNA à 1 mM. PFIT (1,3 – 6,5 μ g) foi incubado com as enzimas totais do intestino médio (30 μ g de proteína) 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 trípica residual do IM foi analisada através da hidrólise de BApNA. Esse experimento foi realizado em triplicatas com seus apropriados brancos.

10 - Análise Eletroforética das Enzimas das Larvas de 4º instar de *A. kuehniella*

Eletroforese em PAGE – SDS (12,5%) contendo gelatina 0,1% foi realizada para a análise da atividade enzimática do IM e fezes das larvas de 4º instar alimentadas em dieta artificial controle e com PFIT 0,7%. Para analisar a atividade das enzimas do tipo tripsina, amostras foram pré-incubadas por 30 minutos a 37 °C com um inibidor específico – TLCK (N- α -tosyl-L-lysine choromethyl ketone). 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.

11 - Análise Estatística

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

V – RESULTADOS

1 - Efeito de PFIT na Sobrevivência e Peso das Larvas de 4º instar de *Anagasta kuehniella*

Houve diferenças significativas na sobrevivência das larvas de quarto instar de *A. kuehniella* alimentadas em dietas artificiais. A taxa de sobrevivência das larvas que se desenvolveram em dieta sem a presença do inibidor foi de 82,7% aproximadamente, enquanto que as larvas alimentadas com dietas contendo PFIT 0,7% obtiveram uma taxa de sobrevivência em torno de 56% (Figura 4).

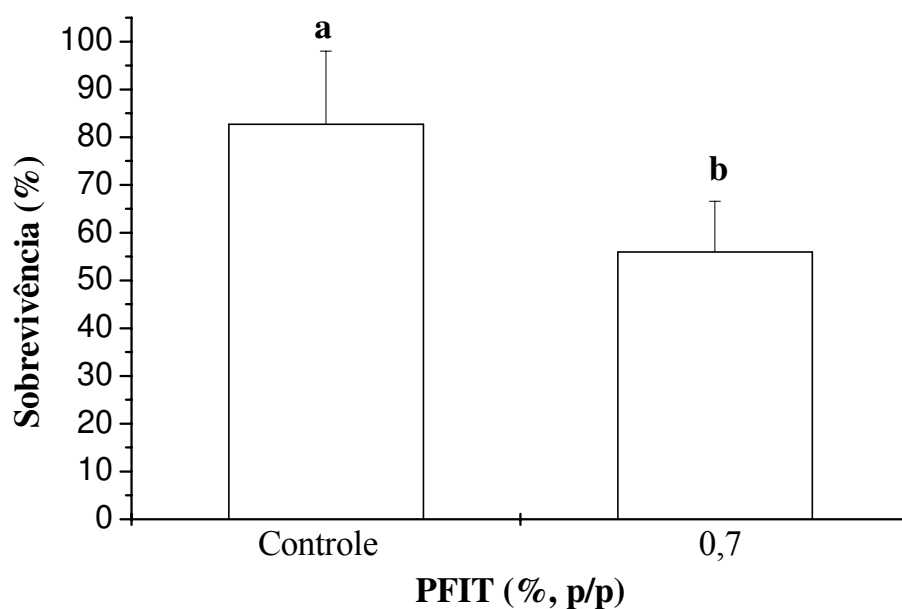


Figura 4. Sobrevivência das larvas de 4º instar de *A. kuehniella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo PFIT 0,7%. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 75$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

Em relação ao peso médio das larvas de quarto instar foram observadas alterações significativas, o peso médio das larvas alimentadas em dieta controle foi de 5 mg e das larvas alimentadas em dieta contendo PFIT a 0,7% foi de 1,7 mg aproximadamente (Figura 5). Figura 6 ilustra o efeito do inibidor na redução do peso médio das larvas de *A. kuehniella*.

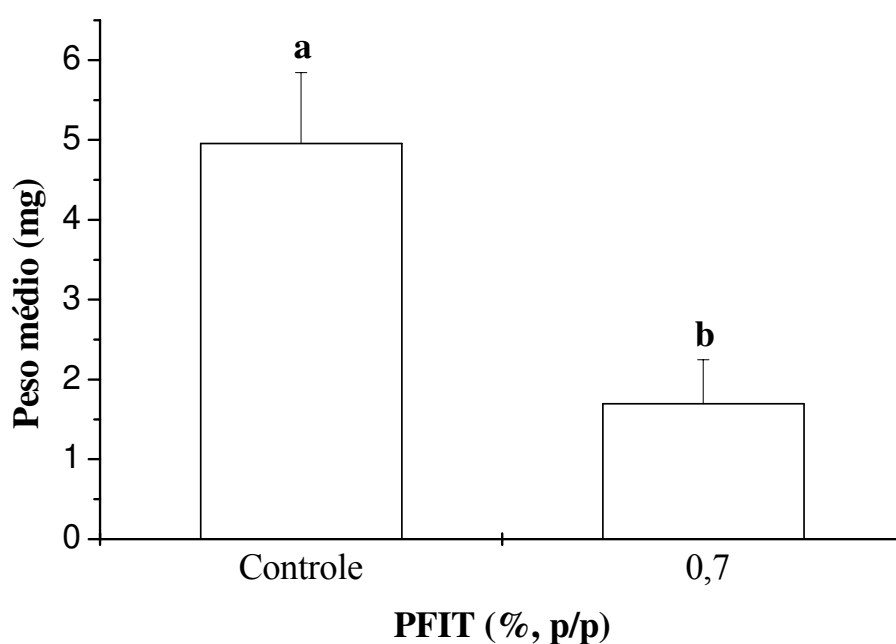


Figura 5. Peso médio das larvas de 4º instar de *A. kuehniella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo PFIT 0,7%. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 75$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

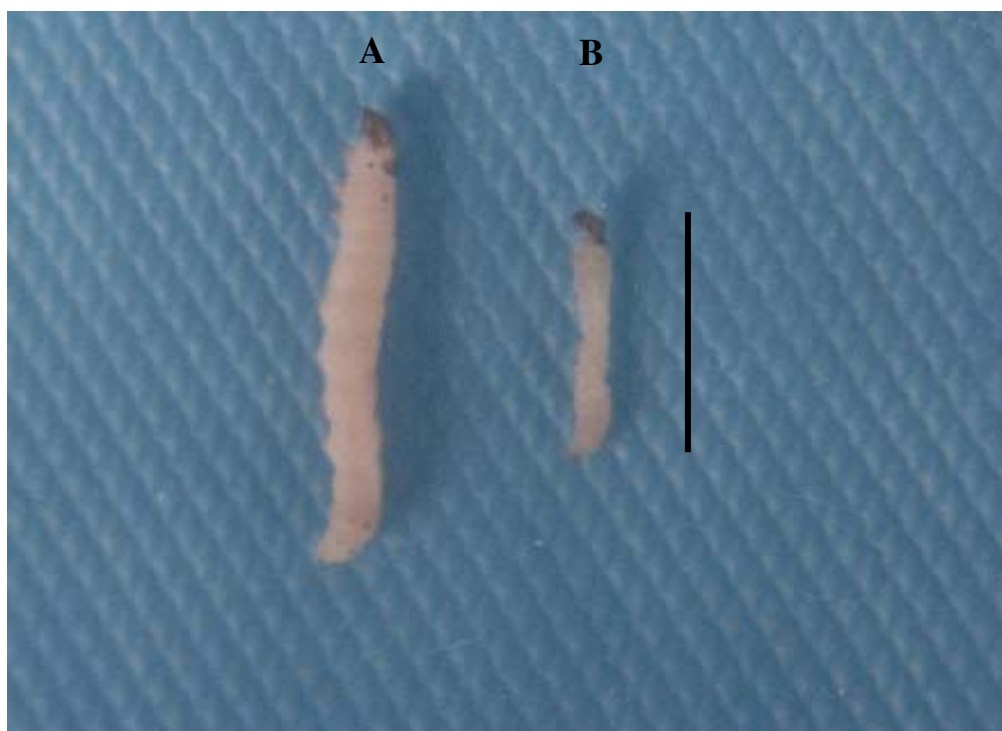


Figura 6. Foto ilustrando o efeito de PFIT no peso larval de *A. kuehniella*. [A] Larva alimentada em dieta controle [B] Larva alimentada em dieta contendo PFIT 0,7%. Barra de 6 cm.

2 - Análises do Consumo e Utilização de Alimento

As figuras 7 e 8 mostram os efeitos de PFIT no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas pelas larvas de *A. kuehniella*. Apesar de PFIT não ter causado efeito significativo no consumo da dieta (Figura 7), a produção de fezes por larva sofreu uma diminuição de 74,6% quando comparada à produção de fezes das larvas alimentadas com dieta controle (Figura 8).

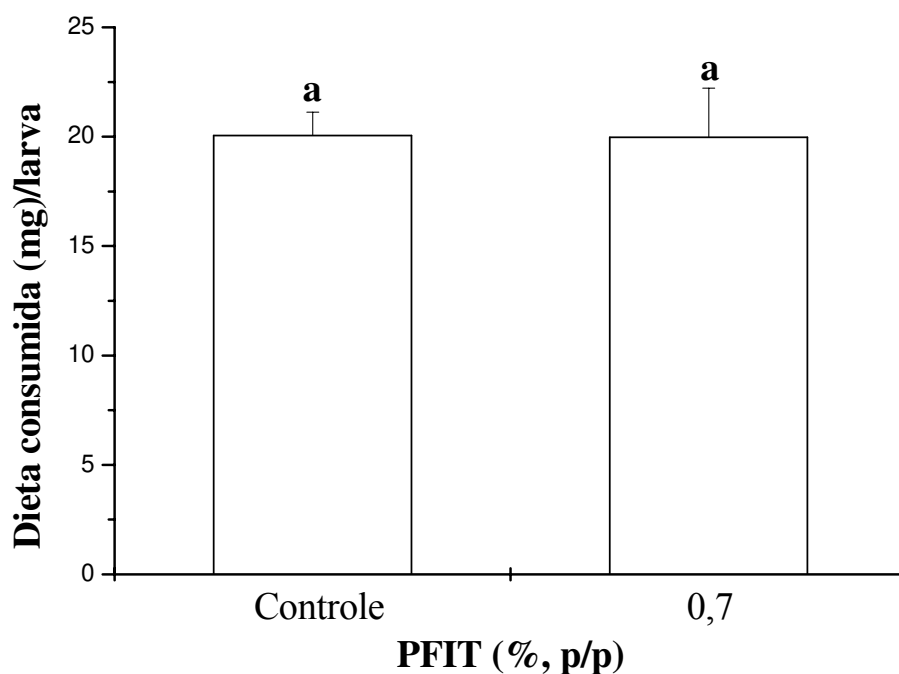


Figura 7. Quantidade de dieta consumida pelas larvas de 4º instar de *A. kuehniella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo PFIT 0,7%. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 75$. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

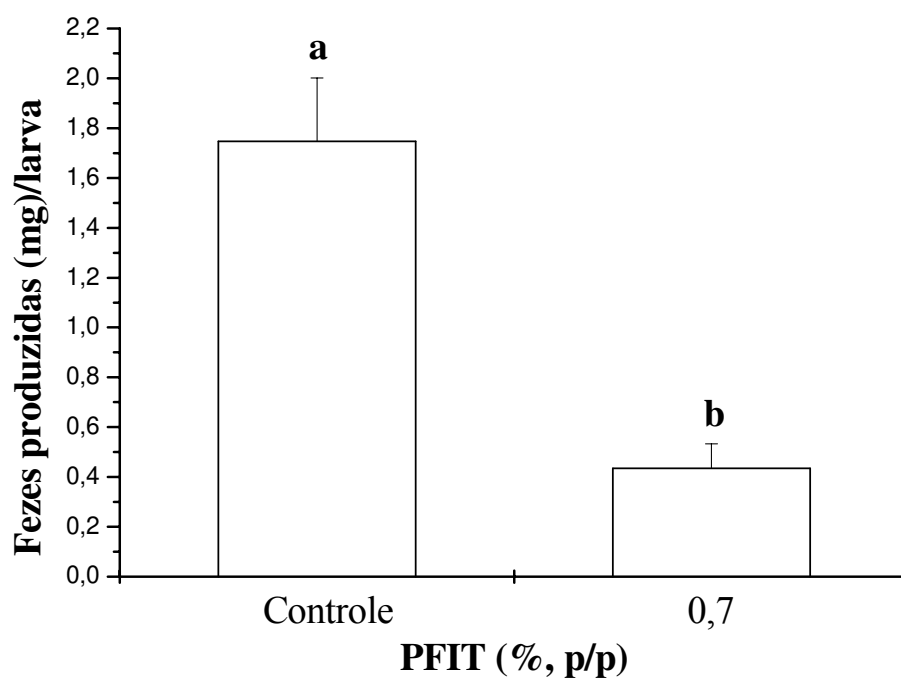


Figura 8. Quantidade de fezes produzidas pelas larvas de 4º instar de *A. kuehniella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo PFIT 0,7%. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 75$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

Os índices nutricionais relacionados na Tabela 1 mostram que as larvas alimentadas com PFIT 0,7% sofrem a influência do inibidor no seu metabolismo quando comparadas às larvas alimentadas em dieta controle.

Tabela 1. Eficiência de Conversão do alimento Ingerido (ECI), Eficiência de Conversão do alimento Digerido (ECD), Custo Metabólico (CM), Digestibilidade Aparente (AD) das larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dietas artificiais contendo PFIT ou na sua ausência. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

Índices nutricionais	Controle	PFIT 0,7%
ECI (%)	25,8 ± 6,0a	10,5 ± 2,4b
ECD (%)	28,7 ± 7,1a	10,9 ± 2,7b
AD (%)	71,3 ± 7,1a	89 ± 2,7b
CM (%)	90,3 ± 2,3a	96,1 ± 1,1b

3 - Determinação da Atividade Trípica

Ensaio enzimático foi realizado para avaliar se houve alterações no perfil enzimático digestivo, já que foi observado um efeito negativo no desenvolvimento larval. Extratos intestinais (20 µg de proteína) e fecais (10 µg de proteína) de larvas de quarto instar de *A. kuehniella* foram utilizados como fonte de enzimas, as quais foram incubadas com BAPNA por 20 minutos. Foi observada uma redução de 78,8% na atividade trípica do fluido do intestino médio das larvas alimentadas em dieta contendo PFIT 0,7% (Figura 9), e um aumento de 44,2% na atividade trípica das fezes quando comparada às lagartas do controle (Figura 10).

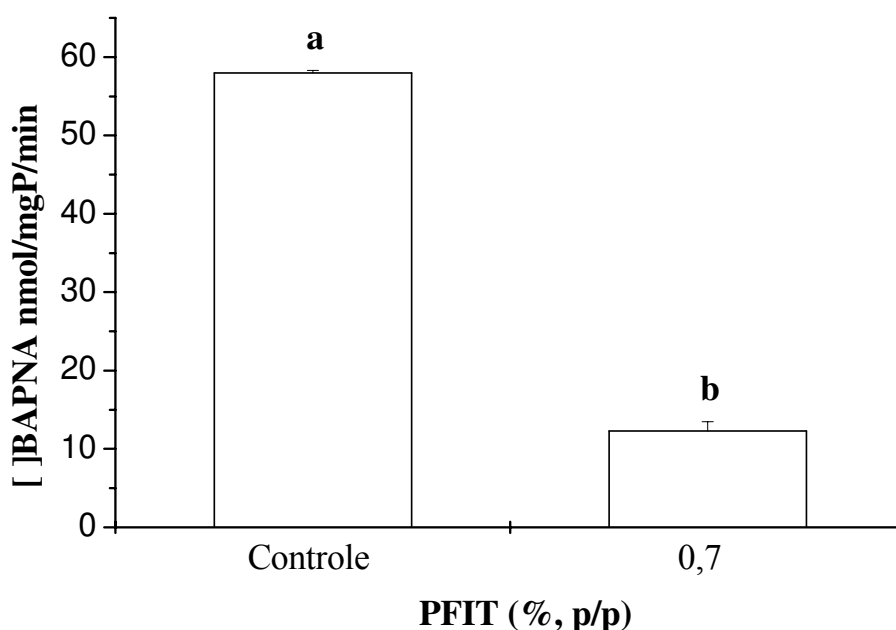


Figura 9. Atividade trípica do intestino médio das larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo PFIT 0,7%. Foram utilizadas triplicatas para cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

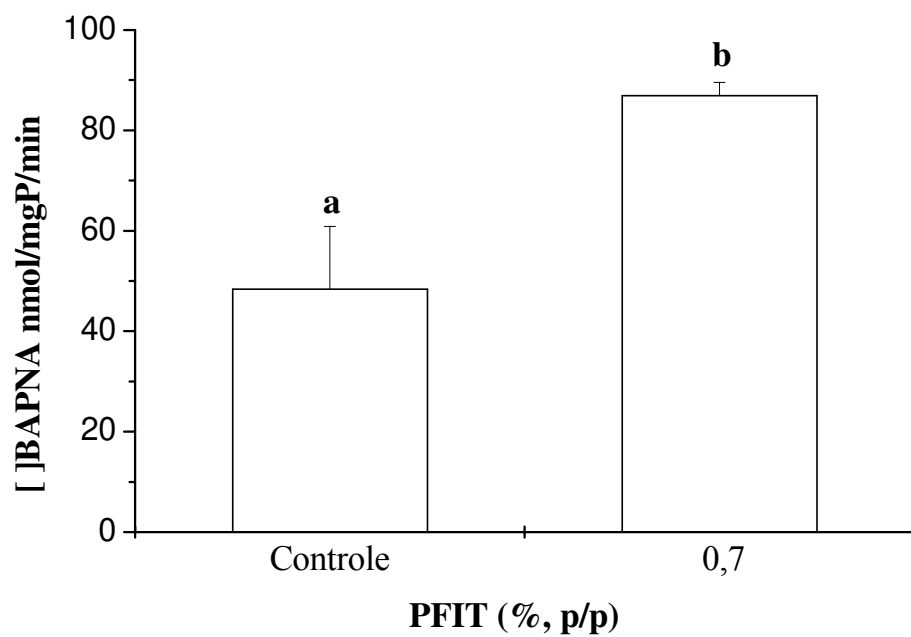


Figura 10. Atividade tríptica das fezes das larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo PFIT 0,7%. Foram utilizadas triplicatas para cada tratamento. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

4 - Determinação da Atividade Antitriptica

Na Figura 11 o fluido intestinal (IM) das larvas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta controle e com dieta contendo inibidor foi incubado com concentrações crescentes de PFIT, e a atividade trípica residual do IM foi analisada através da hidrólise de BApNA. As proteinases dos insetos alimentados com PFIT 0,7% continuam sensíveis à ação do inibidor incubado no ensaio.

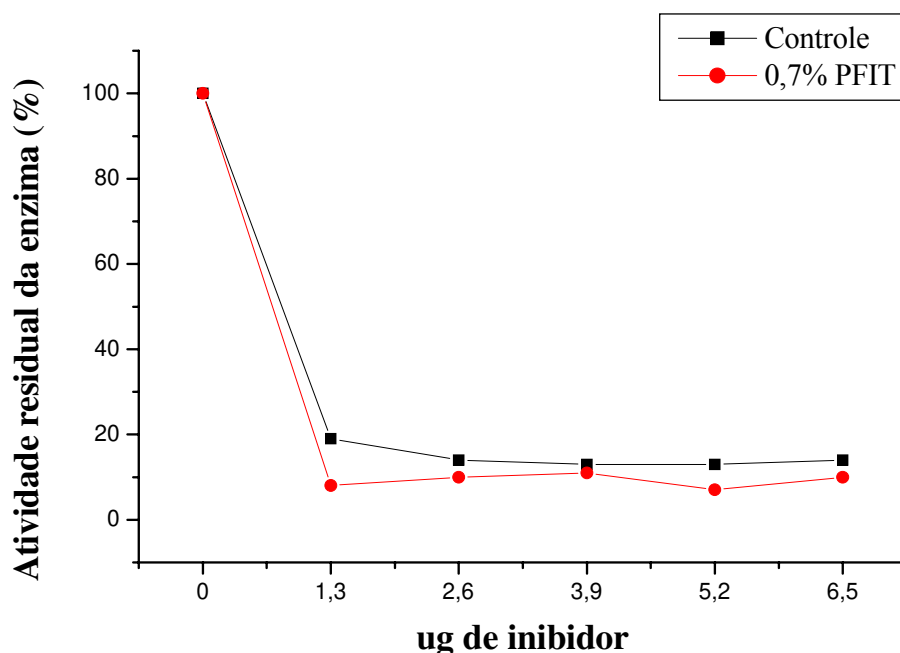


Figura 11. Atividade antitriptica dos insetos alimentados com dieta controle e dieta artificial contendo PFIT 0,7%. Alíquotas dos IMs de larvas foram incubadas com concentrações crescentes de PFIT e a atividade trípica residual foi determinada pela hidrólise do substrato BApNA.

5 - Atividade de Proteinases em SDS-PAGE na Presença de Gelatina 0,1%

Uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gelatina a 0,1% foi realizada com finalidade de verificar a atividade das proteinases presentes no fluido do intestino médio (IM) e das fezes dos insetos de 4º instar que foram alimentados com dieta artificial controle e dieta contendo PFIT 0,7%.

A Figura 12 ilustra a atividade em gelatina das enzimas do tipo tripsina de aproximadamente 22 kDa presentes no IM das larvas alimentadas com dieta controle (linha 1). Quando as larvas foram alimentadas com PFIT 0,7%, a atividade das enzimas presentes no IM sofreu uma redução (linha 2) e a atividade nas fezes sofreu um aumento (linha 6) reforçando o que já foi mostrado nas Figuras 9 e 10. Para melhor visualização da atividade de enzimas do tipo tripsina, TLCK, um inibidor sintético específico para tripsina, foi incubado com as alíquotas do IM e das fezes das larvas alimentadas com o inibidor ou não. As linhas 3, 4, 7 e 8 mostram a ausência de atividade da enzima do tipo tripsina devido à presença de TLCK.

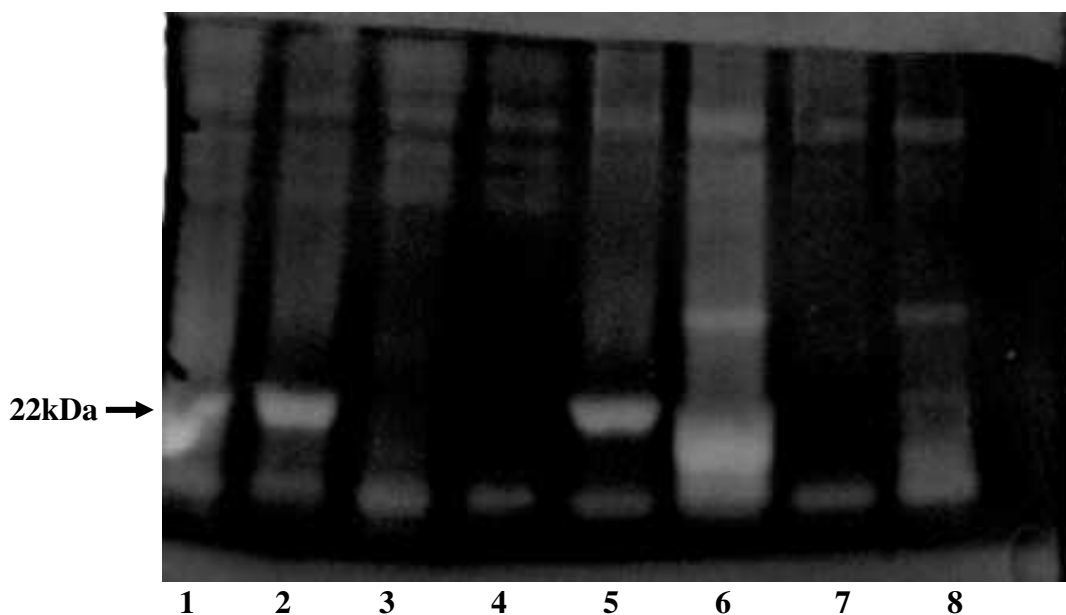


Figura 12. PAGE-SDS (12,5%) com gelatina a 0,1%, do IM e das fezes das larvas de 4º instar. **1:** IM das larvas alimentadas em dieta controle; **2:** IM das larvas alimentadas em dieta contendo PFIT 0,7%; **3:** IM das larvas alimentadas em dieta controle incubado com TLCK; **4:** IM das larvas alimentadas em dieta contendo PFIT 0,7% incubado com TLCK; **5:** fezes das larvas alimentadas em dieta controle; **6:** fezes das larvas alimentadas em dieta contendo PFIT 0,7%; **7:** fezes das larvas alimentadas em dieta controle incubado com TLCK; **8:** fezes das larvas alimentadas em dieta contendo PFIT 0,7% incubado com TLCK.

6 - Efeito de PFIT no Desenvolvimento de *A. kuehniella*

Esses experimentos foram realizados com intuito de avaliar se o inibidor interferia nos estágios de desenvolvimento do inseto. Em relação à viabilidade larval (Figura 13) verificou-se uma redução significativa de 35,7% para as larvas alimentadas com dieta contendo PFIT 0,7%. Com relação ao peso médio das pupas (Figura 16) verificou-se uma redução significativa de 9,1% para as lagartas que foram alimentadas com dieta contendo PFIT 0,7%. A duração da fase larval (Figura 14), pupal (Figura 18) e adulta (Figura 19) mensurada em dias e a taxa de pupação (Figura 15) apresentaram resultados similares entre os tratamentos, indicando que o inibidor não interfere nesses estágios de desenvolvimento do inseto.

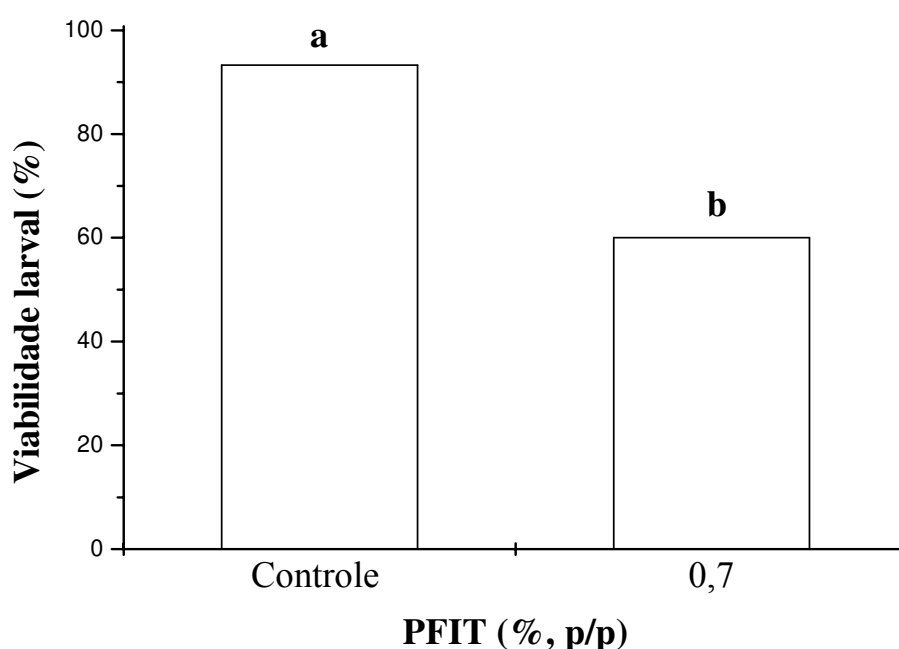


Figura 13. Viabilidade larval de *A. kuehniella* alimentada com dieta controle e dieta artificial contendo PFIT 0,7%. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 75$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

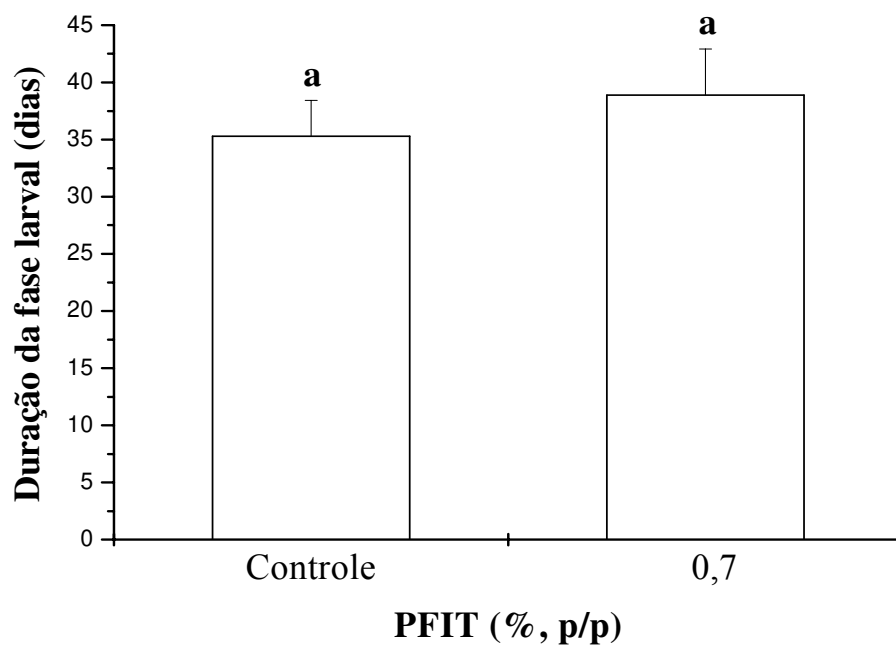


Figura 14. Duração da fase larval de *A. kuehniella* alimentada com dieta controle e dieta artificial contendo PFIT 0,7%. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 75$. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

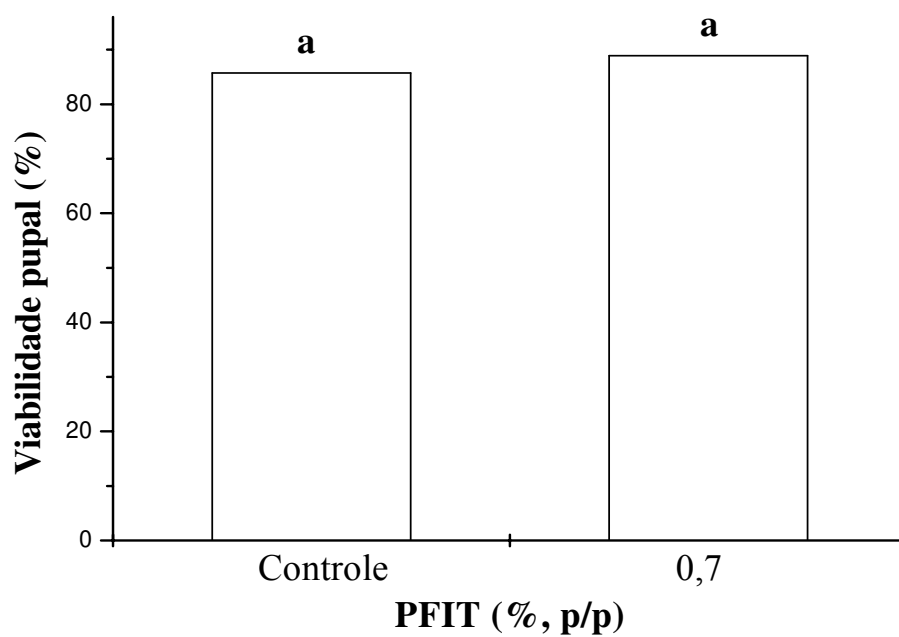


Figura 15. Viabilidade pupal de *A. kuehniella* alimentada com dieta controle e dieta artificial contendo PFIT 0,7%. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 75$. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

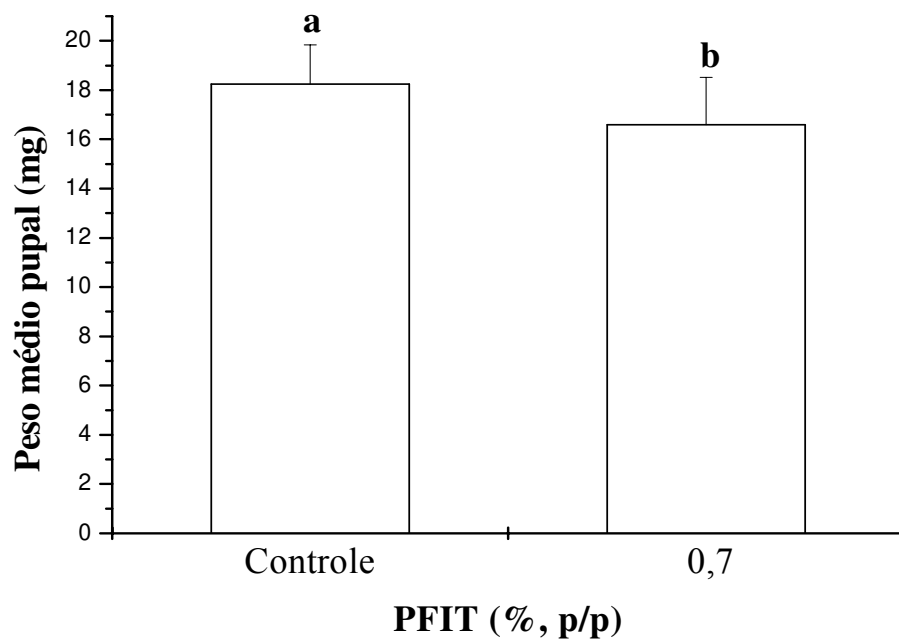


Figura 16. Peso médio das pupas de *A. kuehniella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo PFIT 0,7%. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 75$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.



Figura 17. Foto ilustrando o efeito de PFIT no peso das pupas de *A. kuehniella*.
[A] Larva alimentada em dieta controle [B] Larva alimentada em dieta contendo PFIT 0,7%.

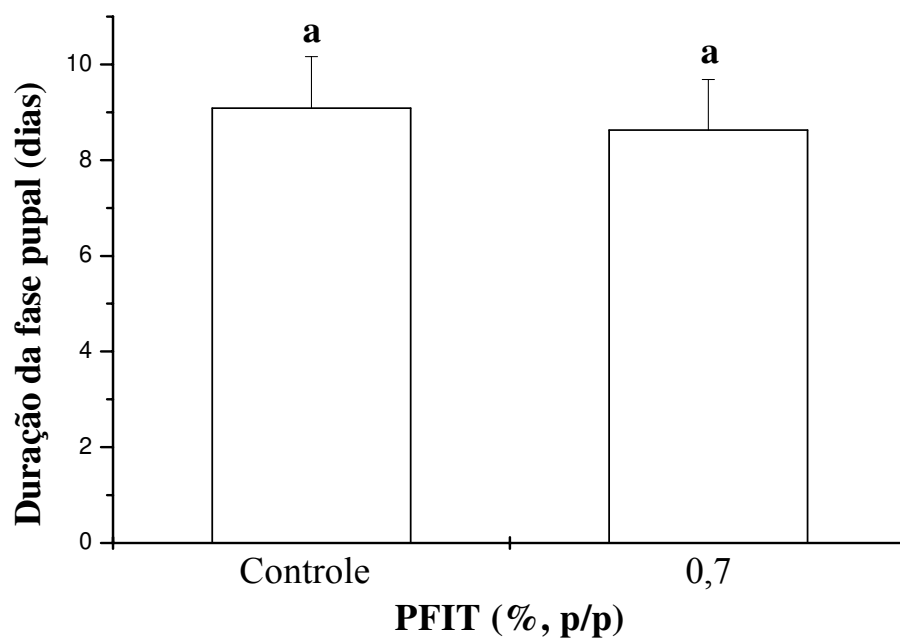


Figura 18. Duração da fase pupal de *A. kuehniella* alimentada com dieta controle e dieta artificial contendo PFIT 0,7%. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 75$. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

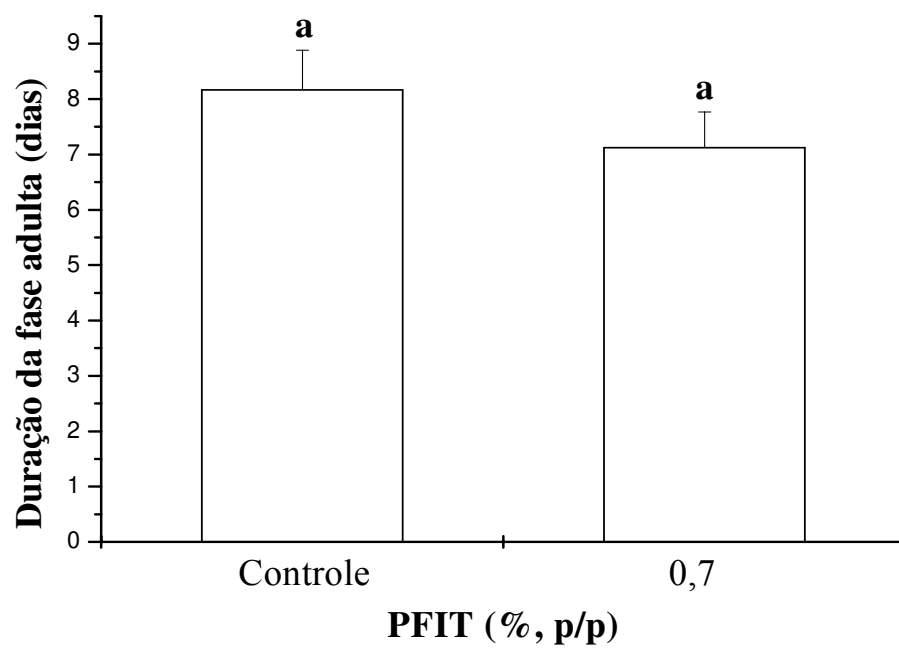


Figura 19. Duração da fase adulta de *A. kuehniella* alimentada com dieta controle e dieta artificial contendo PFIT 0,7%. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 75$. Letras iguais indicam que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

VI – DISCUSSÃO

Em plantas, os inibidores de proteinases podem atuar como proteínas de reserva (MOSOLOV, 1995; VALUEVA & MOSOLOV, 1999) ou podem estar envolvidos no mecanismo de defesa vegetal contra pestes e doenças causados por patógenos (RYAN, 1990; MACEDO *et al.*, 2003; HAQ *et al.*, 2004; TAMHANE *et al.*, 2005; DUNAEVSKY *et al.*, 2005). Além dessas suas funções biológicas naturais, os inibidores podem ser utilizados como ferramentas alternativas no tratamento de patologias humanas tais como hemorragias, inflamação e câncer (OLIVA *et al.*, 2000, CHEN & SHAW, 2003; FOOK *et al.* 2005; MELLO *et al.*, 2006).

O estudo dos papéis biológicos do inibidor de *Plathymenia foliolosa* (PFIT) possibilita esclarecer a aplicação desta molécula como ferramenta biológica. Baseado no conhecimento de que plantas utilizam substâncias químicas para se defenderem da agressão de animais predadores, insetos, microorganismos e muitos outros fitopatógenos, a ação desses inibidores como agentes tóxicos foi investigada. Muitos estudos têm sido realizados nesta área direcionando a ação de inibidores de proteinases já que estes se mostram capazes de reduzir o desenvolvimento e sobrevivência de uma gama de insetos, quando são adicionados as suas dietas. Muitas pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de verificar a eficácia deste papel biológico, e trazer assim contribuições para a agricultura (JOUANIN *et al.*, 1998).

Em geral, os inibidores de serinoproteinases são efetivos contra insetos da ordem Lepidóptera, já que estas são as enzimas majoritárias detectadas no intestino médio destes insetos (MAZUMBAR-LEIGHTON & BROADWAY, 2001). No nosso estudo, uma espécie desta ordem, pertencente à família Pyralidae, foi utilizada, a *Anagasta kuehniella*. Este inseto é uma praga que se alimenta de uma ampla variedade de produtos estocados, tais como chocolate em pó, grãos secos, nozes, tabaco, coco e frutos secos. Sua ocorrência é observada na maioria das regiões temperadas e subtropicais do mundo (MACEDO *et al.*, 2003).

O estudo da atividade tóxica de PFIT foi verificado a partir da incorporação do inibidor purificado em dietas artificiais de *A. kuehniella*, com a finalidade de avaliarmos os parâmetros de crescimento e desenvolvimento do inseto. Assim, foram analisados

extratos intestinais e as fezes de lagartas alimentadas com dietas contendo 0,7% de PFIT (p/p).

A quantidade e a qualidade do alimento consumido na fase larval afetam a taxa de crescimento, o tempo de desenvolvimento, peso corpóreo, sobrevivência, bem como influenciam a fecundidade, longevidade, movimentação e capacidade de competição dos adultos (PANIZZI & PARRA, 1991). A presença de PFIT 0,7% na dieta artificial reduziu significativamente a sobrevivência e o peso médio das larvas de *A. kuehniella* em 32,3% e 66,1% respectivamente quando comparado ao controle (Figura 4 e 5), sugerindo um efeito subsequente no desenvolvimento do inseto. Resultados similares foram obtidos por MACEDO *et al.* (2003) quando alimentaram a mesma espécie com dieta artificial contendo 1% do inibidor presente em *Peltophorum dubium*, e observaram uma redução de 50% no peso larval. FRANCO *et al.* (2004) demonstraram que a presença de 500 μ M de SKTI na dieta oferecida a *A. grandis* causava uma diminuição no peso médio larval de 75%.

Avaliando os efeitos do inibidor no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas (Figuras 7 e 8), verificou-se que a presença de PFIT 0,7% na dieta não afetou significativamente o consumo do alimento embora tenha diminuído a produção de fezes.

Os resultados obtidos nos ensaios *in vivo* refletem nos valores dos índices nutricionais (Tabela 1). O índice de eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) representa habilidade do inseto em transformar o alimento ingerido em biomassa. Uma diminuição do ECI indica que uma maior quantidade de alimento está sendo utilizada para energia e pouco está sendo convertido em biomassa. (KOUL *et al.*, 2003). O índice de eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) é a estimativa da conversão do alimento que foi assimilado, ou seja, ECD diminui à medida que a proporção de alimento digerido é metabolizado para gerar energia (WHEELER & ISMAN, 2001). Na dieta contendo PFIT 0,7% os índices ECI e ECD foram menores, significando, portanto, que nesta dieta uma menor quantidade de alimento foi utilizada para a produção de biomassa do inseto, o que justifica menor peso larval e a menor produção de fezes nos insetos alimentados com o inibidor. O custo metabólico (CM) dessa dieta foi maior que o da dieta controle, pois provavelmente uma quantidade maior de energia proveniente da dieta tenha sido utilizada no processo de degradação do inibidor presente. A

digestibilidade aparente (AD) também foi maior na dieta contendo PFIT, fato que sugere a necessidade de que o alimento permanecesse no tubo digestivo por um tempo maior para permitir a degradação ou neutralização dos efeitos do inibidor. Logo esse maior tempo de contato do alimento com as enzimas digestivas provavelmente tenha permitido maior digestibilidade do alimento, comportamento observado também por MORDUE LUNTZ & BLACKWELL (1993).

Após o ensaio de alimentação, a atividade enzimática do fluido intestinal (IM) e das fezes dos insetos foi avaliada para analisar os efeitos da presença de PFIT na dieta. Foi constatado que no IM a atividade das enzimas do tipo tripsina foi reduzida devido à presença do inibidor já que a produção de nmol de BApNA hidrolisado foi menor (Figura 9). Já a atividade das enzimas presentes nas fezes das larvas alimentadas com PFIT mostrou um aumento significativo da sua atividade trípica (Figura 10). Estes dados sugerem que houve um pequeno rompimento em uma determinada região do intestino médio do inseto causado provavelmente pela interação do inibidor com a membrana do intestino, fazendo com que haja o extravasamento das enzimas digestivas para as fezes. PURCELL *et al.* (1992) observaram que SKTI, um inibidor de soja, era capaz de inibir a atividade proteolítica de vários lepidópteros, tais como *Agrotis ipsilon*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Choristoneura occidentalis* e coleópteros tais como o gorgulho do algodão (*A. grandis*). GOMES *et al.* (2005) demonstraram que um inibidor de sementes de grão-de-bico (CaTI) inibia as enzimas tripsina-like de *Anthonomus grandis* e *S. frugiperda* e uma fração enriquecida com CaTI incorporada em dieta artificial causava alta mortalidade, deformidades e retardo no desenvolvimento. BHATTACHARYYA *et al.* (2007) demonstraram que um inibidor de tripsina de *Archidendron ellipticum* (AeTI) diminuía significativamente a atividade de tripsinas-like de larvas de *Spodoptera litura*, depois de alimentadas com uma dieta contendo 150 μ M de AeTI.

A Figura 11 mostra o ensaio de incubação de crescentes concentrações de PFIT com o IM de larvas alimentadas com dieta artificial. O resultado sugere que as enzimas das larvas alimentadas com PFIT continuam sensíveis à ação do inibidor quando incubado no ensaio. A atividade em gelatina das enzimas do IM e das fezes de larvas alimentadas com dietas artificiais (Figura 12) além de reforçar os resultados mostrados nas Figuras 9 e 10, confirma a atividade de enzimas do tipo tripsina.

Em relação ao efeito de PFIT no desenvolvimento de *A. kuehniella*, pode-se verificar uma redução significativa de 35,7% na viabilidade larval (Figura 13) e uma redução de 9,1% no peso médio das pupas (Figura 16) alimentadas com o inibidor quando comparada às larvas do controle. Quanto aos itens viabilidade pupal (Figura 15), duração da fase larval (Figura 14), pupal (Figura 18) e adulta (Figura 19) não foram verificadas nenhuma diferença significativa. FRANCO *et al.* (2004) demonstraram que a presença de 500 μ M de SKTI na dieta oferecida a *A. grandis* causava alta taxa de deformidade na pupa e no inseto adulto, sendo observado deformidades de aproximadamente 50% nas pupas e 81% nos insetos adultos.

Diante do exposto, podemos concluir que um novo inibidor de tripsina da família Kunitz foi isolado e que o mesmo apresenta uma atividade tóxica em relação a *A. kuehniella*, podendo no futuro ser utilizado como um método alternativo ao combate deste inseto praga, através do uso da Biotecnologia Vegetal.

VII – CONCLUSÕES

- PFIT quando incorporado em dietas artificiais reduziu significativamente a sobrevivência e o peso médio das larvas de *Anagasta kuehniella*;
- Alterou o perfil da atividade proteolítica dos fluidos do IM e fezes;
- Os índices nutricionais apresentaram taxas diferentes, redução no ECI e ECD e aumento no CM e AD;
- Enzimas do IM expostas novamente ao inibidor continuam sensíveis;
- Alterou o desenvolvimento de *A. kuehniella*, reduzindo a viabilidade larval e o peso médio das pupas;
- PFIT apresenta efeitos anti-metabólicos quando ingerido por *A. kuehniella*;
- Um novo inibidor de tripsina da família Kunitz foi isolado e o mesmo apresenta atividade tóxica em relação a *A. kuehniella*.

VIII- REFERÊNCIAS

ABDEEN, A.; VIRGOS, A.; OLIVELLA, E.; VILLANUEVA, J.; AVILES, X.; GABARRA, R.; PRAT, S. Multiple insect resistance in transgenic tomato plant over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Mol Biol* 57:189–202. 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.

BABU, M.R.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M.S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management – an over view. *Crop Protect.* 22: 1071-1086. 2003.

BAEK, J.M.; SONG, J.C.; CHOL, Y.D.; KIM, S.I. Nucleotide sequence homology of cDNAs encoding soybean Bowman-Birk type proteinase inhibitor and its isoinhibitors. *Bioscience Biotech. Biochem.* 58: 843-846. 1994.

BARBIERI, L.; BATTELLI, M.G.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1154, p. 237-282. 1993.

BARRETT, K.L.; GRANDY, N.; HARRISON, E.G.; HASSAN, S.A.; OOMEN, P. Guidance Document of Regulatory Testing Procedures for Pesticides and Non-Target Arthropods. SETAC-Europe, p. 51. 1994.

BELITZ, H.D. & WEDER, J.K.P. Protein inhibitor of hydrolases in plant foodstuffs. *Food Rev. Int.* 6: 151-211. 1990.

BERNAYS, E.A. & CHAPMAN, R.F. Host plant selection by phytophagous insects. Chapman and Hall, London. 1994.

- BHATTACHARYYA, A.; LEIGHTON, S.M.; BABU, C.R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. Comp. Bioch. And Physiol. 145, 669-677. 2007.
- BIRK, Y. Protein proteinase inhibitors in legume seeds – Overview. Arch. Latinoam. Nutricion. 44: 26S-30S. 1994.
- 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.
- BLANCO-LABRA, A.; CHAGOLLA-LOPEZ, A.; GALLARDO, M.; RODRÍGUEZ, V. Further characterization of the 12kDa proteases/ alpha amylase inhibitor present in maize seeds. Food Nutrition Press, 3: 27-41. 1995.
- 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 in potato leaves by methyl jasmonate. J. Insect Physiol. 41: 1071-1078. 1995.
- BROADWAY, R.M.; DUFFEY, S.S. The effect of plant protein quality on toxicity of plant proteinase inhibitors. J. Insect Physiol. 34: 1111-1117. 1986.
- BROADWAY, R.M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. J. Insect Physiol. 43: 855-874. 1997.
- BRZIN, J. & KIDRIC, M. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 13: 420-467. 1995.
- CAPALBO, D.M.F.; HILBECK, A.; ANDOW, D.; SNOW, A.; BONG, B.B.; WAN, F.; FONTE, E.M.G.; OSIR, E.O.; FITT, G.; JOHNSTON, J.; SONGA, J.; HEONG, K.L.; BIRCH, A.N. Brazil and the development of international scientific biosafety testing guidelines for transgenic crops. J. Invertebrate Pathol. 83: 104-106. 2003.

- 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.
- CHEN, T.B.; SHAW, C. Identification and molecular cloning of novel trypsin inhibitor analogs from the dermal venom of the Oriental firebellied toad (*Bombina orientalis*) and the European yellow-bellied toad (*Bombina variegata*). *Peptides* (6), 873–880. 2003.
- 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.; SHAW, B.D. The interaction of a range of serine proteinase inhibitor with bovine trypsin and *Costelytra zealandica* tripsin. *Insect Biochem.* 19: 233-241. 1989.
- CHRISTELLER, J.T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS Journal*, 272: 5710–5722. 2005.
- COHEN, E. Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 22, p. 245-261. 1993.
- CURSINO-SANTOS, J.R.; DEFINA, T.P.A.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Os segredos das plantas e de seus patógenos na era molecular, cap. 1, p. 9. 2003.
- DE LEO, F.; BONADÉ-BOTTINO, M.; CECI, L.R.; GALLERANI, R.; JOAUNIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 31, p. 593- 602. 2001.
- DE LEO, F.; VOLPICELLA, M.; LICCIULLI, F.; LIUNI, S.; GALLERANI, R.; CECI, L.R. Plant-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Res.* 30 (1): 347-348. 2002.

DUNAEVSKY, Y.E.; ELPIDINA, E.N.; VINOKUROV, K.S.; BELOZERSKY, M.A. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. Mol. Biol. 39, 608–613. 2005.

EIZAGUIRRE M.; ALBAJES R.; LOPEZ C.; JORDI E.; LUMBIERRES B.; PONS X. Six years after the commercial introduction of *Bt* maize in Spain: field evaluation, impact and future prospects. Transgenic Res 15:1–12. 2006.

ERLANGER, B.F.; KOLOWSKY, N.; COHEN, N. Preparation and properties of two new chomogenic substrates of trypsin. Arch. Biochem. Biophys., 95: 271-278. 1961.

FALCO, M.C. & SILVA, F.M.C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants. Effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. Plant Phys. Biochem., 41: 761-766. 2003.

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

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

FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. Curr. Opin. Biotechnol., 15:155-161. 2004.

FERRY N.; EDWARDS M.G.; GATEHOUSE T.; CAPELL P.; CHRISTOU P.; GATEHOUSE A.M.R. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. Transgenic Res 15:13–19. 2006.

FOOK, J.M.S.L.L.; MACEDO, L.L.P.; MOURA, G.E.D.D.; TEIXEIRA, F.M.; OLIVEIRA, A.S.; QUEIROZ, A.F.S.; SALES, M.P. A serine proteinase inhibitor isolated from *Tamarindus indica* seeds and its effects on the release of human neutrophil elastase. Life Sci. 76, 2881–2891. 2005.

FRANCO, O.L.; DIAS, S.C.; MAGALHÃES, C.P.; MONTEIRO, A.C.S.; BLOCH-JR, C.; MELO, F.R.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; MONNERAT, R.G.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Phytochemistry*, v. 65, n. 1, p. 81-89. 2004.

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

GARCIA, V.A.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Trypsin Inhibitor from *Poecilanthe parviflora* Seeds: Purification, Characterization, and Activity Against Pest Proteases. *Protein J.* 23: 343-350. 2004.

GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A.; DOBIE, P.; KILMINSTER, A.M.; BOULTER, D. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*, *J. Sci. Food Agric.* 30 948-958. 1979.

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. *Mol. Plant-Microbe Interactions*, 3: 327-333. 1990.

GIRARD, C.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAMDELEGUE, M.H.; JOUANIN, L.M. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larval. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28: 229-237. 1998.

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 Physiol.* 116: 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.

HABIBI, J.; BACKUS, E.A.; HUESING, J.E. Effects of phytohemagglutinin (PHA) on structure of midgut epithelial cells and localization of its binding sites in western tarnished plant bug, *Lygus hesperus* Knight. *L. Insect Physiol.*, 46: 611-619. 2000.

HALL, A.E.; SINGH, B.B.; EHLERS, J.D. Cowpea breeding. *Plant Breeds. Rev* 15 217-274. 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. *Arch. Biochem. Biophys*, 431: 145-159. 2004.

HARSULKAR, A.M.; GIRI, A.P.; GUPTA, V.S.; PATANKAR, A.G.; SAINANI, M.N.; RANJEKAR, P.K.; DESHPANDE, V.V. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. *Plant Physiol.*, 121: 497-506. 1999.

HEYWOOD, V. H. Systematic survey of Old World Umbelliferae. *In* V. H. Heywood [ed.], *The biology and chemistry of the Umbelliferae*, Academic Press, London, UK. 31-42. 1971.

HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOUTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature (Lond.)*, 330: 160-163. 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.

JANY, K.D.; HAUG, H.; PFLEIDER, G.; ISAHAY, J. Enzymatic and chemical properties of an endopeptidases from the larva of the homet, *Vespa cabro*. *Biochem.* 17: 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*. Biochem. Biophys. research commun, 110: 1-7. 1983.
- JOANITTI, G.A.; FREITAS, S.M.; SILVA, L.P. Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. Current Enzyme Inhibition, 2(3): 199-217. 2006.
- 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 Biochem. Mol. Biol. 25: 375-383. 1995.
- JONGSMA, M.A. & BOULTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. J. Insect Physiol. 43: 885-895. 1997.
- JOUANIN, L.; BONADE-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. Plant Sci. 131: 1-11. 1998.
- KOIWA, H.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. Trends Plant Sci. 2, 379–384. 1997.
- KOUL, O.; DANIEWSKI, W.M.; MULTANI, J.S.; GUMULCA, M.; SINGH, G. Antifeedant Effects of the Limonoids from *Entandrophragma candolei* (Meliaceae) on the Gram Pod Borer, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Agric. Food Chem. 51 7271-7275. 2003.
- KURODA, M.; KIYOSAKI, T.; MATSUMOTO, I.; MISAHA, T.; ARAI, S.; ABE, K. Molecular cloning, characterization, and expression of wheat cystatins. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v. 65, p. 22-28. 2001.
- LARRY, L.M. & RICHARD, E.S. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. J. Agric. Food Chem. 50: 6605–6611. 2002.
- LASKOWSKI, M. & QASIM, M.A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes?. Biochim. Biophys. Acta, 1477: 324-337. 2000.

- LAWRENCE, P.K. & KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Journal of Biotechnology*, v. 5, p. 93-109. 2002.
- LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. *A. Rev. Entomol.*, 42: 525-550. 1997.
- LEMOS, F.J.A. & TERRA, W.R. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22: 613-619. 1992.
- 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. Árvores Brasileiras – Manual de identificação e Cultivo de Plantas nativas do Brasil. Editora Plantarum LTDA: 1. 1992.
- MACEDO, M.L.R. & XAVIER-FILHO, J. Purification and partial characterization of trypsin inhibitors from seeds of *Clitoris ternatea*. *J. Sci. Food. Agric.*, 58: 55-58. 1993.
- MACEDO, M.L.R.; MATOS, D.G.G.; MACHADO, O.L.T.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C. Trypsin inhibitors from *Dimorphandra mollis* seeds: Purification and Properties. *Phytochem.* 54: 553-558. 2000.
- MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; CABRINI, E.C.; TOWAMA, 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). *Biochim Biophys. Acta* 25527: 1-13. 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 *Adenanthera pavonina* L. Seeds and Its Effect on *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 2533-2540. 2004.

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.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S. & BROADWAY, R.M. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. Insect Biochem. Mol. Biol., 31: 645-657. 2001.

MCMANUS, M.T. & BURGESS, E.P.J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive protease of the larvae of *Spodoptera litura*. Journal of Insect Physiology, v. 41, n. 9, p. 731-738. 1995.

MELLO, G.C.; OLIVA, M.L.V.; SUMIKAWA, J.T.; MACHADO, O.L.T.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MACEDO, M.L.R. Purification and Characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. J. Protein Chem. 20: 625-632. 2001.

MELLO, G.C.; DESOUZA, I.A.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; ANTUNES, E.; MACEDO, M.L.R. Oedematogenic activity induced by Kunitz type inhibitors from *Dimorphandra mollis* seeds. Toxicon 47, 150–155. 2006.

MICKEL, C.E. & STANDISH, J. Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum*. University of Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin, v. 178, p. 1-20. 1947.

MISAKA, T.; KURODA, M.; IWABUCHI, K.; ABE, K.; ARAI, S. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. European Journal of Biochemistry, v. 240, p. 609-614. 1996.

MORDUE (LUNTZ), A.J.; BLACKWELL, A. Azadirachtin: an Update; J. Insect Physiol., 39, 903-924. 1993.

MOSOLOV, V.V. Protein inhibitors of proteinases and α -amylases in plants (a review). Appl. Biochem. Microbiol., 31: 3-7. 1995.

MOSOLOV, V.V.; GRIGOR'EVA, L.I.; VALUEVA, T.A. Plant proteinase inhibitors as polyfunctional proteins (a review) Prikl. Biokhem. Mikrobiol. 37(6): 643-50. 2001.

MOSOLOV, V.V. & VALUEVA, T.A. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. Prikl Biokhim Mikrobiol. 41(3): 261-82. 2005.

NEURATH, H. Proteolytic processing and physiological regulation. Trends Biochem. Sci. 14: 268-271. 1989.

OJIMA, A.; SHIOTA, H.; HIGASHI, K.; KAMADA, H.; SHIMMA, Y.I., 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; SOUZA-PINTO, J.C.; BATISTA, I.F.C.; ARAUJO, M.S.; SILVEIRA, V.F.; AUERSWALD, E.A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. Biochim. Biophys. Acta 1477: 64-74. 2000.

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.

PACHECO, I.A. & DE PAULA, D.C. Insetos de grãos armazenados – identificação e biologia. São Paulo: Fundação Cargill, 229p. 1995.

PAES, N.S.; GERHARDT, I.R.; COUTINHO, M.V.; YOKOYAMA, M.; SANTANA, E.; HARRIS, N.; CHRISPEELS, M.J.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. J. Insect Physiol., 46: 393-402. 2000.

PANIZZI, A.R. & PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. Ecologia nutricional de insetos e suas aplicações no manejo de pragas. São Paulo: Editora Manole LTDA, Capítulo II, p. 9-65. 1991.

- PATANKAR, A.G.; GIRI, A.P.; HARSULKAR, A.M.; SAINANI, M.N.; DESHPANDE, V.V.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31:453-464. 2001.
- 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.
- PEREIRA, R.A.; BATISTA, J.A.N.; SILVA, M.C.M.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; FIGUEIRA, E.L.Z.; JIMÉNEZ, A.V.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. An α -amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Phytochemistry*, v. 67, p. 2009-2016. 2006.
- PETERS, W. Peritrophic membranes. In *Zoo Physiology*. Vol. 30, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 1992.
- PEUMANS, W.J. & VAN DAMME, E.J.M. Lectin as plant defense proteins. *Plant Physiology*, v. 109, p. 347-352. 1995.
- POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Entomol. Exp. Appl.* 99:79-85. 2001.
- PRICE, P.W. *Insect Ecology*. 3rd edn. John Wiley & Sons, Inc, New York. 1997.
- PURCELL, J.P.; GREENPLATE, J.T.; SAMMONS, R.D. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22: 41-47. 1992.
- 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. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*, v. 5, p. 259-306. 1991.

RYAN, C.A. Plant proteinases. In: *The Biochemistry of Plants*. (Marcus, E. ed.). Academic Press, New York. 1981.

RYAN, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425–449. 1990.

SALES, M.P.; MACEDO, M.L.R.; XAVIER-FILHO, J. Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid (insect) midgut proteinases. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103. 1992.

SALES, M.P.; GERHARDT, I.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; XAVIER-FILHO, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? *Plant Physiology*, v. 124, p. 515-522. 2000.

SAMPAIO, C.A.M.; OLIVA, M.L.V.; SAMPAIO, M.U.; BATISTA, I.F.C.; BUENO, N.R.; TANAKA, A.S; AUERSWALD, A.; FRITZ, H. Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes. *Immunopharmacology* 32: 62-66. 1996.

SCHULER, T.H.; POPPY, G.M.; KERRY, B.R.; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 168-175. 1998.

SHEWRY, P.R.& LUCAS, J.A. Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. In: *Advances in Botanical Research*, 26: 135-192. 1997.

SILVA, C.P.; TERRA, W.R.; XAVIER-FILHO, J.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; LOPES, A.R.; PONTES, E.G. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29:355-366. 1999.

SILVA, G. S. Isolamento e Caracterização Bioquímica de um Inibidor de Tripsina de Sementes de *Plathymenia foliolosa* e o seu efeito sobre o desenvolvimento de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), Monografia submetida à Coordenação do curso de

Ciências Biológica Licenciatura Plena da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2003.

SIN, S.F. & CHYE, M.L. Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. *Planta* 219: 1010-1022. 2004.

SINGH, B.B.; SINGH, S.R.; ADJADI, O. Bruchid resistance in cowpea. *Crop Sci.*, 25: 736-739. 1985.

SUPURAN, C.T.; SCOZZAFAVA, A.; CLARE, B.W. Bacterial protease inhibitors. *Med Res Rev.* 22(4): 329-72. 2002.

TAMHANE, V.A.; CHOUGULE, N.P.; GIRI, A.P.; DIXIT, A.R.; SAINANI, M.N.; GUPTA, V.S. In vivo and in vitro effect of *Capsicum annum* proteinase inhibitors on *Helicoverpa armigera* gut proteinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1722, 156–176. 2005.

TELES, R.C.; DE SOUZA, E.M.; CALDERON, L.A.; DE FREITAS, S.M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. *Phytochemistry* 65, 793–797. 2004.

TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109: 1-62. 1994.

TERRA, W.R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 47: 47-61. 2001.

TIFFIN, P. & GAUT, B.S. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip1 in *Zea* and related genera. *Mol. Biol. Evol.* 18: 2092-2101. 2001.

USSUF, K.K.; LAXMI, N.H.; MITRA, R. Proteinase inhibitors: plant derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Curr Sci* 80:847–853. 2001.

VALUELA, T.A.; REVINA, T.A.; MOSOLOV, V.V. Potato tuber protein proteinase inhibitors belonging to the Kunitz soybean inhibitor family. *Biochemistry* (Dey, P.M. & Harborne, J.B. eds.) Academic Press, cap. 13, p. 487-502. 1997.

VALUEVA, T.A. & MOSOLV, V.V. Protein inhibitors of proteinases in seeds: 1. Classification, distribution, structure and properties. Russ. J. Plant Physiol. 46: 307-321. 1999.

VALUEVA T.A. & MOSOLOV V.V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. Biochemistry, 69(11), 1305-1309. 2004.

VOLPICELLA, M.; CECI, L.R.; CORDEWENER, J.; AMERICA, T.; GALLERANI, R.; BODE, W.; JONGSMA; M.A.; BEEKWILDER, J. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinases inhibitors. J. Biochem. 270: 10-19. 2003.

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 J. Biol. Sci. 28: 1-23. 1975.

WHEELER, D.A. & ISMAN, M.B. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. Entomologia Experimentalis et Applicata 98: 9-16. 2001.

WOLFSON, J.L. & MURDOCK, L.L. Potencial use of protease inhibitors for host plant resistance: a test case. Environm. Entomol. 24: 52-57. 1995.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F.A.P.; ARY, M.B.; SILVA, C.P.; CARVALHO, M.M.M.; MACEDO, M.L.R.; LEMOS, F.J.; GRANT, G. Poor correlation between the levels of proteinases inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. J. Agric. Food Chem. 37: 1139-1143. 1989.

XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. Rev. Bras. Fisiol. Veg. 4: 1-6. 1992.

XU, Z.F.; QI, W.Q.; OUYANG, X.Z.; YEUNG, E.; CHYE, M.L. A proteinase inhibitor II of *Solanum americanum* is expressed in phloem. Plant Mol. Biol. 47: 727-738. 2001.

YEH, K.M.; LIN, M.I.; TUAN, S.J.; CHEN, Y.M.; LIN, C.Y.; KAO, S.S. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. Plant. Cell Reports, 16: 696-699. 1997.