

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



WALCIANE DA SILVA

**“ESTUDO DA AÇÃO DO INIBIDOR DE PROTEINASE DE
Adenanthera pavonina SOBRE O DESENVOLVIMENTO E
ATIVIDADE DAS PROTEINASES INTESTINAIS DE LAGARTAS DE
Diatraea saccharalis (FABR., 1794)”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Walciane da Silva</u> <u>Walciane da Silva</u> 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.

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

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Si38e

Silva, Walciane da

Estudo da ação do inibidor de proteinase de *Adenanthera pavonina* sobre o desenvolvimento e atividade das proteinases intestinais de lagartas de *Diatraea saccharalis* (FABR., 1794) / Walciane da Silva. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.

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

1. *Diatraea saccharalis*. 2. *Adenanthera pavonina*. 3. Inibidores de proteinase. I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(scs/ib)

Título em inglês: Study of proteinase inhibitor action from *Adenanthera pavonina* on the development and midgut proteinase activities of the *Diatraea saccharalis* larvae (FABR., 1794).

Palavras-chave em inglês: *Diatraea saccharalis*; *Adenanthera pavonina*; Proteinase inhibitors.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo, Dirce Fernandes de Melo, Cláudio Chrysostomo Werneck.

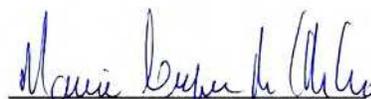
Data da defesa: 19/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 19 de fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo (Orientadora)


Assinatura

Profª. Dra. Dirce Fernandes de Melo


Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck


Assinatura

Profª. Dra. Maristela Cesquini Oliveira

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Assinatura

in memória de minha avó,
Maria Jorge da Silva

OFEREÇO

Aos meus queridos pais, Fátima e Donizete, que nunca mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos e objetivos, me ajudando e apoiando em todos os momentos da minha vida.

A Deus.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

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

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

Aos Professores Dr. Sérgio Marangoni e Dr. José Camillo Novello por terem me recebido em seu laboratório.

À Prof^a. Dra. Mirela Batista Coelho pela participação no exame de qualificação onde apresentou valiosas sugestões e observações para a revisão deste trabalho.

Aos Professores Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck e Dra. Dirce Fernandes de Melo por participarem da banca examinadora desta tese, valorizando assim o meu trabalho.

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

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.

A José Augusto pela ajuda essencial e constante.

A toda minha família pelo amor, dedicação e cooperação.

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

ÍNDICE

ABREVIACÕES _____	viii
RESUMO _____	ix
ABSTRACT _____	x
I - INTRODUÇÃO _____	1
1 - Insetos e danos econômicos _____	2
2 - Proteínas vegetais tóxicas envolvidas na defesa de plantas _____	4
3 - Enzimas digestivas de insetos _____	5
4 - Inibidores de proteinases _____	6
4.1 - Características gerais dos inibidores de proteinases _____	6
4.2 - Inibidores de proteinases serínicas _____	7
4.2.1 <i>Adenantha pavonina</i> _____	8
5 - Aspectos da nutrição e digestão de insetos _____	9
6 - Efeitos dos IPs sobre o desenvolvimento e metabolismo dos insetos _____	11
7- Biotecnologia de plantas _____	13
8 - Adaptação de insetos aos inibidores de proteinases _____	14
II - OBJETIVOS _____	16
III – MATERIAIS E MÉTODOS _____	17
1 - Espécie vegetal _____	17
2 - Inseto _____	17
3 - Extração e purificação do inibidor de <i>Adenantha pavonina</i> (ApTI) _____	18
3.1 - Obtenção do extrato bruto _____	18
3.2 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75 _____	19
3.3 - Cromatografia de Afinidade em Sepharose Tripsina _____	19
4 - Bioensaio _____	19

5 - Efeito de ApTI – Sobrevivência, peso e índices nutricionais de larvas de quarto ínstar	20
6 - Obtenção das enzimas do fluido intestinal de <i>D. saccharalis</i>	22
7 - Preparação das fezes	22
8 - Determinação da atividade enzimática do tipo tripsina	22
9 - Efeito de ApTI na atividade proteolítica endógena	22
10 - Análise eletroforética das enzimas de <i>D. saccharalis</i>	23
11 - Análise estatística.	23
IV - RESULTADOS	24
1 - Efeito de ApTI no desenvolvimento de <i>D. saccharalis</i>	24
1.1 - Sobrevivência larval	24
1.2 - Peso médio larval	25
2 - Análises do consumo e utilização de alimentos	26
2.1 - Dieta consumida pelas larvas de quarto ínstar	26
2.2 - Fezes produzidas pelas larvas de quarto ínstar	27
2.3 - Índices nutricionais	28
3 - Determinação da atividade tríptica	29
3.1 - Dosagem da atividade tríptica do intestino médio	29
3.2 - Dosagem da atividade tríptica das fezes	30
4 - Determinação da atividade proteolítica endógena	31
5 - Eletroforese do fluido do intestino médio e dos resíduos de fezes das larvas de <i>D. saccharalis</i>	32
V – DISCUSSÃO	33
VI - CONCLUSÕES	38
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ABREVIACOES

AD - digestibilidade aparente

ApTI- inibidor de tripsina de *Adenantha pavonina*

BApNA - N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida

Bt - *Bacillus thuringiensis*

BTCI - inibidor tríptico e quimotrptico de *Vigna unguiculata*

CaTI - inibidor de tripsina de grão de bico (*Cicer arietnum*)

CM - custo metabólico

DMTI -II– inibidor de tripsina II de *Dimorphandra mollis*

EB - extrato bruto

ECD - eficiência de conversão do alimento digerido

ECI - eficiência de conversão do alimento ingerido

IM - intestino médio

IP - inibidor de proteinase

kDa - kilodalton

MTI-2 – inibidor de tripsina de mostarda

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

PDTI - inibidor de tripsina presente de *Peltophorum dubium*

PotPI-II - inibidor de protease de batata

SBTI – inibidor de tripsina de soja

SDS - dodecil sulfato de sódio

SKTI - inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz

TLCK - N- -tosyl-L-lysine chromethyl ketone

TRIS - hidroximetil aminometano

UR - umidade relativa

RESUMO

Insetos fitopatógenos e outros animais utilizam enzimas digestivas tais como as amilases e proteases para processar nutrientes obtidos de plantas necessários ao seu desenvolvimento. A broca-da-cana *Diatraea saccharalis* é a principal praga da cana-de-açúcar no Brasil e em outros países da América do Sul. Plantas sintetizam uma variedade de moléculas incluindo inibidores de proteinases (IPs) para se defenderem contra o ataque de insetos. Os IPs são polipeptídios hábeis em se ligar às enzimas proteolíticas localizadas no intestino médio dos insetos, tornando-as inativas por inibição competitiva. Esse processo leva a uma redução da disponibilidade de aminoácidos para a síntese protéica, e desta maneira, uma redução no crescimento e desenvolvimento. A predominância de enzimas digestivas do tipo serino-proteinases na broca-da-cana motivou a descoberta de IPs com a capacidade de reduzir seu processo digestivo. Neste trabalho, um inibidor purificado das sementes de *Adenanthera pavonina* – ApTI foi utilizado em bioensaios, e sua atividade tóxica sobre *D. saccharalis* foi determinada. A ingestão de ApTI resultou em uma redução significativa na sobrevivência e peso larval. Para examinar o efeito da proteína sobre o inseto, a atividade das proteinases intestinais das larvas que se alimentaram em dieta livre do inibidor e alimentadas em dieta contendo o inibidor a 0,05% foi comparada através de ensaios enzimáticos e eletroforese em géis de atividade enzimática. As larvas de quarto ínstar alimentadas em dieta contendo ApTI apresentaram uma diminuição na atividade trípica do intestino e das fezes, confirmado por ensaios enzimáticos e na eletroforese de atividade. Os resultados de utilização da dieta apresentaram redução na eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e do alimento digerido (ECD) e aumento no custo metabólico (CM). Além disso, a atividade trípica das larvas que se alimentaram em dieta com ApTI foi sensível à inibição por ApTI. Esses resultados sugerem que ApTI possui efeitos anti-metabólicos quando ingeridos por *D. saccharalis*.

ABSTRACT

Phytophagous insects and other animals use digestive enzymes, such as amylases and proteinases to process the nutrients obtained from the plants necessary for their development. The sugarcane borer *Diatraea saccharalis* is the major pest of sugarcane in Brazil and other South American countries. Plants synthesize a variety of molecules, including proteinase inhibitors (PIs), to defend themselves against attack by insects. PIs are polypeptides that are able to bind to insect midgut proteolytic enzymes, rendering them inactive by competitive inhibition. This process leads to a limitation of essential amino acids in protein synthesis, and thus, to reduction in growth and development. The predominance of sugarcane-borer digestive serine proteinases has motivated the discovery of PIs with the ability to reduce the digestion process. In this report, the pure inhibitor from seeds of *Adenanthera pavonina* – ApTI was used in bioassay and its toxic activity on *D. saccharalis* was determined. The ingestion of ApTI did result in a significant reduction in larval survival and weight. To examine the protein effects on insect, the midgut proteinases of *D. saccharalis* larvae reared on artificial PI-free diet and on a diet containing ApTI at 0.05% were compared by using enzymatic assays and polyacrilamide gel electrophoresis. The fourth instar larvae reared on diet containing ApTI showed a decrease in tryptic activity of gut and faeces, as confirmed by enzymatic assays and by polyacrilamide gel eletrophoresis. The results from dietary utilization experiments realized with *D. saccharalis* larvae presented a reduction in efficiency of conversion of ingested food (ECI) and digested food (ECD) and an increase in metabolic cost (CM). In addition, the tryptic activity in ApTI-fed larvae was sensitive to ApTI. These results suggest that ApTI have a potential antimetabolic effect when ingested by *D. saccharalis*.

I - INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar e também o maior exportador mundial de açúcar, com participação crescente no mercado livre nos últimos anos (GUANZIROLI, 2006). De acordo com HERRERA (2005) as exportações brasileiras de açúcar demonstraram um desempenho marcante durante os anos 90, passando de um volume próximo a 1,7 milhões de toneladas no início da década, para 14,5 milhões de toneladas na safra de 2003/2004.

No Estado de São Paulo esta cultura sofre o ataque de inúmeros insetos-pragas, os quais se constituem muitas vezes, em fatores limitantes à produção sucro-alcooleira. Dentre estes, destaca-se a broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), que é uma das pragas mais importantes da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, não só pelos danos econômicos que ocasiona à agroindústria sucro-alcooleira, mas também pelas dificuldades de controle devido ao seu hábito alimentar (VENDRAMIM, 1987).

Embora, já há alguns anos, seu controle venha sendo realizado de forma biológica, especialmente através do parasita *Cotesia flavipes* (DEGASPARI *et al.*, 1987), recentemente novas estratégias vêm sendo testadas com o objetivo de reduzir os danos causados pelos insetos-pragas. A engenharia genética aliada ao estabelecimento de protocolos eficientes de transformação genética da cultura tem propiciado alternativas importantes ao controle das pragas. Dentre os genes que codificam proteínas com propriedades antimetabólicas aos insetos, destacam-se os inibidores de proteinase (POMPERMAYER, 2000).

Inúmeros estudos demonstraram que os inibidores de proteinase, presentes em dietas artificiais ou em plantas transgênicas, são capazes de interferir no crescimento e desenvolvimento de um grande número de insetos (RYAN, 1990). Ensaio biológicos nos quais inibidores são incorporados em dietas artificiais de insetos, fornecem uma valiosa informação sobre os tipos de inibidores com potencial para serem usados como fatores de resistência na manipulação genética e programas de melhoramento de plantas (JOHNSON *et al.*, 1993).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do inibidor de tripsina de sementes de *Adenantha pavonina* (ApTI) sobre *D. saccharalis*, visto que as enzimas do tipo tripsina são majoritárias nesse inseto (JOHNSTON *et al.*, 1995), visando a produção de plantas transgênicas

de cana-de-açúcar expressando o inibidor de tripsina (ApTI), a fim de auxiliar no controle desta praga.

1 - Insetos e danos econômicos.

Com o 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 agrícolas seguindo o conceito de 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).

Dentre os grãos cultivados, os grãos de leguminosas ocupam o terceiro lugar atrás de cereais e sementes oleaginosas na produção mundial (POPELKA *et al.*, 2004). Milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*) e principalmente as variedades de feijão (por exemplo, *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*) são os grãos que representam uma grande parte da fonte protéica na alimentação humana e de animais (DURANTI & GIUS, 1997). O armazenamento adequado destes poderia permitir a manutenção de estoques estratégicos e reguladores além da comercialização posterior.

A cultura do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) é freqüentemente mantida em regiões tropicais, subtropicais e semi-áridas, cuja semente é considerada uma importante fonte protéica (SINGH & NTARE, 1985). Essa cultura é um exemplo clássico de perda na produção durante o armazenamento prolongado, no qual os grãos são extensivamente atacados por insetos, inviabilizando-os ao plantio além do consumo humano ou animal (MACHUKA *et al.*, 2000).

Além dos insetos serem considerados os maiores causadores das perdas 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).

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 mencionados como as principais espécies de predadores dos grãos

estocados: *Acanthoscelides clandestinus* (Most), *Zabrotes subfasciatus* (Borh) e *Callosobruchus maculatus* (Fabr) (SINGH & NTARE, 1985). Esta última representa a principal praga de *Vigna unguiculata* durante o seu armazenamento (SALES *et al.*, 1992; MACEDO *et al.*, 1993; FERNANDES *et al.*, 1993). HALL *et al.*, (1997) revelaram que *Callosobruchus maculatus*, conhecido como gorgulho ou caruncho do feijão-de-corda, frequentemente 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).

Outro exemplo de lepidóptero é *Diatraea saccharalis*, a broca-da-cana que foi descrita pelo naturalista Fabricius em 1794, sob o nome de *Phalaena saccharalis*, um inseto-praga da cana-de-açúcar na América do Sul. Os prejuízos causados por esta praga são bastante significativos em sua ampla distribuição nos canaviais brasileiros (PARANHOS, 1987; CÂMARA & OLIVEIRA, 1993).

Ao eclodirem, as larvas medem mais ou menos 1mm de comprimento, sendo que, a cabeça tem o comprimento 1,5 vezes o diâmetro do corpo (VALSECHI *et al.*, 1976). Após a eclosão, as larvas permanecem no colmo, onde completam o desenvolvimento larval. A partir do terceiro mês após o plantio, quando ocorre a formação dos primeiros internódios, os danos tornam-se significativos. Inicialmente os danos são observados em brotos ou perfilhos novos, que têm sua gema apical afetada pelas larvas da praga, resultando na morte da gema, secamento das folhas mais novas e, posteriormente, seca e morte do broto ou perfilho atacado. Este sintoma é conhecido como “coração morto” e permite visualizar a condição inicial de infestação de um canavial. Pode ocorrer a morte da gema apical nos colmos em desenvolvimento, causando o secamento das folhas e induzindo a brotação das gemas laterais e enraizamento aéreo, fatos que

contribuem negativamente na produção e na qualidade da matéria-prima (VALSECHI *et al.*, 1976).

Outro tipo de dano é causado pela praga no interior do colmo, escavando galerias e alimentando-se dos tecidos da planta. As galerias longitudinais nos colmos provocam a perda em açúcar, porém as galerias circulares escavadas nos colmos causam a quebra das canas, o que interfere de maneira mais significativa na produção e no teor de açúcar (HAYWARD, 1943; GALLO, 1968; VALSECHI *et al.*, 1976). Através dos orifícios abertos pelas larvas, ocorre a penetração de fungos dos gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum*, que causam a podridão vermelha (HAYWARD, 1943; VALSECHI *et al.*, 1976; BASTOS, 1987).

2 - Proteínas vegetais tóxicas envolvidas na defesa de plantas.

As plantas possuem sofisticados mecanismos de defesa, especialmente concentrados nas sementes, e isso se deve porque a semente é o veículo de propagação e sobrevivência da espécie. Os tecidos das sementes podem acumular constitutivamente ou em algumas sementes após indução uma ampla variedade de compostos de defesa que conferem resistência contra predadores fitófagos e infecção por vírus, bactéria, fungos, nematóides, etc.

Os inibidores de proteinases (IPs) estão entre os compostos envolvidos no mecanismo de defesa de plantas. Os IPs têm sido isolados e caracterizados de um grande número de organismos, incluindo animais, microorganismos e plantas (VALUEVA & MOSOLOV, 2004). Nas plantas os inibidores concentram-se principalmente nos órgãos de reserva, tais como sementes e tubérculos, mas um número crescente de IP vem sendo encontrado em outros tecidos como, folhas, flores e raízes (BRZIN & KIDRIC, 1995; SIN & CHYE, 2004).

Outras proteínas de plantas supostamente envolvidas no mecanismo de defesa de plantas são lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), glicohidrolases, arcelinas, quitinases, canatoxina e formas modificadas de proteínas de reserva, tais como as vicilinas (CARLINI & GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Para se obter sucesso com a utilização de IPs é necessário conhecer o perfil digestivo dos insetos. Dessa forma é possível desenvolver estratégias de controle mais eficientes e que dificultem o aparecimento de resistências.

3 - Enzimas digestivas de insetos.

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

As enzimas digestivas dos insetos são conhecidas como hidrolases e classificadas de acordo com o substrato que degradam. As proteases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas. Estas proteases (peptídeo-hidrolases) incluem as endopeptidases e as exopeptidases.

As exopeptidases são enzimas que hidrolisam aminoácidos da extremidade N-terminal (aminopeptidases) ou da extremidade C-terminal (carboxipeptidases) da cadeia polipeptídica.

As endopeptidases são conhecidas por proteinases. Estas proteinases são divididas em subclasses com base no mecanismo catalítico: serino, cisteíno, aspartato e metalo-proteinases. As duas principais classes de proteinases no sistema digestivo de insetos fitófagos são as serino e cisteíno-proteinases

A maioria dos lepidópteros possui as serino-proteinases como as principais enzimas digestivas, enquanto que os coleópteros possuem principalmente cisteíno-proteinases (HAQ *et al.*, 2004).

Serino-proteinases:

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

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

As enzimas do tipo tripsina clivam cadeias protéicas, preferencialmente, na região carboxi-terminal de aminoácidos básicos como a lisina ou arginina. Essas enzimas foram

caracterizadas em diversas ordens de insetos de interesse econômico como Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera e Thysanura (TERRA & FERREIRA, 1994).

As quimotripsinas são enzimas que clivam cadeias protéicas, preferencialmente, em aminoácidos aromáticos, na região carboxi – terminal. As quimotripsinas, assim como as tripsinas, apresentam uma taxa similar de distribuição entre os insetos.

Segundo POMPERMAYER (2000), as larvas de *Diatraea saccharalis* dependem de enzimas do tipo tripsina em uma maior extensão do que enzimas do tipo quimotripsina, ou seja, estes dados sugerem que inibidores de tripsina podem ser mais efetivos do que inibidores de quimotripsina nesta espécie.

4 - Inibidores de proteinases.

Os inibidores de proteinases são macromoléculas que estão amplamente distribuídas em animais, microorganismos e principalmente em plantas (RICHARDSON, 1991; BIRK, 1994), onde são encontrados inibidores para quase todos os tipos de enzimas proteolíticas (SAMPAIO *et al.*, 1996).

4.1 - Características gerais dos inibidores de proteinases.

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

Os inibidores protéicos são moléculas geralmente de baixa massa molecular, sendo a 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 (RICHARDSON, 1991).

A massa molecular dessas moléculas varia entre 6 e 50 kDa, e a grande maioria dos inibidores apresenta entre 70 e 90 resíduos de aminoácidos. Aqueles de massa molecular relativamente alta, apresenta-se na forma polimérica, associados em dímeros ou tetrâmeros, cujos monômeros possuem uma massa molecular mínima de aproximadamente 10 kDa (RICHARDSON, 1991; MACEDO & XAVIER-FILHO, 1993).

Esses inibidores são considerados moléculas estáveis, podendo apresentar resistência 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).

Quatro classes de inibidores de proteinases foram estabelecidas de acordo com suas atividades específicas: inibidores de proteinases serínicas; de proteinases cisteínicas; de proteinases aspárticas e de metalo-proteinases.

O número de inibidores de plantas identificados e isolados é grande, sendo os inibidores de proteinases serínicas, os que apresentam melhor caracterização (RYAN, 1990). Nos últimos anos, entretanto, muitos inibidores de proteinases cisteínicas também foram caracterizados (OLIVEIRA, *et al.*, 2003).

4.2 - Inibidores de proteinases serínicas.

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

Os inibidores são agrupados em famílias distintas: Kunitz, Bowman-Birk, Batata I, Batata II, Abóbora, Superfamília Cereal, Ragi 1-2, Taumatina e PR-proteínas, baseado na similaridade de sua seqüência e no mecanismo de ligação a proteína.

Inúmeras pesquisas sobre inibidores de proteinase têm fornecido um entendimento básico sobre o mecanismo de ação que se aplica a maioria dos inibidores da família de serino-proteinases.

Todos inibidores do tipo serínico de plantas são inibidores competitivos e todos eles possuem um mecanismo de ação similar proposto por LASKOWSKI & KATO (1980). A inibição ocorre como consequência da ligação ao sítio ativo (região de ligação do substrato) da enzima ao sítio reativo na superfície do inibidor.

4.2.1 *Adenanthera pavonina*

Adenanthera pavonina é uma espécie vegetal encontrada originalmente na Índia, porém foi introduzida em alguns países como: Porto Rico, Cuba, Jamaica, Venezuela, Costa Rica, Honduras, Estados Unidos e Brasil.

Estudos nutricionais mostraram que um quarto do peso da semente é devido ao óleo e há uma porcentagem elevada de proteínas e uma composição que favorece a digestibilidade para seres humanos e animais domésticos (BALOGUM & FETUGA, 1985, BURKILL, 1966).

Na Polinésia é conhecida como “árvore-alimento”, pois mesmo sendo de consistência dura, as sementes destas árvores são torradas e comidas por crianças e adultos. Pertence à família das Leguminosas, plantas reconhecidas na literatura por possuírem uma grande quantidade de inibidores de proteinases digestivas de insetos (RICHARDSON *et al.*, 1986).

Em relação à distribuição dos inibidores em plantas, sabe-se que as angiospermas dicotiledôneas englobam o maior número de espécies contendo estas macromoléculas, merecendo destaque as famílias Leguminosae e Solenaceae; 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).

5 - Aspectos da nutrição e digestão de insetos.

Os insetos têm como exigências nutricionais básicas aminoácidos, vitaminas e sais minerais (nutrientes essenciais) e carboidratos, lipídeos e esteróides (nutrientes não essenciais), os quais devem ser adequadamente balanceados, especialmente na relação proteína: carboidratos. O consumo e a utilização de alimento constituem condição básica para o crescimento, o desenvolvimento e a reprodução. Desta forma, a quantidade e qualidade do alimento consumido na fase larval afetam a taxa de crescimento, o tempo de desenvolvimento, peso do corpo, sobrevivência, bem como influenciam a fecundidade, longevidade, movimentação e capacidade de competição de adultos (PARRA, 1991).

A criação de insetos, sob condições controladas, é necessária para a realização de pesquisas em muitos campos da Entomologia, sendo que informações básicas da biologia e comportamento de insetos têm servido como guia para o desenvolvimento de certos tipos controle (PARRA, 1979).

No Brasil desde 1970 são utilizadas “dietas artificiais” para a criação da broca da cana-de-açúcar em laboratório, onde os componentes são dosados de tal forma que permitem o fornecimento de nutrientes essenciais ao desenvolvimento da fase larval de *D. saccharalis*. Esses nutrientes são homogeneizados e estabilizados em uma mistura de consistência apropriada, que fornece o desenvolvimento dos insetos (ARAÚJO, 1987).

A digestão é realizada por uma série de enzimas que atuam em seqüência e vão reduzindo os polímeros presentes no alimento (principalmente amido e proteínas) a fragmentos de tamanho cada vez menor. O desempenho de cada estágio de vida do inseto depende basicamente do sucesso do estágio anterior em obter, sintetizar e acumular as substâncias nutricionais em quantidades apropriadas (PARRA, 1991).

De acordo com a Figura 1, que é um diagrama geral do canal alimentar de um inseto 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.

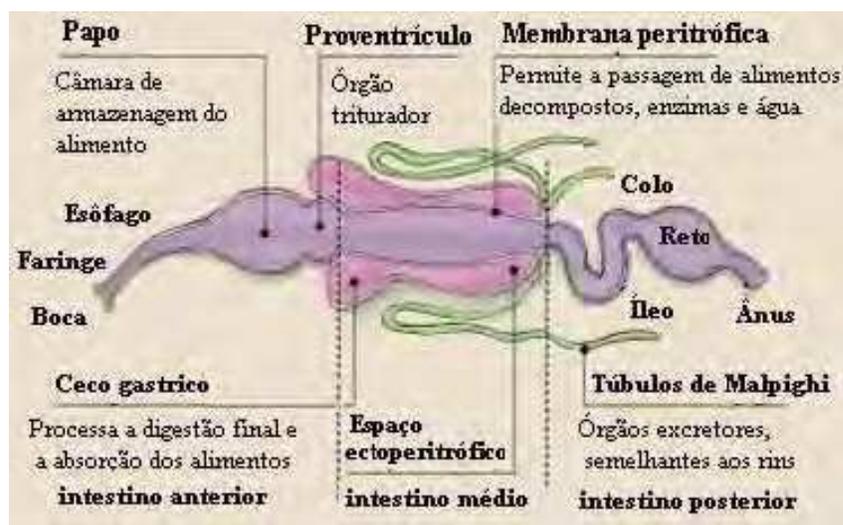


Figura 1: Diagrama do intestino de inseto (adaptado de Terra & Ferreira, 1994).

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 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).

Em 1979, TERRA *et al.* estudaram o processo digestivo de larvas de *Rhynchosciara americana*; e relataram que a tripsina é encontrada no conteúdo luminal, nos espaços endo e ectoperitrófico. Conseqüentemente, a tripsina secretada por células é capaz de atravessar a MP. Já as aminopeptidases não são encontradas dentro da MP (espaço endoperitrófico) e sim no espaço ectoperitrófico, logo elas não atravessam a MP. A amilase tem uma distribuição similar à da tripsina, enquanto que a maltase está restrita às células do IM, principalmente as do ceco intestinal. Com base nessas observações, foi proposto que a digestão inicial ocorre dentro da MP pela ação de enzimas como amilase e tripsina. A digestão intermediária ocorre no conteúdo luminal fora da MP, envolvendo enzimas como a amilase e a aminopeptidase e, a digestão final ocorre na superfície das células do intestino médio, principalmente nas células do ceco intestinal sob ação de aminopeptidases e maltase.

6 - Efeitos dos IPs sobre o desenvolvimento e metabolismo dos insetos.

Os inibidores de proteinases reduzem a atividade proteolítica de enzimas digestivas para um grande número de espécies de insetos pragas de importância econômica (CHRISTELLER & SHAW, 1989; WOLFSON & MURDOCK, 1987).

MACEDO *et al.*, (2003) mostraram que quando larvas de *Anagasta kuehniella* se alimentam de dietas artificiais contendo uma concentração de 1,6% de inibidor de tripsina de sementes de *Peltophorum dubium*, ocasiona uma redução de 66% do peso e 56% na sobrevivência deste inseto.

O crescimento de algumas espécies de insetos é significativamente reduzido pela ingestão crônica destes inibidores incorporados em dietas artificiais (BROADWAY & VILLANI, 1995; JOHNSON *et al.*, 1993). Assim é possível que a presença de inibidores de proteinases limite o consumo de algumas plantas por alguns insetos herbívoros (BROADWAY, 1997).

Estudos desenvolvidos por STEFFENS *et al.* (1978), sobre os efeitos dos inibidores de tripsina de soja no crescimento e metamorfose de *Ostrinia nubilalis* (Hübner), revelaram que a incorporação de 2 a 5% (p/v) do inibidor do tipo Kunitz na dieta artificial inibiu o crescimento larval e atrasou a pupação dos insetos, embora não tenha impedido a conclusão do ciclo vital.

SHUKLE & MURDOCK (1983), estudaram os efeitos do inibidor de tripsina do tipo Kunitz sobre o crescimento de larvas de *Manduca sexta* e revelaram que esse inibidor, quando incorporados na dieta na concentração de 5% (p/v) promoveu atraso no desenvolvimento larval.

Em um trabalho sobre inibidores de proteinases com lagartas de *Spodoptera exigua*, BROADWAY & DUFFEY (1988) compararam os efeitos de dois IPs (inibidor de tripsina de soja e inibidor de proteinase de batata do tipo II). Quando incorporados à dieta artificial, nas concentrações de 0,04375 a 2,5 mg de inibidor por mL de dieta, ambos reduziram significativamente o crescimento e o desenvolvimento das lagartas. A ingestão crônica dos inibidores ocasionou elevação significativa nos níveis de atividade trípica. Segundo os autores, essa superprodução de proteinases decorrentes da presença de inibidores teve um efeito na disponibilidade de aminoácidos necessários à síntese de proteínas essenciais, o que resultou na inibição do crescimento larval.

ELDEN (1995) estudou os efeitos do inibidor de proteinase do tipo Bowman-Birk sobre o crescimento e desenvolvimento de *Hypera postica* (Coleoptera: Curculionidae), observando uma redução no consumo na quantidade de folhas consumidas pelas lagartas.

Os efeitos do inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz, SBTI, sobre o crescimento e proteinases digestivas de *Spodoptera litura* foram estudados por Mc MANUS & BURGESS (1995). Ensaio *in vitro* do inibidor com cada uma das enzimas em seu pH ótimo revelaram que o inibidor foi muito efetivo para retardar a atividade de tripsinas e apresentou um leve efeito sobre a atividade de elastase e quimotripsina e, foi completamente ineficaz sobre as aminopeptidases. A incorporação do inibidor SBTI na dieta de lagartas recém eclodidas, nas concentrações de 0,2 e 0,5% (p/v), retardou a taxa de crescimento quando comparada com lagartas que se alimentaram somente de dieta artificial sem o inibidor. O atraso no crescimento resultou em diferenças de peso que foram observadas durante todo o período de ensaio, sendo correlacionadas à concentração do inibidor. A análise das proteinases digestivas dessas lagartas demonstrou que somente a atividade das tripsinas foi estimulada significativamente, quando alimentadas em dieta contendo SBTI.

Existem inúmeros outros exemplos de inibidores de proteinases ativos contra certas espécies de insetos, tanto em ensaios *in vitro*, nos quais inibem as proteases do intestino dos insetos, como *in vivo*, utilizados em dietas artificiais (ASHOURI *et al.*, 1998; FRANCO *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2005).

7- Biotecnologia de plantas

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, seqüenciado, clonado e expresso, tornando possível o melhoramento de plantas através da transformação genética (HILDER & BOULTER, 1999).

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 (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002; HAQ *et al.*, 2004; FERRY *et al.*, 2004). Na produção de plantas resistentes a insetos, a partir de proteínas vegetais, duas grandes classes são utilizadas para conferir essa resistência: lectinas e inibidores de enzimas digestivas. Grande parte destas pesquisas concentra-se na expressão de inibidores de proteinases em plantas transgênicas (JONGSMA & BOLTER, 1997; SCHULER *et al.*, 1998). Inibidores de proteinases serínicas e cisteínicas têm sido capazes de inibir o crescimento e desenvolvimento de algumas espécies de inseto, principalmente aquelas pertencentes às ordens Lepidoptera e Coleoptera. SCHULER *et al.* (1998) relataram que pelo menos quatorze genes diferentes foram introduzidos em plantas, os quais são em sua grande maioria inibidores de proteinases serínicas de diferentes famílias, tais como, Fabaceae, Solanaceae e Poaceae, atuando principalmente contra lepidópteros.

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 (*Vigna 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. Esse gene também foi utilizado na produção de espécies transgênicas de arroz e batata, com o objetivo de torná-las resistentes a, respectivamente, *Seramia inferens* e *Lacanobia oleracea*, espécies de insetos pertencentes à ordem Lepidoptera (JOUANIN *et al.*, 1998).

Da mesma forma, outros genes também foram transferidos para o tabaco, a maioria codificando inibidores de proteinases serínicas, sendo na grande maioria, efetivos contra insetos

da ordem Lepidoptera, como o inibidor de batata II (PotPI-II) atuando sobre os insetos *Manduca sexta* e *Chrysodeixis eriosoma* (JOHNSON *et al.*, 1989; McMANUS *et al.*, 1994).

O sucesso dessa estratégia depende da execução de todas as etapas: (1) purificação e estudo das propriedades da proteína de defesa; (2) investigação da sua atividade *in vitro* e *in vivo* contra patógenos; (3) determinação da seqüência parcial ou total de aminoácidos da proteína; (4) clonagem de cDNAs e DNAs que codificam-na; (5) estudos da expressão destes genes sob condições normais de desenvolvimento e sob condições de estresse; (6) estudo da expressão dos genes transferidos para verificar se estes estão produzindo as proteínas correspondentes nas plantas alteradas e (7) verificação do aumento da resistência nas plantas transgênicas no campo (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1996).

De LEO *et al.*, (2001), compararam os efeitos da expressão de um único inibidor de proteinase presente em sementes de mostarda (*Brassica napus*), o MTI-2 (inibidor de mostarda) em diferentes plantas (*Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabaccum*) contra três espécies diferentes de lepidópteros: *Plutella xylostella*, *Mamestra brassicae* e *Spodoptera littoralis*. Nesse estudo, o enfoque não foi apenas os efeitos da ingestão de MTI-2 sobre a mortalidade e variação de peso, mas também o conteúdo e a atividade das proteinases intestinais dos insetos, parâmetro importante para determinar o real impacto dessa estratégia de defesa.

Outros inúmeros estudos com inibidores de proteases transgênicos demonstram que os IPs do tipo serínico são efetivos contra lepidópteros (McMANUS *et al.*, 1994; FAN & WU, 2005). O conhecimento detalhado das interações enzima-inibidor e da resposta dos insetos frente à exposição aos inibidores de proteinases é importante, caso esta estratégia de proteção obtenha sucesso.

8 - Adaptação de insetos aos inibidores de proteinases.

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

consiste em um aumento na expressão da enzima inibida. BROADWAY & DUFFEY (1986) mostraram que não há redução da atividade proteolítica das enzimas digestivas de *Spodoptera exigua* e *Heliothis zea*, o que ocorre é a super produção da enzima sensível ao inibidor de proteinase. Para *Lacanobia oleracea*, GATEHOUSE *et al.* (1999), mostraram que a atividade proteolítica do tubo digestivo da larva era aumentada até quatro vezes quando em presença de SKTI (inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz).

O segundo mecanismo utilizado pelos insetos é baseado na síntese e/ou secreção de proteinases menos sensíveis ao inibidor. JONGSMA *et al.* (1995) e BROADWAY (1996) trabalhando com *Spodoptera exigua* e *Heliothis zea* alimentadas com inibidor do tipo II de batata, observaram que as larvas foram capazes de aumentar de 2,5 a 3 vezes a produção de uma proteinase pouco sensível ao inibidor, numa interessante forma de adaptação.

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

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

II - OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do inibidor de tripsina encontrado nas sementes de *Adenantha pavonina* sobre o desenvolvimento de *Diatraea saccharalis*, pretendeu-se:

- Incorporar a proteína isolada de sementes de *A. pavonina* (ApTI) em dietas artificiais e fornecê-las a *D. saccharalis* como única fonte de alimentação e estudar o efeito sobre o mesmo;
- Verificar seu efeito no peso, sobrevivência e parâmetros nutricionais de larvas de quarto ínstar;
- Avaliar se houve alterações no perfil enzimático digestivo, com intuito de elucidar uma possível resposta do inseto ao inibidor presente na dieta.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Espécie vegetal.

As sementes de *A. pavonina* (Mimosaceae) foram coletadas na cidade de Três Lagoas, Estado do Mato Grosso do Sul sendo utilizadas para extração do inibidor de tripsina de *A. pavonina* (ApTI) (MACEDO *et al.*, 2004).



Figura 2 - *Adenanthera pavonina*: árvore, fruto e sementes. (Foto:www.rainforestmagic.com.au).

2 - Inseto.

As larvas de *Diatraea saccharalis* (Figura 3) foram fornecidas pelo setor de Biologia do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP).



Figura 3: *Diatraea saccharalis*: larva e inseto adulto. (Foto: www.ars.usda.gov e www.viarural.com.ar).

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

ApTI é inibidor do tipo Kunitz que apresenta massa molecular relativa de 21 kDa. Este inibidor foi isolado através de métodos clássicos de purificação de proteínas (cromatografia de exclusão molecular e cromatografia de afinidade em coluna de Sepharose Tripsina), segundo o método de RICHARDSON *et al.* (1986) com algumas modificações (MACEDO *et al.*, 2004), como se segue.

3.1 - Obtenção do extrato bruto.

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

3.2 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Sephadex G-75.

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

3.3 - Cromatografia de Afinidade em Sepharose Tripsina.

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

4 - Bioensaio.

Para as larvas neonatas foram oferecidas dietas artificiais (Tabela 1) com concentrações crescentes do inibidor (0,025-0,05%) e sem inibidor como tratamento controle, em tubos de vidro de fundo chato de 2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura, fechados com algodão hidrófugo e mantidos a 25 ± 2 °C, UR $60 \pm 10\%$, fotofase de 14 horas. Cada tratamento foi composto por 15 repetições contendo 5 larvas neonatas em cada tubo (N=75).

Tabela 1: Dieta artificial para *D. saccharalis* (Lepidoptera, Crambidae) (HENSLEY & HAMMOND, 1968).

Componentes	Quantidade
Sacarose	90 g
Caseína	54 g
Sais Wesson	18 g
Germe-de-trigo	54 g
Ácido ascórbico	7,2 g
Nipagin (Metilparahidroxibenzoato)	2,7 g
Cloreto de colina	1,8 g
Aureomicina	1,0 g
Formaldeído (37,2%)	2 mL
Solução vitamínica *	20 mL
Ágar	36 g
Água	450 mL
<i>Solução vitamínica*</i>	
Niacinamida	1 g
Pantotenoto de cálcio	1 g
Riboflavina	0,5 g
Tiamina	0,25 g
Piridoxina	0,25 g
Ácido fólico	0,1 g
Biotina	0,02 g
Vitamina B12 (1000 mg/ mL)	2 mL

* Em 1000 mL de água destilada

5 - Efeito de ApTI – Sobrevivência, peso e índices nutricionais de larvas de quarto ínstar.

Ao atingirem o quarto ínstar de desenvolvimento a sobrevivência e o peso médio das larvas foram determinados. Após o período de alimentação, a dieta restante e as fezes produzidas pelas larvas foram pesadas para a realização dos estudos de consumo e utilização de alimento. Em relação aos índices nutricionais, quatro parâmetros foram analisados: Eficiência de Conversão do alimento Ingerido (ECI), Eficiência de Conversão do alimento Digerido (ECD), Custo Metabólico (CM) e Digestibilidade Aparente (AD), todos se referem ao consumo e utilização do alimento, e foram calculados de acordo com PANIZZII & 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 = alimento não digerido + produtos de excreção

I-F = alimento assimilado

6 - Obtenção das enzimas do fluido intestinal de *D. saccharalis*.

Larvas de quarto ínstar foram imobilizadas em gelo e dissecadas em NaCl 250 mM. Os intestinos médios foram cirurgicamente removidos das larvas com a utilização de pinças, a região do intestino retirada foi a posterior ao proventrículo e anterior aos túbulos de Malpighi. Os intestinos médios obtidos foram homogeneizados e centrifugados a 18.000 g por 10 minutos a 5 °C, os sobrenadantes obtidos (IM) foram imediatamente utilizados para os ensaios enzimáticos, e quando necessário foram armazenados a -20 °C.

7 - Preparação das fezes.

As fezes das larvas de quarto ínstar alimentadas em dieta controle e dieta contendo ApTI a 0,025-0,05% após a separação foram estocadas a -8 °C. Para utilização nos ensaios, foram homogeneizadas em tampão Tris 0,1 M pH 8,0 e centrifugadas a 17.000 g por 10 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes foram imediatamente utilizados nos ensaios bioquímicos.

8 - Determinação da atividade enzimática do tipo tripsina.

A atividade de enzimas do tipo tripsina foi determinada pela hidrólise do substrato específico BApNA (N-a Benzoyl-D-L-Arginine p-Nitroanilide). IM e fezes (20 µg de proteína) das larvas alimentadas em dieta controle e dieta contendo ApTI a 0,05% 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/µg proteína. Esse experimento foi realizado em triplicatas com seus apropriados brancos.

9 - Efeito de ApTI na atividade proteolítica endógena.

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

10 - Análise eletroforética das enzimas de *D. saccharalis*.

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

11 - Análise estatística.

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

IV - RESULTADOS

1 - Efeito de ApTI no desenvolvimento de *D. saccharalis*.

1.1 - Sobrevivência larval.

A percentagem de sobrevivência das larvas de *Diatraea saccharalis* alimentadas com dieta artificial em ausência ou presença de ApTI (0,025 e 0,05%) foi estimada após 24 dias de fornecimento dessa dieta (figura 4). O número de larvas sobreviventes (n=75) na dieta sem ApTI foi estimado como 100% (controle). Foi possível verificar uma redução significativa de 28% na sobrevivência das larvas que foram alimentadas com dieta contendo ApTI 0,05% (p/p).

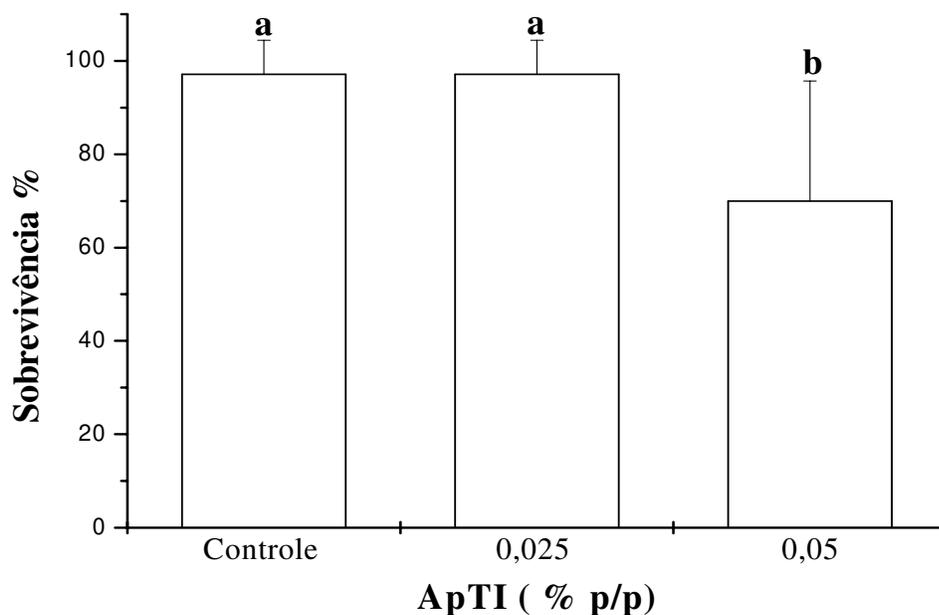


Figura 4: Sobrevivência das larvas de *Diatraea saccharalis* alimentadas em dieta artificial contendo ApTI. Letras iguais não diferem entre si. (ANOVA, $p < 0,05$).

1.2 - Peso médio larval.

A percentagem do peso médio das larvas de *Diatraea saccharalis* alimentadas com dieta artificial em ausência ou presença de ApTI (0,025 e 0,05%) foi estimada após 24 dias de fornecimento dessa dieta (figura 5). O peso médio de larvas sobreviventes na dieta sem ApTI foi estimado como 100% (controle). Foi possível verificar uma redução significativa de 44,3% no peso médio das larvas que foram alimentadas com dieta contendo ApTI 0,05% (p/p).

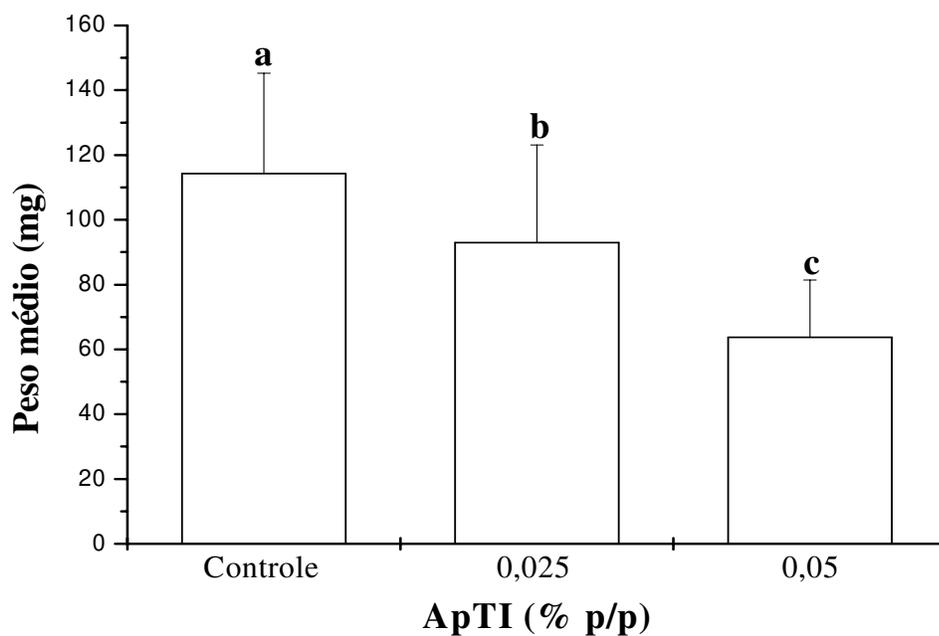


Figura 5: Peso médio das larvas de *Diatraea saccharalis* alimentadas em dieta artificial contendo ApTI. Letras iguais não diferem entre si. (ANOVA, $p < 0,05$).

2 - Análises do consumo e utilização de alimentos.

2.1 - Dieta consumida pelas larvas de quarto ínstar.

A porcentagem de dieta consumida pelas larvas de *Diatraea saccharalis* alimentadas com dieta artificial em ausência ou presença de ApTI (0,025 e 0,05%) foi estimada após 24 dias de fornecimento dessa dieta (figura 6). A dieta consumida pelas larvas sobreviventes na dieta sem ApTI foi estimado como 100% (controle). Não foi possível verificar nenhuma alteração.

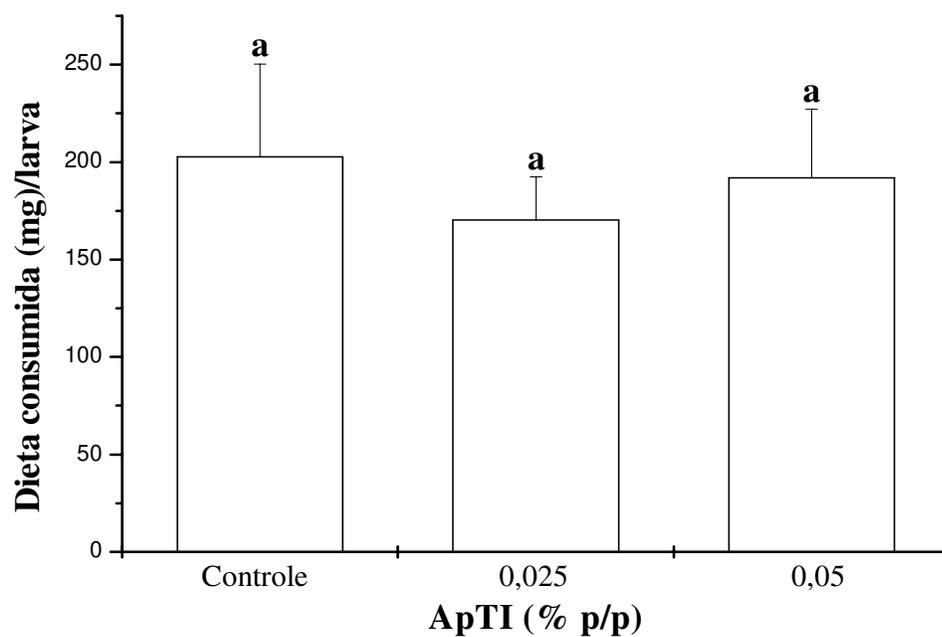


Figura 6: Dieta consumida (mg) por larva de *Diatraea saccharalis* alimentadas em dieta artificial contendo ApTI. Letras iguais não diferem entre si. (ANOVA, $p < 0,05$).

2.2 - Fezes produzidas pelas larvas de quarto ínstar.

A percentagem de fezes produzidas pelas larvas de *Diatraea saccharalis* alimentadas com dieta artificial em ausência ou presença de ApTI (0,025 e 0,05%) foi estimada após 24 dias de fornecimento dessa dieta (figura 7). A quantidade de fezes produzidas pelas larvas sobreviventes na dieta sem ApTI foi estimado como 100% (controle). Foi possível verificar uma redução significativa de 43,7% na quantidade de fezes produzidas pelas larvas que foram alimentadas com dieta contendo ApTI 0,05% (p/p).

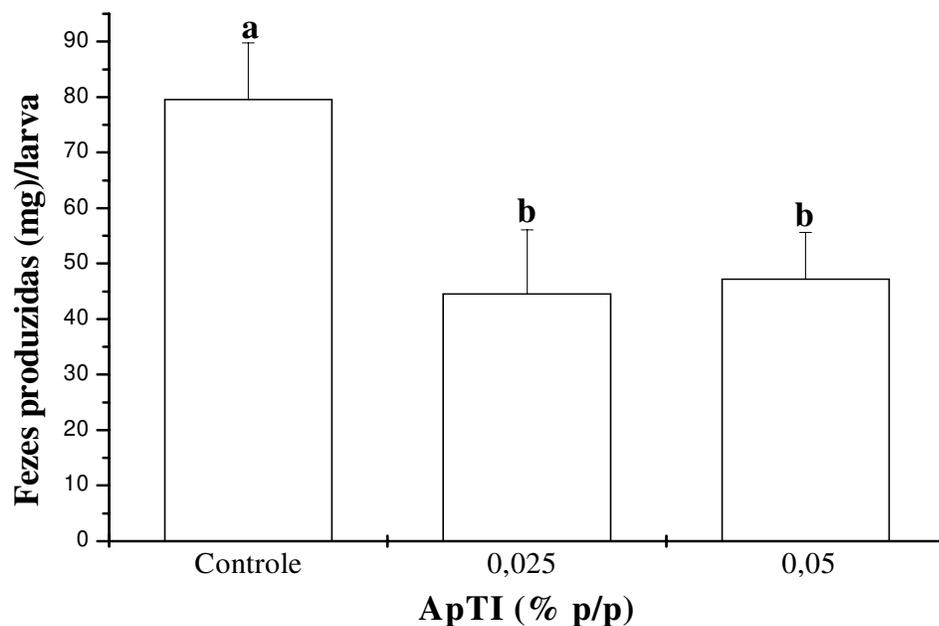


Figura 7: Fezes produzidas (mg) por larva de *Diatraea saccharalis* alimentadas em dieta artificial contendo ApTI. Letras iguais não diferem entre si. (ANOVA, $p < 0,05$).

2.3 - Índices nutricionais.

Os índices nutricionais relacionados na tabela 2 mostram que as larvas alimentadas com dieta contendo ApTI a 0,05% sofreram a influência do inibidor no seu metabolismo quando comparadas às larvas alimentadas em dieta controle.

Tabela 2: Eficiência de Conversão do alimento Ingerido (ECI), Eficiência de Conversão do alimento Digerido (ECD), Custo Metabólico (CM), Digestibilidade Aparente (AD) das larvas de *Diatraea saccharalis* alimentadas em dietas artificiais contendo ApTI ou na sua ausência. Letras iguais não diferem entre si. (ANOVA, $p < 0,05$).

Índices nutricionais	Controle	ApTI 0,05%
ECI (%)	49,88±4,09 a	20,85±2,97 b
ECD (%)	76,05±7,30 a	24,82±5,30 b
AD (%)	65,68±2,40 a	75,92±1,40 a
CM (%)	23,94±7,30 a	75,18±5,30 b

3 - Determinação da atividade trípica.

3.1 - Dosagem da atividade trípica do intestino médio.

Ensaio enzimático foram realizados para avaliar se houve alterações no perfil enzimático digestivo, já que foi observado um efeito negativo no desenvolvimento larval. Os resultados obtidos revelaram que as larvas de *Diatraea saccharalis* alimentadas com ApTI 0,05% apresentaram uma redução significativa na atividade trípica de 49% quando comparado às larvas alimentadas com dieta controle (Figura 8).

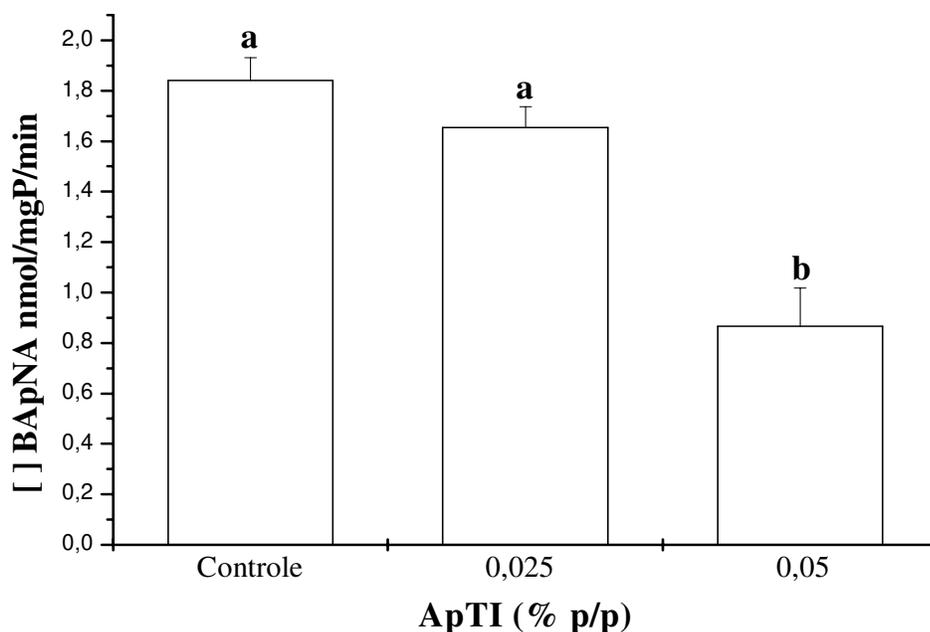


Figura 8: Atividade trípica do fluido intestinal das larvas de 4^o ínstar de *Diatraea saccharalis* (n=3) alimentadas em dieta artificial com e sem ApTI. Letras iguais não diferem entre si (ANOVA, p<0,05).

3.2 - Dosagem da atividade trípica das fezes.

Os resultados obtidos revelaram que as larvas de *Diatraea saccharalis* alimentadas com ApTI 0,05% apresentaram uma redução significativa de 46,6% na atividade trípica quando comparado às larvas alimentadas com dieta controle (figura 9).

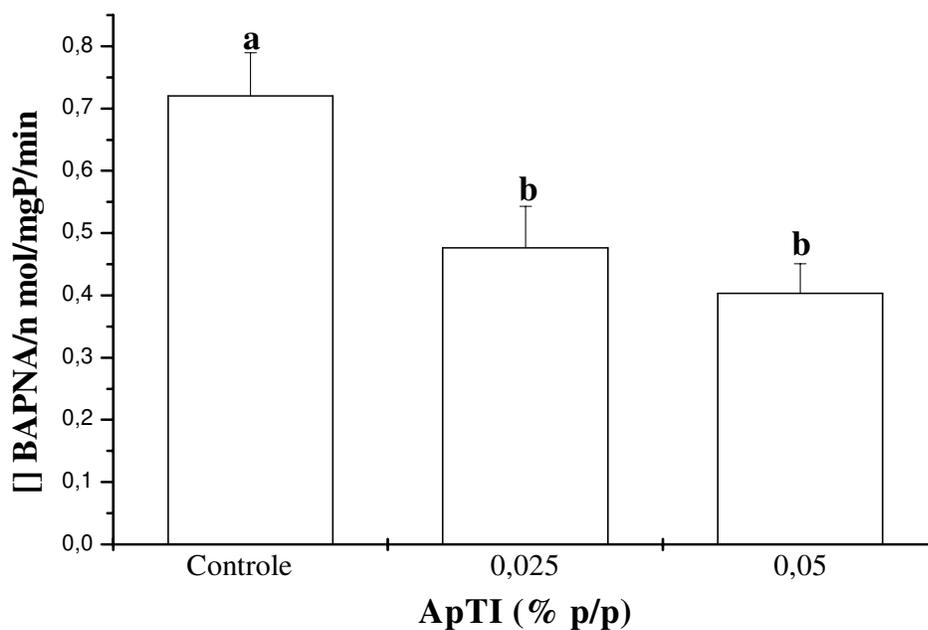


Figura 9: Atividade trípica das fezes das larvas de 4^o ínstar de *Diatraea saccharalis* (n=3) alimentadas em dieta artificial com e sem ApTI. Letras iguais não diferem entre si (ANOVA, p<0,05).

4 - Determinação da atividade proteolítica endógena.

A figura 10 mostra a atividade enzimática residual (%) do fluido intestinal das larvas de *D. saccharalis* alimentadas com dieta controle (sem ApTI) e com dieta contendo ApTI (0,025 e 0,05%) em presença de quantidades crescentes de ApTI (2-6 μg). A atividade residual do fluido intestinal foi analisado através da hidrólise do substrato BapNA e as proteinases dos insetos alimentados ou não com ApTI revelaram-se igualmente sensíveis à ação das diferentes quantidades de ApTI.

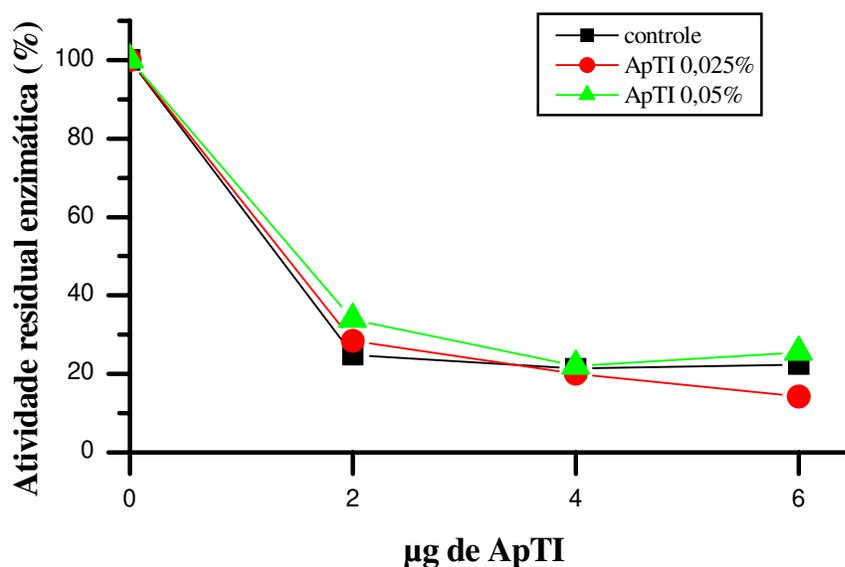


Figura 10: Efeito inibitório de ApTI sobre atividade trípica de intestinos médio de larvas de quarto ínstar de *Diatraea saccharalis*. A atividade foi monitorada utilizando-se BApNA como substrato e leitura 410nm.

5 - Eletroforese do fluido do intestino médio e dos resíduos de fezes das larvas de *D. saccharalis*.

A figura 11 mostra uma eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%), na presença de SDS, com gelatina 0,1% para análise da atividade enzimática do fluido do IM e das fezes das larvas de quarto ínstar alimentadas com dieta artificial sem ApTI (controle) e com ApTI 0,05% em presença de ausência de TLCK, um inibidor específico de tripsina. A seta indica a revelação de bandas correspondentes à atividade tríptica. Os resultados mostram maior atividade tríptica nas amostras de IM de larvas alimentadas na ausência de ApTI do que nas larvas alimentadas em presença de ApTI. Perfil semelhante foi obtido para as amostras das fezes.

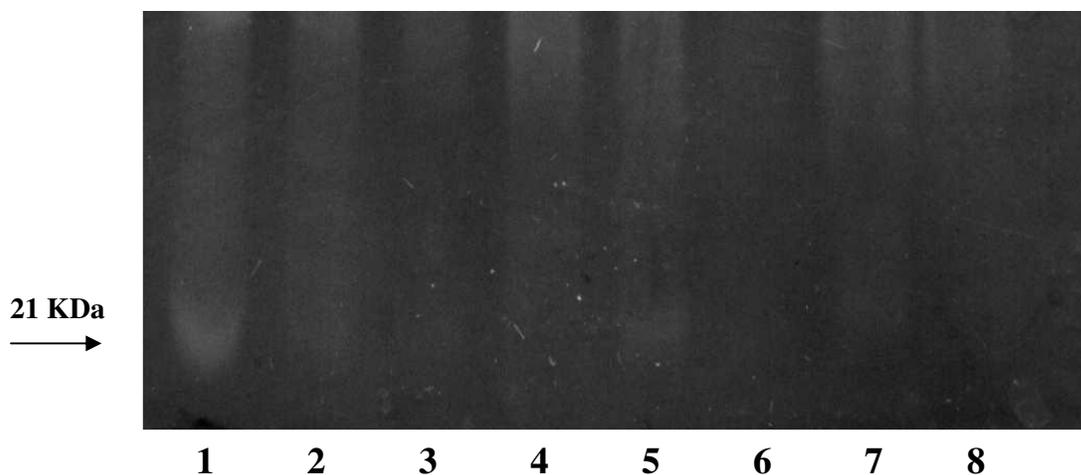


Figura 11: PAGE-SDS (12,5%) com gelatina a 0,1%, do I.M. e das fezes das lavas de quarto ínstar. 1: I.M. das larvas alimentadas em dieta controle; 2: I.M. das larvas alimentadas em dieta contendo controle incubado com TLCK; 3: I.M. das larvas alimentadas em dieta contendo ApTI; 4: I.M. das larvas alimentadas em dieta contendo ApTI incubado com TLCK; 5: fezes das larvas alimentadas em dieta controle; 6: fezes das larvas alimentadas em dieta controle incubado com TLCK; 7: fezes das larvas alimentadas com dieta contendo ApTI; 8: fezes das larvas alimentadas em dieta contendo ApTI incubado com TLCK.

V – DISCUSSÃO

Entre os vários tipos de estresse bióticos que as plantas sofrem, o ataque de insetos é um dos principais causadores de prejuízos às colheitas. Controlar estes insetos geralmente requer o uso de inseticidas químicos, que são tóxicos para o homem e animais domésticos e prejudiciais ao meio-ambiente. O uso de pesticidas químicos tem sido o principal meio de controle de insetos durante as décadas recentes. Devido ao uso indiscriminado destes pesticidas e ao processo de adaptação de insetos, os pesticidas estão sendo considerados inadequados e ineficientes. A descoberta de inibidores de proteinases de plantas que afetam as enzimas digestivas dos insetos, chama a atenção para a possibilidade da utilização dessas enzimas como alvo no desenvolvimento de novas técnicas de controle (RYAN, 1990).

Para verificar a aplicabilidade da ação inseticida de inibidores de proteinases, são utilizados métodos que envolvem ensaios de inibição *in vitro* das proteinases presentes no trato digestivo do inseto pelos inibidores alvo do estudo e testes de alimentação de insetos com dietas artificiais contendo a proteína de estudo e numa fase mais avançada, a produção de plantas transgênicas, onde o aumento de sua resistência à ação deletéria de uma determinada praga seria decorrente da transferência de genes codificantes de inibidores de proteinases.

Em geral, os inibidores de serino-proteinases são efetivos contra insetos da ordem Lepidoptera, já que estas são as enzimas majoritárias detectadas no intestino médio destes insetos (MAZUMDAR-LEIGHTON & BROADWAY, 2001). Neste estudo, o inibidor de tripsina de sementes de *Adenantha pavonina* (ApTI) foi testado *in vivo* contra as larvas de *Diatraea saccharalis*, uma praga nociva ao desenvolvimento adequado de cana-de-açúcar.

O estudo da atividade tóxica de ApTI foi verificado a partir da incorporação do inibidor purificado em dietas artificiais de *D. saccharalis*, com a finalidade de avaliar os parâmetros de crescimento e desenvolvimento do inseto.

A presença de ApTI 0,05% na dieta artificial reduziu significativamente a sobrevivência e o peso médio das larvas de *D. saccharalis* em 28% e 44% respectivamente, quando comparado ao controle (Figuras 4 e 5). Resultados similares foram obtidos por MACEDO *et al.* (2004)

mostrando que ApTI quando incorporado em dietas artificiais a um nível de 0,5% reduz o peso e a sobrevivência respectivamente em 40% e 50% de larvas de *Callosobruchus maculatus*. O inibidor de tripsina e quimotripsina (BTCI) demonstrou um efeito *in vivo* contra *Anthonomus grandis* (FRANCO *et al.*, 2002). A alimentação de *Helicoverpa armigera* por duas gerações com dietas artificiais contendo várias doses de dois inibidores de extratos de folhas de *Capisicum annum* demonstrou alto potencial de inibição em relação ao peso e ao desenvolvimento larval de *Helicoverpa armigera* (TAMHANE *et al.*, 2005). MACEDO *et al.* (2003) quando alimentaram as larvas de *Anagasta kuehniella* com dieta contendo 1% do inibidor de *Peltophorum dubium* observaram uma redução de 50% no peso larval.

Em relação aos efeitos do inibidor no consumo de dieta e na quantidade de fezes produzidas (Figuras 6 e 7, respectivamente), verificou-se que as larvas alimentadas com ApTI 0,05% consumiram a mesma quantidade de dieta que as larvas controle, porém, eliminaram menor quantidade de fezes.

Os resultados obtidos nos ensaios *in vivo* refletem nos valores dos índices nutricionais (Tabela 2). O índice de eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) representa a habilidade do inseto em transformar o alimento ingerido em biomassa. Uma diminuição do ECI indica que uma maior quantidade de alimento está sendo utilizada para energia e pouco está sendo convertido em biomassa (KOUL *et al.*, 2003). O índice de eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) é a estimativa da conversão do alimento que foi assimilado, ou seja, ECD diminui à medida que a proporção de alimento digerido é metabolizado para gerar energia (WHEELER & ISMAN, 2001). Na dieta contendo ApTI 0,05%, os índices ECI e ECD foram menores, significando portanto, que nesta dieta, menor quantidade de alimento foi utilizado 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) das larvas alimentadas com dieta contendo ApTI 0,05% foi maior do que aquele das larvas alimentadas com dieta controle, pois provavelmente, uma quantidade maior de energia proveniente da dieta tenha sido utilizada no processo de degradação do inibidor presente.

Em relação à atividade enzimática das larvas de quarto ínstar tratadas com dietas contendo ApTI mostrou-se decréscimo a atividade trípica do intestino médio e das fezes, confirmado pelo ensaio trípico utilizando BApNA como substrato (Figuras 8 e 9) e por atividade em gel de eletroforese (Figura 11). O inibidor a 0,05% causou uma inibição de 49% das enzimas tripsina-like do intestino médio das larvas de *D. saccharalis* (Figura 8). Isto seria responsável pelo maior efeito de ApTI sobre o desenvolvimento das larvas de *D. saccharalis*, uma vez que o sistema digestivo destas larvas é constituído principalmente de enzimas proteolíticas serínicas do tipo tripsina e quimotripsina. Devido a este efeito inibitório da atividade enzimática do intestino médio, o peso e a sobrevivência das larvas foram afetados.

Esses resultados estão de acordo com aqueles observados para SKTI, capaz de inibir a atividade proteolítica de vários lepidópteros, tais como *Agrotis ipsilo*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens*, *Croriste occidentalis* e coleópteros, tais como, o *Anthonomus grandis* (PURCELL *et al.*, 1992). MACEDO *et al.* (2002) isolou um inibidor de tripsina (DMTI-II) de sementes de *Dimorphandra mollis* que foi tóxico para as larvas de *Callosobruchus maculatus*. GARCIA *et al.* (2004) mostrou uma inibição das proteases intestinais de *D. saccharalis in vitro* por PDTI, sugerindo que este inibidor pode afetar o crescimento e a sobrevivência deste inseto quando incorporado em sua dieta. O inibidor CaTI inibiu as enzimas tripsina-like de *Anthonomus grandis* e *Spodoptera frugiperda*, além de causar alta mortalidade, atraso no desenvolvimento e deformidades das larvas (GOMES *et al.*, 2005).

SRINIVASAN *et al.* (2005) mostrou que havia um decréscimo no peso médio das larvas de *Helicoverpa armigera*, bem como uma inibição das enzimas tripsinas deste inseto, quando as larvas eram alimentadas em dietas contendo o inibidor de tripsina de *Cicer arietinum*. POMPERMAYER (2000) demonstrou que um inibidor de soja do tipo Kunitz foi eficiente contra a atividade proteolítica das enzimas tripsinas das larvas de *D. saccharalis*. Esses resultados também foram obtidos para *H. armigera* (JOHNSTON *et al.*, 1991) e *Spodoptera frugiperda* (PAULILLO *et al.*, 2000).

A figura 10 mostra o ensaio de incubação de crescentes concentrações de ApTI com o IM de larvas alimentadas com dieta artificial. O resultado sugere que as enzimas das larvas alimentadas com dieta artificial quer em ausência ou presença de ApTI continuam sensíveis a ação do inibidor quando incubado no ensaio.

Numerosos inibidores de plantas, efetivos contra enzimas digestivas de insetos, são conhecidos (BODE & HUBER, 2000; FRANCO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002). O papel destes inibidores como componentes defensivos contra predadores foi estudado inicialmente em 1947 quando MICKEL & STANDISH, observaram que as larvas de alguns insetos foram incapazes de se desenvolver em produtos de soja. Um posterior trabalho mostrou que inibidores de tripsina foram tóxicos para larvas de *Tribolium confusum* (besouro da farinha) (LIPKE *et al.*, 1954). Seguindo estes estudos vários grupos de pesquisadores investigaram essas proteínas como candidatas para novas estratégias de controle de pragas. Muitos excelentes trabalhos têm sido publicados relatando os benefícios econômico e ambiental de colheitas transgênicas resistentes a insetos praga (FERRY *et al.*, 2006; JAMES 2005). Uma abordagem bem sucedida foi produzir plantas que expressam, por exemplo, inibidores de tripsina que conferem resistência contra insetos (HILDER *et al.*, 1987). Essa abordagem beneficiará o conhecimento sobre as propriedades que diferem entre os grupos de insetos e a distribuição das enzimas digestivas dos insetos que determinam se as enzimas alvo no processo digestivo são ou não susceptíveis aos inibidores de proteases.

Evidências bioquímicas e moleculares disponíveis indicam que alguns insetos, tais como, *Spodoptera littoralis*, se adaptam à presença de inibidores de proteases devido a uma super produção de enzimas digestivas existentes (DE-LEO *et al.*, 2001), visto que, *S. frugiperda* consegue se adaptar ao inibidor de proteinase de soja por mudança da expressão da atividade trípica e quimotríptica (PAULILLO *et al.*, 2000). Outros insetos ainda podem seletivamente induzir a produção de proteinases insensíveis ao inibidor, como observado no besouro do Colorado, *Spodoptera exigua*, e outras espécies de insetos (BOLTER & JONGSMAN, 1995; CLOUTIER *et al.*, 2000). A proteólise digestiva mediada por fragmentação proteolítica direta é outra estratégia usada pelos insetos para minimizar os efeitos adversos das proteínas de defesas de plantas na digestão alimentar e obtenção de nutrientes (MICHAUD *et al.*, 1995; ZHU-SALZMAN *et al.*, 2003). Recentes trabalhos sugerem que insetos podem sobrepujar os efeitos deletérios dos inibidores de proteinases por sintetizar diferentes proteinases que são insensíveis aos inibidores (PAULILLO *et al.*, 2000; BRITO *et al.*, 2001; VOLPICELLA *et al.*, 2003). Nossos resultados sugerem que *D. saccharalis* não consegue se adaptar ao inibidor, pelo menos até o quarto ínstar da primeira geração. Larvas de quarto ínstar tratadas em dietas contendo ApTI

mostraram decréscimo no desenvolvimento de *D. saccharalis*. Em adição, grande parte da atividade trípica das larvas alimentadas com ApTI foi sensível ao inibidor, indicando que o mesmo apresenta uma atividade tóxica em relação a *D. saccharalis*. Estudos adicionais de ApTI são requeridos para confirmar o potencial biotecnológico de ApTI contra a broca-da-cana.

VI - CONCLUSÕES

1. ApTI influencia o desenvolvimento e conseqüentemente reflete na redução do crescimento da população da broca-da-cana;
2. ApTI quando incorporados em dietas artificiais reduzem o peso médio larval e a sobrevivência das larvas de *Diatraea saccharalis*;
3. As enzimas de tripsina de *Diatraea saccharalis* são efetivamente inibidas por ApTI;
4. Esses resultados sugerem que ApTI apresenta grandes possibilidades de ser utilizado na obtenção de variedades de plantas resistentes a esta praga, mas ainda serão necessários estudos posteriores para melhor entender o seu mecanismo de ação.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, J. R. Guia prático para criação da broca da cana-de-açúcar e de seus parasitóides em laboratório. **Piracicaba: Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar**, p. 36. 1987.
- ASHOURI, A.; OVERNEY, S.; MICHAUD, D.; CLOUTIER, C. **Fitness and feeding are affected in the two-spotted stinkbug, *Perillus bioculatus*, by the cysteine proteinase inhibitor, oryzacystatin I.** *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 38, p. 74-83. 1998.
- BALDWIN, I.T. & PRESTON, C.A. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. **Planta**, v. 208, p. 137-145. 1999
- BALOGUN, A.M. & FETUGA, B.L. Fatty acid composition of seed oils of some members of the Meliaceae and Combretaceae families. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 62, n. 33, p. 529-531. 1985.
- BARRET, A.J.; RAWLINGS, N.D.; DAVIES, M.E.; MACHLEIDT, W.; SALVESEN, G.; TURK, V. Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. **Proteinases inhibitors**. Elsevier Amsterdam, p. 515-569. 1986.

BASTOS, E. Cana-de-açúcar o verde mar de energia. **Coleção Brasil Agrícola. São Paulo: Ícone**, p.130. 1987.

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

BENTHALL, A.P. The trees of Calcutta. **Thacker Spink & Co LTD.**, p. 513. 1946.

BIRK, Y. Protein proteinase inhibitors in legume seeds. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 44, p. 26-30. 1994.

BODE, W. & HUBER, R. Natural proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 204, p. 433-451. 1992.

BODE, W. & HUBER, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **Biochimica Biophysica Acta**, v. **1477**, p. 241–252. 2000.

BOLTER, C.J. & JONGSMAN, M.A. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase-inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. **Journal of Insect Physiology**, v. 41, p. 1071-1078. 1995.

- BRITO L.O.; LOPES, A. R.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA- FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediate by the synthesis of new proteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.128B, p.365-375. 2001.
- BROADWAY, R.M. & DUFFEY, S.S. The effect of dietary protein on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, v. 32, p. 673-680. 1986.
- BROADWAY, R.M. & DUFFEY, S.S. The effect of plant protein quality on toxicity of plant proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 34, p. 1111-1117. 1988.
- BROADWAY, R.M. & VILLANI, M.G. Does host-range influence susceptibility of herbivorous insects to nonhost plant proteinase-inhibitors? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.76, n.3, p.303-312. 1995.
- BROADWAY, R. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 32, p. 39-53. 1996.
- BROADWAY, R.M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, p. 855-874. 1997.

BRZIN, J. & KIDRIC, M. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v.13, p. 420-467. 1995.

BURKILL, I.H. A dictionary of the economic products of the Malay Peninsula. **Governments of Malaysia and Singapore**, v. 1 e 11, p. 2444. 1966.

CÂMARA, G.M. & OLIVEIRA, E.A.M. Produção de cana-de-açúcar. Piracicaba: FEALQ, p.242. 1993.

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.

CHRISTELLER, J.T. & SHAW, B.D. The interaction of a range of serine proteinase inhibitor with bovine trypsin and *Costelytra zealandica* tripsin. **Insect Biochemistry**, v. 19, n. 3. p. 233-241. 1989.

CLOUTIER, C.; JEAN, C.; FOURNIER, M.; YELLE, S.; MICHAUD, D. Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata*, compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over-production of insensitive proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 44, p. 69-81. 2000.

DEGASPARI, N.; MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M.; ARAÚJO, J.R.; ALMEIDA, L.C. Predação e parasitismo de ovos de *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 22, p. 785-792. 1987.

DE LEO, F.; BONADÉ-BOTTINO, M.A; 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.

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

DURANTI, M. & GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, v. 53, p. 31-45. 1997.

ELDEN, T.C. Selected proteinase inhibitor effects on alfafa weevil (Coleoptera: Cruculionidae) growth and development. **Journal of Economic Entomology**, v. 88 (6), p. 1586-1590. 1995.

ERLANGER, B.F.; KOLOWSKY, N.; COHEN, N. Preparation and properties of two new chomogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 95, p. 271-278. 1961.

- FAN, S.G. & WU, G.J. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 46, 273-292. 2005.
- FERNANDES, K.V.S.; SABELLI, P.A.; BARRATT, D.H.P.; RICHARDSON, M.; XAVIER-FILHO, J.; SHEWRY, P.R. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase - inhibitors. **Plant Molecular Biology**, v. 23, 215-219. 1993.
- FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.; GATEHOUSE, A.M.R. Plant-insect interactions molecular approaches to insect resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p.155-161. 2004.
- FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P.; GATEHOUSE, A.M.R. Transgenic plants for insect pest control. A forward looking scientific perspective. **Transgenic Research**, v.15, p. 13–19. 2006.
- FRANCO, O.L.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; SALES, M.P.; MELLO, L.V.; OLIVEIRA A.S.; RIGDEN, D.J. Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*. **Proteins**, v. 49, p. 335–341. 2002.
- FRANCO, O.L.; SANTOS, R.C.; BATISTA, J.A.; MENDES, A.C.; ARAÚJO, M.A.M.; MONNERAT, R.G.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; FRIETAS, S.M. Effects of black-eyed pea

trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 3, p. 343-349. 2003.

GALLO D. Pragas da cana-de-açúcar. **Ribeirão Preto: Copereste**, p.23. 1968.

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. **The Protein Journal**, v. 23, p. 343-350. 2004.

GARCIA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; SEGURA, A.; MORENO, M.; CASTAGNARO, A.;
TITARENKO, E.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P.; PINHEIRO, M.; DIAZ, I.
Engineering plants against pathogens: A general strategy. **Field Crops Research**, v. 45, p. 79-84. 1996.

GATEHOUSE, L.N.; SHANNON, A.L.; BURGESS, E.P.J.; CHRISTELLER, J.T.
Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitor in diet. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 11, p. 929-944. 1997.

GATEHOUSE, A.M.R.; NORTON, E.; DAVISON, G.M.; BABBE, S.M.; NEWELL, C.A.;
GATEHOUSE, J.A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*: effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, p. 545-558. 1999.

GEOFFROY, P.; LEGRAND, M.; FRITING, B. Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 3, p. 327-333. 1990.

GIRARD, C.; MÉTAYER, M.L.; BONADÉ-BOTINO, M.; DELEGUÈ, M.P.; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, p. 229-237. 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 Physiology**, v. 116, p. 393-401. 1998.

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

GUANZIROLI, C. E. Agronegócio no Brasil, perspectivas e limitações. Textos para discussão (TD 186). 2006.

HALL A. E.; SINGH B. B.; EHLERS J. D. Cowpea breeding. **Plant Breeding**. v.15, p.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. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 431, p. 145-159. 2004

HAYWARD, K.J. A broca da cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, v. 22, n. 11, p. 69-74. 1943.

HENSLEY, S.D.; HAMMOND, A..M. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. **Journal of economic entomology**, v. 6(6), p. 1742-1743. 1968.

HERRERA, V.É.A. Competitividade da Agroindústria Sucroalcooleira do Brasil e o Mercado Internacional: Barreiras e Oportunidades. XLIII CONGRESSO DA SOBER 2005.

HIBBETTS, K.; HINES, B.; WILLIAMS, D. An overview of proteinase inhibitors. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 13, p. 302-308. 1999.

HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOUTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v. 330, p. 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.

JAMES, C. Preview: Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops. **ISAAA Briefs**, v. 34. 2005.

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

JOHNSON, K.A.; GATEHOUSE, J.A.; ANSTEE, H. Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Physiology**, v. 39, p. 657-664. 1993.

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

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

JONGSMA, M.A; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of proteinase activity

insensitive of inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p. 8041-8045. 1995.

JONGSMA, M.A. & BOLTER, C. The adaptation of insectos to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, n.10, p. 885-895, 1997.

JOUANIN, L.; BONADE-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v. 131, p. 1-11. 1998.

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). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, p. 7271-7275. 2003.

LASKOWSKI, M.J. & KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 49, p. 593-626. 1980.

LAWRENCE, P.K. & KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 93-109. 2002.

LEHANE, M.J. Peritrophic matrix structure and function. **Annual Review of Entomology**, v. 42, p. 525-550. 1997.

LIPKE, H.; FRAENKEL, G.S.; LIENER, I.E. Effects of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 2, p. 410-415. 1954.

MACEDO, M.L.R. & XAVIER-FILHO, J. Purification and partial characterization of trypsin inhibitors from seeds of *Clitoris ternatea*. **Journal of the Science of Food Agriculture**, v. 58, p. 55-58. 1993.

MACEDO, M.L.R.; MELLO, G.C.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MATOS, D.G.G. Effect of trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 891-898. 2002.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; CABRINI, E.C.; 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). **Biochimica Biophysica Acta**, v. 25527, p. 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.

- MACHUKA, J.S.; OKEOLA, O.G.; CHRISPPEELS, M.J.; JACKAI, L.E.N. The African yam bean seed lectin affects the development of the cowpea weevil but does not affect the development of larvae of the legume pod borer. **Phytochemistry**, v.53, p. 667-674.2000.
- 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 Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, p. 645-657. 2001.
- McMANUS, M.T.; WHITE, D.W.R.; McGREGOR, P.G. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. **Transgenic Research**, v. 3, p. 50-58. 1994.
- McMANUS, M.T. & BURGESS, E.P.J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**, v. 41, p. 731-738. 1995.
- MICHAUD, D.; BERNIER-VADNAIS, N.; OVERNEY, S.; YELLE, S. Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, p. 1041-1048. 1995.
- MICHAUD, D. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. **Trends in Biotechnology**, v. 15, p. 4-6. 1997.

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

OLIVA, M.L.V.; GRISOLIA, D.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. Serine and SH-proteinase inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* beans. **Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 767-770. 1987.

OLIVEIRA, A.S.; PEREIRA, R.A; LIMA, L.M.; MORAIS, A.H.A.; MELO, F.R.; FRANCO, O.L.; BLOCH JR., C.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; SALES, M.P. Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the algaroba tree (*Prosopis juliflora* D. C.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 72, p. 122-132. 2002.

OLIVEIRA, A.S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M.P. Cysteine proteinase and cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.46 (1), p. 91-104. 2003.

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.

PARANHOS, S.B. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. Campinas: Fundação Cargil, p. 856. 1987.

PARRA, J.R.P. *Biologia dos insetos*. Piracicaba. ESALQ/USP, Departamento de Entomologia, p. 383. 1979.

PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PANIZZU, A.R.; Parra, J.R.P. (Eds). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, cap.2, p. 9-65. 1991.

PAULILLO, L.C.M.; LOPES, A.R.; CRISTOFOLETTI, P.T.; PARRA, J.R., TERRA W.R; SILVA-FILHO, M.C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, v.93, nº 2. 2000.

PETERS, W. Peritrophic membranes. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg In **Zoo Physiology**, v. 30, p.238. 1992.

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

POMPERMAYER, P. Estudo *in vivo* e *in vitro* da ação de inibidores de proteinase de soja sobre o desenvolvimento e atividade das proteinases intestinais de larvas da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*)(Fabr., 1794) (Lepidóptera- Crambidae) a broca da cana-de-açúcar. Piracicaba, p.70. Tese (mestrado)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 2000.

POPELKA, J.C.; TERRY, N.; HIGGINS, T.J.V. Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? **Plant Science**, v. 167, p. 195-206. 2004.

PURCELL, J.P.; GREENPLATE, J.T.; SAMMONS, R.D. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 1, p. 41-47. 1992

RICHARDSON, M.; CAMPOS, F. A. P.; XAVIER-FILHO, J.; MACEDO, M. L. R.; MAIA, G. M. C.; YARWOOD, A. The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin isoinhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian carolina tree *Adenanthera pavonina* (L.). **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 872, p. 134-140. 1986.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: *Methods in Plant Biochemistry*. (Dey, P.M. & Harborne, J.B. eds). **Academic Press New York**, v. 5. 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. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 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. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.103, p. 945-950. 1992.
- SAMPAIO, C.A.M.; OLIVA, M.L.V.; SAMPAIO, M.U.; BATISTA, L.F.C.; BUENO, N.R.; TANAKA, A.S.; AUERSWALD, A.; FRITZ, H. Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and enzymes. **Immunopharmacology**, v. 32, p. 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.
- SHUKLE, R. H. & MURDOCK, L. L. Lipoxygenase, trypsin inhibitor and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). **Environmental Entomology**, v.12, p. 787-791. 1983.
- SIN, S.F. & CHYE, M.L. Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. **Planta**, v. 219, p. 1010-1022. 2004.
- SINGH, S.R. & NTARE, B.R. Development of improved cowpea varieties in Africa. In S.R. Singh and K.O. Chichester: John Wiley & Sons. Rachie (Eds) **Cowpea Research, Production and Utilization**, p. 106–15. 1985.

SOUZA, E.M.T.; MIZUTA, K.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **Phytochemistry**, v. 39, p. 521-525. 1995.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; GATEHOUSE J. A.; GUPTA, V. S. A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. **Plant Molecular Biology**, v. 57, p. 359–374. 2005.

STEFFENS, R.; FOX, F. R.; KASSELL, B. Effect of trypsin inhibitors on growth and metamorphosis of corn borer larvae *Ostrinia nubilalis* (Hubner). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.26, p. 170-174. 1978.

TAMHANE, V. A.; CHOUGULE, N. P.; GIRI, A. P.; DIXIT, A. R.; MOHINI N. SAINANI, M. N.; GUPTA, V. S. *In vivo* and *in vitro* effect of *Capsicum annum* proteinase inhibitors on *Helicoverpa armigera* gut proteinases. **Biochimica et Biophysica**, v. 1722 (2), p. 156-167. 2005.

TANAKA, A.S.; SAMPAIO, M.U.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; NOVELLO, J.C.N.; OLIVA, M.L.V.; FINK, E.; SAMPAIO, C.A.M. Purification and primary structure determination of a Bowman-Birk trypsin inhibitor from *Torresea cearensis* seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v. 378, p. 273-281. 1997.

TERRA, W.R.; FERREIRA C; De BIANCHI, A.G. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara Americana* and its physiological significance. **Journal of Insect Physiology**, v. 25, p. 487–494. 1979.

TERRA, W.R. & FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 109b, p. 1-62. 1994.

TERRA, W.R. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 47, p. 47-61. 2001.

VALSECHI, O.; OLIVERA, E.R. DE; BARBIN, D.; NOVAES, F.V. Estudos sobre alguns efeitos da broca (*Diatraea saccharalis*) na cana-de açúcar e seus reflexos na indústria açucareira. Piracicaba, p. 142. Tese (Livre-Docência), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 1976.

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

VENDRAMIM, J.D. Técnicas para avaliação da infestação de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera- Pyralidae) em cultivares de cana-de-açúcar, com base no complexo broca - podridões. Piracicaba, p. 156. Tese (Livre-Docência) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 1987.

- VOLPICELLA, M., CECI, L.R., CORDEWENER, J., AMERICA, T., GALLERANI, R., BODE, W., JONGSMA, M.A., BEEKWILDER, J. Properties of purified gut Trypsin from *Helicoverpa zea* adapted to proteinase inhibitors. **The Journal of Biochemistry**, v. 270, p. 10-19. 2003.
- WHEELER, D.A. & ISMAN, M.B. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 98, p. 9-16. 2001.
- WOLFSON, J.L. & MURDOCK, L.L. Suppression of larval Colorado beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.44, p.235-240. 1987.
- 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*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 37, p. 1139-1143. 1989.
- ZHU-SALZMAN, K.; KOIWA, H.; SALZMAN, R.A.; SHADE, R.E.; AHN, J.E.. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, v. 12, p. 135-145. 2003.