



**VINICIUS DE OLIVEIRA RAMOS**

**INIBIDOR DE TRIPSINA DE *Spodoptera*  
*frugiperda*: EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE  
MAMONA, PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E  
ATIVIDADE BIOLÓGICA**

**LAVRAS - MG**

**2016**

**VINICIUS DE OLIVEIRA RAMOS**

**INIBIDOR DE TRIPSINA DE *Spodoptera frugiperda*: EXTRAÇÃO DE  
FOLHAS DE MAMONA, PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE  
BIOLÓGICA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk  
Orientadora

Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos  
Prof. Dr. Geraldo Andrade Carvalho  
Prof. Dr. Alberto José Cavalleiro  
Coorientadores

**LAVRAS - MG**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Ramos, Vinicius de Oliveira.

Inibidor de tripsina de *Spodoptera frugiperda*: extração de folhas de mamona, purificação, identificação e atividade biológica / Vinicius de Oliveira Ramos. – Lavras : UFLA, 2016.

111 p. : il.

Tese (doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientadora: Adelir Aparecida Saczk.

Bibliografia.

1. *Ricinus communis*. 2. Ricinina. 3. Manejo integrado de pragas.  
I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**VINICIUS DE OLIVEIRA RAMOS**

**INIBIDOR DE TRIPSINA DE *Spodoptera frugiperda*: EXTRAÇÃO DE FOLHAS DE MAMONA, PURIFICAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA**

***TRYPSIN INHIBITOR OF Spodoptera frugiperda: CASTOR LEAVES EXTRACTION, PURIFICATION, IDENTIFICATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY***

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 16 de setembro de 2016.

Profa. Dra. Dejana Santos Alves  
Prof. Dr. Matheus Puggina de Freitas  
Dr. Rogério Antônio Silva  
Profa. Dra. Silvana Marcussi

UFTPR/Campus Santa Helena  
UFLA  
EPAMIG Sul/EcoCentro  
UFLA

Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk  
Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2016**

*A quem mais me incentivou,  
mesmo ausente . . .*

## AGRADECIMENTOS

Como agradecer a tantos colaboradores da forma mais justa e em menos linhas que o trabalho em si?

Agradeço à UFLA, aos Departamentos de Química e de Entomologia, ao CNPq pela bolsa concedida, à FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro, ao Instituto de Química da UNESP - Araraquara, assim como ao Núcleo de Biossíntese, Bioensaios e Ecofisiologia – NuBBE por permitir a utilização de seus laboratórios.

Não tenho palavras para agradecer ao Professor Custódio Donizete dos Santos que me orientou por todo o Mestrado e por grande parte do Doutorado antes de se aposentar. Tudo que sou hoje profissionalmente é fruto dos profundos questionamentos, das justas exigências e do imenso conhecimento que ele sempre fez questão de compartilhar. Sempre presente seja para uma palavra amiga, um conselho ou um puxão de orelha para cada ocasião.

Agradeço à Professora Adelir Aparecida Saczk, que primeiro me auxiliou durante a etapa mais importante desta pesquisa e depois assumiu a responsabilidade de me orientar saindo de sua área de *expertise*, mas sempre me incentivando a prosseguir, me apoiando e buscando todos os meios ao seu alcance para que a tese fosse concluída. Obrigado por sua paciência.

Agradeço aos meus Coorientadores Professor Geraldo Andrade Carvalho pelo suporte e supervisão nos bioensaios e Professor Alberto José Cavalheiro pelo auxílio nas análises cromatográficas e espectrométricas, ambos ajudaram a dar coesão e coerência nesta tese multidisciplinar

Sem o apoio da minha família com certeza essa caminhada seria impossível, por isso agradeço a José, meu pai, Patrícia, Aluizio e Walquíria, meus irmãos, minha tia Vitoria pelo apoio moral e força para me manter no

rumo mesmo quando tudo estava obscuro, minha avó Maria Nazaré pelo carinho e sabedoria.

A minha companheira Samantha, que me conheceu no meio do caminho desse doutorado e mesmo sabendo das dificuldades permaneceu ao meu lado, me apoiando e incentivando, o meu mais carinhoso obrigado.

Agradeço aos novos amigos que aprenderam a suportar minhas manias e defeitos e também me ajudaram a concluir essa etapa: Estela, Ana Paula, Anderson, Mayara, Samira, Tamara, Xulita, Dejene, Luciana, Valquíria, Mariana, Lucas e tantos outros que me ajudaram.

Agradeço a todos que trabalham comigo e fazem parte da equipe Care Systems por me ajudarem sempre que possível.

Agradeço aos membros da banca de qualificação que me aconselharam e deixaram seu precioso conhecimento à minha disposição, Professores Dr. Geraldo Andrade Carvalho, Dra. Luciana Lopes Silva Pereira e Dr. Sérgio Scherrer Thomasi.

Por fim, agradeço aos membros da banca avaliadora desta tese de doutorado, Dr. Rogério Antônio Silva e Professores Dra. Dejene Santos Alves, Dr. Matheus Puggina de Freitas e Dra. Silvana Marcussi.

E a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

## RESUMO

Atuando em conjunto com o desenvolvimento tecnológico que aumenta a produtividade nas lavouras, estão os estudos para controle dos organismos daninhos. Dentre todos, os métodos tradicionais que se utilizam de agroquímicos para controlar suas populações vem perdendo efeito no controle dos insetos herbívoros. Isso, em grande parte, se deve ao uso indiscriminado e sem acompanhamento técnico adequado. Estes fatores, associados à prática de monocultura, têm selecionado populações de insetos resistentes aos defensivos agrícolas. A busca por novos métodos de controle que não afetam fisiologicamente a população de insetos benéficos e com menor impacto ambiental se faz necessária neste contexto. Neste trabalho, foi realizada a investigação de inibidores de tripsina que atuam reduzindo a eficiência na absorção de aminoácidos por lagartas da espécie *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Para tanto, foram desenvolvidos métodos de otimização quimiométricas para a extração, purificação, identificação e caracterização estrutural da molécula inibidora e avaliação de como o inseto é afetado durante seu desenvolvimento além do estudo da forma como este composto atua especificamente na tripsina da lagarta-do-cartucho. A extração do inibidor foi otimizada através de quimiometria, nas condições de 1 g farinha de folhas de mamona (FFM) em 48,6 mL de etanol 71,7%, extraído por 60 minutos em banho ultrassônico, a 40 °C, com uma reextração nas mesmas condições produziu extrato com atividade antitriptica de 94.837,14 mUTI g<sup>-1</sup>. O extrato de FFM foi purificado em HPLC preparativo e dois compostos com inibição de tripsina aparente. Estes dois compostos foram identificados como adenosina e ricinina, contudo após purificação, apenas ricinina causou inibição em tripsina *in vitro* com 103,21 mUTI mg<sup>-1</sup>. O extrato foi adicionado à dieta e oferecido às lagartas, resultando em redução da digestão, uma vez que todos os tratamentos apresentaram maior concentração de proteínas nas fezes quando comparados ao controle.

**Palavras-chave:** *Ricinus communis*. *Spodoptera frugiperda*. Ricinina. Inibidor de tripsina.



## ABSTRACT

Acting in collaboration with the technological development, which increases crop productivity, are the studies on control of harmful organisms. Among all methods used, the traditional methods that employ agrochemicals to control its populations have been losing effect in the control of herbivore insects. This is due to, in great part, the indiscriminate and without adequate technical monitoring use. These factors, associated with the practice of monoculture, has selected populations of insects resistant to agricultural pesticides. The search for new control methods that do not physiologically affect populations of beneficial insects and present lower environmental impact is necessary in this context. In this work, we conducted an investigation of trypsin inhibitors that act reducing the absorption efficiency of amino acids by caterpillars of the species *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). For this, chemometric optimization methods were developed for the extraction, purification, identification and structural characterization of the inhibitory molecule, and evaluation of how the insect is affected during its development, in addition of studying the from in which this compound acts, specifically, over the trypsin of the armyworm. The extraction of the inhibitor was optimized by means of chemometrics, un der conditions of 1 g of castor bean leaf meal (CBLM) in 48.6 mL of ethanol 71.7%, extracted by 60 min of ultrasonic bath at 40°C, with re-extraction in the same conditions, which produced extract with anti-trypsin activity of 94,837.14 mUTI g<sup>-1</sup>. The CBLM extract was purified in prep HPLC, and two compounds with apparent trypsin inhibition, identified as adenosine and ricinine. However, after purification, only ricinine inhibited trypsin *in vitro*, with 103.21 mUTI g<sup>-1</sup>. The extract was added to the diet offered to the caterpillars, resulting in a reduction of digestion, since all treatments presented higher concentration of proteins in the feces when compared to the control.

**Keywords:** *Ricinus communis*. *Spodoptera frugiperda*. Ricinine. Trypsin inhibitor.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo geral .....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
3.1	Lagarta-do-cartucho do milho, <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) .....	15
3.2	Mamona .....	16
3.3	Interação inseto x planta .....	18
3.4	Inibidores de Proteinases .....	22
3.5	Métodos de prospecção de metabólitos bioativos em plantas .....	24
3.6	Uso de análises quimiométricas na otimização da extração de compostos bioativos .....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	29
4.1	Coleta das folhas de mamona e preparo da farinha de folhas de mamona (FFM) .....	29
4.2	Ensaio <i>in vitro</i> de inibição de tripsina de <i>S. frugiperda</i> .....	29
4.3	Otimização da extração do inibidor de tripsina de <i>S. frugiperda</i> presente em FFM.....	32
4.3.1	Planejamento fatorial 2 <sup>4</sup> .....	32
4.3.2	Otimização dos parâmetros para extração do inibidor de tripsina de <i>S. frugiperda</i> presente em FFM por planejamento composto central 2 <sup>2</sup> (CCD 2 <sup>2</sup> ) .....	35
4.4	Purificação e identificação do inibidor de tripsina de FFM.....	36
4.4.1	Cromatografia em sílica tipo flash .....	36
4.4.2	Separação cromatográfica .....	37
4.4.3	Análises espectrométricas dos compostos obtidos .....	38
4.5	Efeitos da adição do extrato de FFM em dieta alimentar no desenvolvimento de <i>S. frugiperda</i> .....	38
4.6	Análises estatísticas .....	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
5.1	Otimização da extração do inibidor de tripsina de FFM .....	43
5.2	Purificação cromatográfica .....	53
5.3	Identificação e Caracterização por meio de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas .....	58
5.4	Atividade inibitória de tripsina por ricinina e adenosina .....	69
5.5	Efeito do Extrato de Folhas de Mamona no Desenvolvimento de <i>S. frugiperda</i> .....	70
6	CONCLUSÕES .....	79

<b>7</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>83</b>
	<b>ANEXO A – CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR MEIO DE CROMATOGRAFIA FLASH .....</b>	<b>97</b>
	<b>ANEXO B – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA EXTRAÇÃO UTILIZANDO FAT 2<sup>4</sup> .....</b>	<b>99</b>
	<b>ANEXO C - ESPECTROS DE RMN DE HIDROGÊNIO, COSY, HMBC E HSQC E ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO ADENOSINA .....</b>	<b>102</b>
	<b>ANEXO D - ESPECTROS DE RMN DE HIDROGÊNIO, CARBONO E ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO RICININA .....</b>	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtores de milho têm enfrentado dificuldades em combater uma das pragas que mais causa prejuízos a esta cultura, *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta-do-cartucho. Este inseto polífago e cosmopolita causa dano a diversas culturas, sendo a cultura do milho uma das mais prejudicadas, pois o ataque ocorre em todos os estádios de desenvolvimento da planta, o que aumenta os custos de produção e pode reduzir a produtividade das lavouras. Os prejuízos podem comprometer 47,27% da produção de matéria seca e 54,49% na produção de grãos (CORREA FIGUEIREDO et al., 2015; CORREA FIGUEIREDO; MARTINS-DIAS; CRUZ, 2006).

Um dos maiores desafios para a agricultura é o controle de organismos nocivos às lavouras, como fungos, bactérias, vírus e insetos. Nos últimos anos, o aumento dos casos de populações de insetos resistentes aos produtos fitossanitários comumente utilizados despertou o interesse de diversos pesquisadores, visando à descoberta de alternativas promissoras que possam ser empregadas no manejo integrado de pragas (FREITAS et al., 2014; TAVARES et al., 2009; ZHU et al., 2015).

O controle da *S. frugiperda* tem sido frequentemente realizado por meio da aplicação de inseticidas, que geralmente causam desequilíbrios biológicos, intoxicação dos aplicadores e contaminação ambiental. Buscando reduzir esses efeitos, o plantio de sementes geneticamente modificadas a princípio se mostrou eficiente em resistir ao ataque da lagarta-do-cartucho, contudo, *S. frugiperda* foi o primeiro inseto a apresentar resistência a plantas geneticamente modificadas em estudos de campo (MONNERAT et al., 2015; OMOTO et al., 2016).

Assim compostos sintetizados pelas plantas se tornaram alternativas importantes no controle da herbivoria, como os inibidores de enzimas digestivas. Este grupo de moléculas de defesa é encontrado em diversos vegetais. São

classificadas como inibidores de serino-proteinases, geralmente proteicos e se dividem em diversas famílias com estruturas e classificações distintas. Desde a descoberta da sua atividade na defesa, inúmeras tentativas têm sido feitas para a sua utilização no melhoramento vegetal e seu uso por meio de extratos vegetais no controle de pragas agrícolas é relatado em diversos trabalhos (ALVES et al., 2011, 2013; GATEHOUSE, 2011; MOSOLOV; VALUEVA, 2008; OLIVA et al., 2010; RAMOS et al., 2013; RAMOS-LOPEZ et al., 2010; ROSSI et al., 2010, 2012; TIRELLI et al., 2010).

Estes inibidores atuam formando um complexo em equilíbrio com as proteinases digestivas, o que limita a hidrólise de proteínas, reduzindo a absorção de nutrientes essenciais ao desenvolvimento do inseto (JONGSMA; BEEKWILDER, 2011). Esse mecanismo atrapalha o desenvolvimento em função da menor absorção de resíduos de aminoácidos essenciais aumentando o custo metabólico para o inseto. Assim, os inibidores de proteinases para o controle de *S. frugiperda* têm sido alvo de diversos estudos (BRIOSCHI et al., 2007; GATEHOUSE, 2011; SOUZA et al., 2016).

Inibidores não proteicos foram encontrados por Carvalho (2009), Ramos et al. (2013) e Rossi et al. (2010), em mamona (*Ricinus communis* L.), porém seu mecanismo de interação e promoção da inibição enzimática da tripsina de *S. frugiperda* ainda não foram esclarecidos. Entender como um inibidor não proteico interage com a tripsina de *S. frugiperda* promovendo menor absorção de nutrientes pode auxiliar no controle dessa praga-chave da cultura do milho.

A adaptação e resistência adquirida pela lagarta-do-cartucho aos métodos de controle tradicionais e a técnicas inovadoras, como plantio do milho Bt e a possível inserção de genes que expressam a síntese de inibidores de proteinase justifica a busca por novos compostos passíveis de serem obtidos com baixo custo, principalmente se diminuirmos os prejuízos causados por essa praga.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Extrair, purificar e identificar o inibidor de tripsina presente em folhas de mamona biodirecionando por meio de ensaios de inibição *in vitro*.

Avaliar e caracterizar o efeito do extrato de folhas de mamona visando ao controle de *S. frugiperda*.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar a extração, em farinha de folhas de mamona, do inibidor de tripsina por meio de procedimentos quimiométricos biodirecionados.
- b) Estudar e propor um método adequado para a purificação do inibidor de tripsina.
- c) Identificar a estrutura do inibidor através de técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) uni e bidimensionais e espectrometria de massas (MS) com ionização por *electrospray*.
- d) Avaliar como a dieta acrescida do extrato de farinha de folhas de mamona afeta o desenvolvimento de *S. frugiperda*.



### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Lagarta-do-cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)

A lagarta-do-cartucho pode se alimentar de mais de 80 espécies vegetais distribuídas em 20 famílias. No entanto, possui preferência por plantas como sorgo, trigo, arroz e milho, sendo considerada praga-chave da cultura do milho (CRUZ, 2008; POGUE, 2002; UNIVERSITY OF FLORIDA, 2016).

O adulto possui coloração geral acinzentada e aproximadamente 25 mm de envergadura. Após o acasalamento, a fêmea pode colocar até dois mil ovos agrupados em camadas contendo em média 100 ovos. A longevidade dos adultos é de aproximadamente 12 dias (CAÑAS-HOYOS; MÁRQUEZ; SALDAMANDO-BENJUMEA, 2016; CRUZ, 2008).

Três ou quatro dias após a postura dos ovos eclodem as lagartas. Geralmente permanecem juntas nas primeiras horas de vida, iniciando sua alimentação pela casca dos próprios ovos. Depois raspam a folha da planta hospedeira, mas sem perfurá-la, propiciando o dano típico causado por esta praga. Além do cartucho, as lagartas podem se alimentar do pedúnculo impedindo a formação dos grãos, ou até mesmo entrar na espiga e se alimentar diretamente dos grãos (CRUZ, 2008).

As lagartas maiores, especialmente a partir do segundo instar, começam a migrar para outras plantas, por meio de um fio de teia que tecem e ou pela ação do vento. Geralmente, é encontrada apenas uma lagarta por cartucho, uma vez que esta espécie possui hábito canibal. Ao fim do período larval, com duração de 12 a 30 dias, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas de coloração avermelhada, medindo cerca de 15 mm de comprimento. O período pupal varia de oito dias no verão, a 25 dias no inverno (BARROS; TORRES; BUENO, 2010; GALLO et al., 2002).



O método de controle mais comum da lagarta-do-cartucho ainda é o químico, o que vem provocando a seleção de populações resistentes aos pesticidas clorpirifós, cipermetrina, carbaril, metil-paration, fisostigmina, bendiocarb dentre outros (VIRLA et al., 2008; YU, 2006; YU; MCCORD, 2007). O aumento da resistência é preocupante e já foram encontradas populações de insetos cuja susceptibilidade às plantas geneticamente modificadas está sendo reduzida. Storer et al. (2010) caracterizaram populações de *S. frugiperda* resistentes ao milho *Bacillus thuringiensis* (Berliner, 1915) (Bacillales: Bacillaceae) (Bt) em Porto Rico. Esse aumento na resistência dos insetos foi encontrado por Tabashnik, Rensburg e Carrière (2009) também em Porto Rico e por Omoto et al. (2016) no Brasil.

Em vista destes fatos, a busca por novos compostos modelo extraídos de plantas é necessária para aumentar a diversidade de métodos de controle e reduzir assim o número de populações resistentes de *S. frugiperda*.

### **3.2 Mamona**

A mamona (*Ricinus communis* L.) (Malpighiales: Euphorbiaceae) pertence à família Euphorbiaceae, que engloba uma grande variedade de espécies nativas da região tropical. Apresenta-se de forma arbustiva, com diversas colorações, podendo ou não possuir cera no caule e pecíolo. Os frutos em geral possuem espinhos, que em alguns casos não têm função defensiva. As sementes são de diferentes tamanhos, formatos e grande variabilidade de coloração (RAMOS-LOPEZ et al., 2010).

A mamoneira é largamente difundida por todo o Brasil, apresentando grande adaptabilidade quanto ao clima e solo. O óleo de rícino pode ser extraído pela prensagem das sementes e contém até 90% de ácido graxo ricinoleico, o que confere ao óleo excelentes propriedades sintéticas únicas devido a sua solubilidade em álcoois, sendo largamente utilizado na indústria. O principal

emprego deste óleo é na lubrificação de motores de alta rotação, como os motores de aviões. No Brasil, é utilizado como matéria-prima para produção de biodiesel. O óleo de rícino é usado, ainda, em diversas aplicações industriais como na fabricação de tintas, vernizes e plásticos. Já a torta, subproduto da extração do óleo, é utilizada como adubo (RAMOS; WILHELM, 2005).

As sementes, em geral, apresentam uma composição química variável, dependendo da espécie vegetal e idade da planta. O processo mais utilizado para extração do óleo é a prensagem a frio, com rendimento entre 45 e 55% em massa. A produção nacional na safra 2015 foi de 76,6 mil toneladas de sementes, produzindo 38 mil toneladas de torta, utilizadas como adubo orgânico ou simplesmente descartadas, já que a sua aplicação em rações é limitada pela presença de compostos tóxicos e alergênicos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE, 2016; MELO et al., 2008a, 2008b; PUTTARAJ et al., 1994).

Os principais componentes tóxicos da mamona são a ricina com massa molecular de 60 kDa (RCA 60), apontada como a proteína vegetal mais letal já encontrada e presente majoritariamente nas sementes e o alcaloide ricinina encontrado principalmente nas folhas, com efeitos tóxicos semelhantes aos da ricina (CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002; LEITE et al., 2005; MACHADO et al., 2003; MELO et al., 2008b).

O uso de extratos de mamona no controle de pragas é um assunto bem estudado, Silva et al. (2015) investigaram um inibidor de tripsina encontrado em torta de mamona proteico e termo-resistente. Este inibidor atua sobre proteases *Colletotrichum gloeosporioides* e *Aedes aegypti* inibindo a atividade proteolítica de tripsina. Pode-se citar ainda os trabalhos de Dinesh et al. (2014) no controle de flebotomíneos, Amoabeng et al. (2014) no controle de pragas do repolho e o trabalho realizado por Lima, Moreira e Aragão (2013) no controle da mosca-

branca, uma praga da abóbora, todos estes estudos utilizaram extratos de mamona.

### **3.3 Interação inseto x planta**

Nos ecossistemas naturais, as plantas e os insetos são apenas alguns dos organismos vivos que estão continuamente interagindo de forma complexa. Entre as várias atividades benéficas desempenhadas pelos insetos em relação às plantas, estão a polinização e defesa contra herbívoros (NEVES; BERNARDO; SANTOS, 2014), assim como as plantas fornecem aos insetos abrigo, local para oviposição e alimento, mostrando a estreita associação entre estes organismos (PANDA; KHUSH, 1995). No entanto, outros insetos podem atacar as plantas e, dependendo do nível da herbivoria, os danos podem ser extremamente prejudiciais, causando a morte da planta (ZHU; POELMAN; DICKE, 2014).

A classe Insecta contém aproximadamente 70% dos animais do planeta, sendo grande parte constituída de herbívoros. Desta forma, a sobrevivência das plantas frente a estes insetos depende diretamente da eficácia de seus mecanismos de defesa. Os espinhos e tricomas são as defesas físicas mais evidentes, mas o papel mais importante está relacionado com a defesa química. A evolução conferiu diversas estratégias adaptativas às plantas para diminuir o ataque dos insetos, entre elas estão a ativação e produção de compostos tóxicos e repelentes que as defendem contra a herbivoria, incluindo barreiras físicas e químicas, além de complexas vias de sinalização (FALCO et al., 2001; ZHU; POELMAN; DICKE, 2014).

Dentre as estratégias defensivas estão: a expressão de proteínas tóxicas (HARUTA et al., 1995; KUWAR et al., 2015), a liberação para o ambiente de compostos voláteis que atraem predadores dos insetos herbívoros (BIRKETT et al., 2000), a síntese de metabólitos secundários que as tornam tóxicas e ou menos palatáveis (BALDWIN, 2001; KLIEBENSTEIN et al., 2001) e o

aumento da densidade de tricomas em folhas e caules (FORDYCE; AGRAWAL, 2001). Em contrapartida, os insetos desenvolveram estratégias para superar tais métodos. Estas estratégias incluem a metabolização e sequestro de compostos tóxicos (NISHIDA, 2002; SCOTT; WEN, 2001), mecanismos de fuga (ZANGERL, 1990) e alteração nos padrões de expressão gênica (SILVA et al., 2001).

Segundo Lopes et al. (2004), quando os insetos causam injúrias em uma parte específica da planta, podem induzir a produção de inibidores de endopeptidases, os quais agem no sistema digestivo do inseto. Esse mecanismo é ativado pela sistemina, um fito-hormônio que age sobre os genes produtores de inibidores de proteinases.

Além da síntese de IPs induzida no local do ataque, foi demonstrado que sinais específicos originários dos tecidos danificados são transportados via floema e estimulam a síntese de IPs por toda a planta (JONGSMA; BOLTER, 1997). Estes inibidores presentes nas plantas atuam de forma específica apenas nas proteinases digestivas dos insetos, formando um complexo estável com a enzima, tornando a proteólise limitada e extremamente lenta (TIFFIN; GAUT, 2001). Em consequência, os IPs causam uma deficiência na absorção de aminoácidos, que influencia no crescimento e desenvolvimento dos insetos, ou podem até mesmo causar morte devido à inibição das proteinases digestivas ou devido à produção maciça destas enzimas como mecanismo de defesa do inseto em resposta à inibição. De toda forma há a redução da disponibilidade dos aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas essenciais ao desenvolvimento do inseto (JONGSMA; BOLTER, 1997; POMPERMAYER et al., 2001).

As plantas podem sintetizar de forma constitutiva, compostos químicos que repelem os herbívoros por serem tóxicos ou reduzirem a digestibilidade dos tecidos vegetais. Outra estratégia usada pelas plantas é a indução da síntese

destas substâncias em resposta a injúrias causadas pelo ataque dos herbívoros. Estes dois mecanismos de defesa são responsáveis por prevenir a maioria dos ataques, embora existam em número reduzido, alguns insetos são capazes de se adaptarem de forma específica causando danos às plantas. Uma classe de substâncias que está intimamente relacionada à defesa das plantas é a dos inibidores de proteinases (IPs). Os níveis destes IPs em folhas são normalmente baixos podendo ser rapidamente induzidos a níveis elevados quando as plantas são atacadas por insetos, sofrem danos mecânicos ou são expostas a fitohormônios (ARIMURA; KOST; BOLAND, 2005; RAKWAL; AGRAWAL; JWA, 2001).

Durante a evolução, plantas e insetos desenvolveram mecanismos ecológicos, fisiológicos e bioquímicos para diminuir os efeitos negativos desta interação. Alguns mecanismos desenvolvidos pelas plantas contra as proteinases dos insetos podem ser citados: o aumento da atividade de inibidores nos tecidos (RAKWAL; AGRAWAL; JWA, 2001), a síntese de uma gama enorme de inibidores que possuem atividade contra várias enzimas (CHRISTELLER et al., 1998), a produção de inibidores bifuncionais que atuam contra amilases e proteinases (ROY; GUPTA, 2000), aumento da complexidade dos inibidores com propriedades bioquímicas diferentes por meio da produção de iso-inibidores (TIFFIN; GAUT, 2001), expressão de inibidores altamente específicos para as enzimas dos insetos (FALCO et al., 2001) e a síntese de inibidores resistentes à proteólise e ativos sob várias condições de pH do trato digestivo dos insetos (CHRISTELLER et al., 1998).

Por outro lado, os insetos desenvolveram maneiras de resistirem aos efeitos negativos causados pelos IPs presentes nas plantas das quais se alimentam. Entre elas destacam-se o aumento da atividade das enzimas do trato digestivo e a síntese de enzimas menos sensíveis (SOUZA et al., 2016), o aumento da variedade de proteinase produzidas modificando a atividade

hidrolítica total (PATANKAR et al., 2001), a quebra de inibidores via proteinases (GIRARD et al., 1998) e por fim a diminuição da sensibilidade das enzimas aos inibidores via formação de polímeros de alto peso molecular insensíveis aos IPs (BRITO et al., 2001; RODRIGUEZ-SAONA; THALER, 2005).

Patankar et al. (2001) constataram que lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) (Lepidoptera: Noctuidae) foram capazes de superar os efeitos de vários IPs de plantas hospedeiras produzindo uma composição de enzimas do trato digestivo diferente após a ingestão destes IPs. O mesmo foi observado para *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766) (Lepidoptera: Noctuidae), *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) (MAZUMDAR-LEIGHTON; BROADWAY, 2001a, 2001b) e *Heliothis virescens* (Fabricius, 1777) (Lepidoptera: Noctuidae) (BRITO et al., 2001). Mazumdar-Leighton e Broadway (2001b) verificaram que insetos da ordem Lepidoptera apresentavam tripsinas constitutivas e tripsinas cuja expressão foi induzida após a ingestão de IPs e que se mostravam insensíveis aos inibidores.

Resultados semelhantes de adaptação de insetos a inibidores foram descritos para as quimotripsinas (MAZUMDAR-LEIGHTON; BROADWAY, 2001a) e para as  $\alpha$ -amilases (SILVA et al., 2001). Além disso, a produção de proteinases que digerem os IPs permite aos insetos superarem tais defesas das plantas e utilizarem os inibidores digeridos como fonte de aminoácidos (GIRARD et al., 1998).

Dessa forma, o uso de inibidores de proteinases como novos meios de controle é importante para a redução dos prejuízos causados pela lagarta-do-cartucho.

### 3.4 Inibidores de Proteinases

Desde a descoberta dos inibidores de proteinases como agente de defesa vegetal, inúmeras tentativas têm sido feitas para a sua utilização no melhoramento genético de plantas.

Foi adotado, devido à grande diversidade e abundância dos inibidores na natureza, um complexo sistema de classificação de acordo com a proteinase inibida, a homologia entre as estruturas primárias e terciárias, e também aspectos evolutivos. Diversas famílias de plantas possuem um grande e complexo grupo de inibidores de proteinases que atuam na autodefesa. Essas proteínas estão presentes em diversas partes da planta como folhas, tubérculos e sementes (MOSOLOV; VALUEVA, 2005).

Membros das diversas famílias de inibidores têm sido estudados, entre eles, os inibidores de serino e cisteíno proteinases têm grande destaque. No caso dos insetos das ordens Lepidoptera e Diptera, os inibidores de serino proteinases se mostraram mais eficientes (JONGSMA; BOLTER, 1997), uma vez que esses insetos usam proteinases do tipo serina (tripsina e quimotripsina), para a quebra das proteínas ingeridas. Já para as ordens Hemiptera e Coleoptera, os inibidores de cisteíno proteinases se mostram mais eficientes, estas proteinases também têm importante papel na alimentação promovendo a digestão das proteínas (RYAN, 1990).

As pesquisas envolvendo os efeitos dos inibidores de proteinases advindos de plantas sobre as proteinases digestivas dos insetos iniciaram por volta de 1950, sendo que os estudos elucidando a ação destas moléculas como agentes protetores contra insetos receberam grande suporte nos anos de 1960 a 1970 (RYAN, 1973).

Os inibidores de proteinases constituem uma das barreiras químicas de defesa da planta e atuam no intestino dos insetos herbívoros pela inibição da digestão de proteínas da planta ou por indução de super produção de enzimas

digestivas, reduzindo a disponibilidade dos aminoácidos essenciais para produção de outras proteínas (JONGSMA; BOLTER, 1997).

Como exemplo, é possível citar o isolamento e purificação, a partir de noz sabão (*Sapindus trifoliatus* L. Var. *Emarginatus*: Sapindaceae), de um inibidor de tripsina utilizando fracionamento com acetona, seguido de precipitação com sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e por fim permeação em gel. O inibidor purificado exibiu um peso molecular de 29 kDa, e inibiu de maneira não competitiva tripsina e pronase, uma enzima da classe das serino proteinases. A ação do inibidor foi computacionalmente simulada em proteinases presentes no intestino das larvas de *H. armigera* e *S. frugiperda*. Os estudos de *docking* no sítio catalítico revelaram fortes interações de ligação de hidrogênio entre Lys10 e Pro71; Lys299 e Met80 (inibidor/proteinase, respectivamente) e interações de Van der Waals entre os resíduos Leu11 e Cys76 de aminoácidos do inibidor de noz sabão e proteinase de *H. armigera*, respectivamente. Foram observadas ligações de hidrogênio entre o inibidor e proteinase de *S. frugiperda* em posições Thr79 e Arg80; Asp90 e Gly73; Asp2 e Gly160 respectivamente (GANDREDDI et al., 2015).

A ingestão crônica de inibidor de tripsina de soja (STI) reduziu significativamente a atividade proteolítica *in vivo*, daquelas espécies com hábitos alimentares relativamente especializados. No entanto, a ingestão crônica de STI não influenciou a sobrevivência de lagartas com hábitos alimentares relativamente generalizados (BROADWAY; VILLANI, 1995).

Em trabalho com o inibidor de proteinase do tipo Kunitz de soja (SBTI) desenvolvido por Broadway (1997), foi revelado que a ingestão de SBTI por lagartas de *H. zea*, *A. ipsilon* e *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidae) aumentou o tempo de retenção do alimento no trato digestivo dos insetos e o nível de atividade de enzimas proteolíticas não susceptíveis à inibição por SBTI. O estudo revelou também que o incremento da atividade de enzimas



resistentes à ação do SBTI foi diretamente influenciado pela dose e tempo de exposição ao inibidor. Por tais resultados, foi sugerido que um complexo sistema pode ser responsável pela regulação de enzimas proteolíticas no intestino de lagartas de lepidópteros.

Com o objetivo de identificar novos compostos que pudessem ser úteis ao controle de afídeos dos cereais, Tran, Cheesbrough e Keickhefer (1997) testaram a ação de cinco inibidores de proteinase de batata e soja sobre os pulgões *Diuraphis noxia* (Kurdjumov, 1913) (Hemiptera: Aphidae), *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphidae) e *Rhoalosiphum padi* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphidae), que foram alimentados com dieta artificial. Os IPs de batata, quando incorporados em dieta artificial, na concentração de 1 mM, aumentaram a mortalidade no último instar dos afídeos e reduziram a produção de ninfas. Os IPs de soja causaram efeitos negativos no desenvolvimento dependendo da espécie de afídeo analisada.

### **3.5 Métodos de prospecção de metabólitos bioativos em plantas**

A busca por moléculas com atividade biológica em plantas invariavelmente necessitará do emprego de algum método de extração. Talvez a mais simples das metodologias para extração consiste em realizar a imersão da amostra do vegetal em solventes à temperatura ambiente por um período relativamente longo, iniciando-se com solventes menos polares e aumentando a polaridade; dessa forma a extração estática fraciona os metabólitos por ordem de polaridade. Apesar de simples, esta técnica é extremamente eficaz, pois além de extrair, ainda agrupa diferentes compostos segundo sua afinidade pelo solvente.

Outros métodos envolvem hidrodestilação e a extração por arraste de vapor, extrações mais rápidas de compostos com ponto de ebulição próximo à temperatura de decomposição. O princípio da destilação a vapor baseia-se no fato de que a pressão total de vapor de uma mistura de líquidos imiscíveis é

igual à soma da pressão de vapor dos componentes puros individuais, também conhecida como Lei de Dalton. A pressão total de vapor da mistura torna-se igual à pressão atmosférica, e assim a mistura entra em ebulição numa temperatura menor que o ponto de ebulição de qualquer um dos componentes. Geralmente estes dois últimos métodos descritos são utilizados na extração de óleos essenciais (ONG, 2004; ONG; CHEONG; GOH, 2006; SEIDEL, 2012; YALAVARTHI; THIRUVENGADARAJAN, 2013).

A prensagem a frio é utilizada na obtenção de produtos com qualidade acima da média, geralmente utilizados na fabricação de alimentos e medicamentos. Sua aplicação se dá na extração de óleos essenciais da casca de frutos cítricos (KIRBASLAR; BOZ; KIRBASLAR, 2006), assim como no processo de extração de óleos fixos como o azeite de oliva, óleo de soja, óleo de rícino entre outros (RAMOS; WILHELM, 2005).

Outros métodos incluem ainda: a extração exaustiva utilizando Soxhlet, método clássico e usado como referência na comparação com outros, mas muito demorado e dispendioso; a extração sônica, que elimina a necessidade de aquecimento da amostra; a extração por micro-ondas reduz o tempo necessário e utiliza menor quantidade de solvente orgânico; a extração por fluido supercrítico, em que CO<sub>2</sub> é meio extrator e é muito eficaz, porém tem custo elevado, e por fim, as extrações sob pressão, que podem ser sob agitação, estática ou assistida por surfactante entre outras (ONG, 2004; ONG; LEN, 2003; SEIDEL, 2012).

Todavia, a extração é a primeira etapa de um longo processo no estudo de moléculas bioativas. O uso de ensaios *in vitro* e ensaios biológicos *in vivo* são empregados no biodirecionamento para obtenção dos metabólitos com atividade biológica na maioria dos casos. Alguns exemplos de experimentos empregados são a análise de atividade inibitória ou ativadora de enzimas e ensaios *in vivo* fornecendo o composto na dieta, aplicando topicamente ou injetando e

realizando uma série de verificações comportamentais, anatômicas e fisiológicas no organismo alvo (ALVES, 2014; RAMOS et al., 2013).

A extração de proteínas normalmente é realizada utilizando soluções aquosas tampão ou soluções salinas, sendo amplamente utilizada para inibidores proteicos. Como exemplo, pode-se citar o trabalho realizado por Klomklao et al. (2011) no qual se objetivou encontrar as condições ótimas para a extração e purificação do inibidor de tripsina presente em sementes de *Vigna radiata* (L) (R. Wilczek) (Fabales: Fabaceae). As melhores condições encontradas foram aquelas em que a farinha desengordurada foi extraída por duas horas com água destilada. A purificação foi realizada fervendo-se o extrato por 10 minutos a 90 °C e seguindo com precipitação pela adição de sulfato de amônio com saturação variando de 30 a 65% e por fim filtrando em Sephadex G-50. Houve um rendimento de 30,25% com purificação de 13,51 vezes, sendo que o inibidor encontrado apresentou massa de 14 kDa e resistência térmica, embora tenha se mostrado sem atividade antitriptica após tratamento com o agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol.

### **3.6 Uso de análises quimiométricas na otimização da extração de compostos bioativos**

Atualmente a quimiometria é comum em diversas áreas em que o estudo de determinado tema apresenta uma grande quantidade de variáveis que observadas individualmente pouco refletem a real complexidade do tema.

Seu uso tem sido aprimorado desde a década de 1970 (WOLD, 1995). Sua aplicação abrange a otimização de condições cromatográficas (ACEVSKA et al., 2012; COSTA FERREIRA et al., 2007), análise de alimentos (AMVRAZI; TSIROPOULOS, 2009; GUILLEN-CASLA et al., 2012; SAURINA, 2010), dentre outras. A principal vantagem da quimiometria é o

reconhecimento de relações e padrões complexos, difíceis de serem observados em experimentos em que apenas uma variável é analisada e as demais são fixas.

Devido à importância da extração na investigação científica, a otimização das condições de extração no preparo de amostras é um tema recorrente em diversos trabalhos. O estudo das variáveis relevantes à extração é um trabalho constante pois a interação entre estas e o tipo de amostra a ser extraído geralmente é único em vista da complexidade do sistema matriz/condições de extração (ABOLLINO et al., 2011; BECERRIL-BRAVO et al., 2010; CAMPISI et al., 1995; GIACOMINO et al., 2011).

O termo quimiometria abrange várias técnicas que vão desde o planejamento experimental à análise dos dados obtidos e geralmente são aplicadas em conjunto, como demonstrado no estudo realizado por Nunes e Guerreiro (2013), no qual foram utilizados dois planejamentos fatoriais distintos e análise exploratória dos resultados por análise das componentes principais (PCA) para avaliar quais variáveis foram mais importantes na produção de um catalisador de micropartículas de ouro suportado em carvão ativado.

No estudo de compostos oriundos de seres vivos (plantas, fungos, bactérias, dentre outros) com atividade biológica, a extração é a etapa inicial e a que mais pode influenciar todo o trabalho, até sua conclusão. Geralmente quando a extração é motivo de estudo, esta é realizada fixando-se alguns fatores e variando-se apenas um. Contudo, a interação entre os fatores é comum e esta informação é perdida quando o experimento é realizado de forma univariada, pois, assume-se que ao se fixar a melhor condição de uma variável, ao se variar a segunda, a primeira permanecerá inalterada. Essa pressuposição possui um grau de incerteza alto, pois é comum que haja interação entre os fatores em uma extração (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007; NUNES, 2011; ZHANG; AL, 2009).

Essa dificuldade na otimização de processos pode ser contornada utilizando-se planejamentos fatoriais. Estes métodos permitem realizar a triagem dos fatores através de um modelo que prevê a importância de todos os fatores e suas interações, fatores estes que são independentes apesar de serem variados ao mesmo tempo. Algumas vantagens dos planejamentos fatoriais incluem: o número reduzido de experimentos, avaliar como um fator é afetado por diversos níveis de outros fatores, permitir estimar a interação entre fatores distintos, além de possibilitar que gráficos de superfície de resposta sejam criados para auxiliar a interpretação de como os fatores influenciam o processo (ZHANG; AL, 2009).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Coleta das folhas de mamona e preparo da farinha de folhas de mamona (FFM)**

As plantas de mamona (*Ricinus communis* L.) das quais as folhas foram colhidas são de crescimento espontâneo no *Campus* sendo denominada mamoninha do caule vermelho. As folhas foram coletadas no *Campus* da UFLA no período matutino em setembro de 2012. As folhas que apresentaram injúrias ou qualquer outro dano não foram coletadas, as demais foram transportadas em saco plástico acondicionado em caixa térmica resfriada para o Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da UFLA. As folhas tiveram seu caule e enervações principais removidos e foram lavadas com água deionizada e secas em estufa de circulação de ar a 45 °C, por três dias. O controle de umidade foi realizado até peso constante. As folhas secas foram trituradas em moinho Tecnal TE-631 e a farinha de folhas de mamona (FFM) armazenada em recipiente plástico hermeticamente fechado até a execução das análises.

### **4.2 Ensaios *in vitro* de inibição de tripsina de *S. frugiperda***

Os ensaios de inibição da tripsina de *S. frugiperda* foram utilizados como parâmetro de avaliação da eficácia dos procedimentos quimiométricos e detecção biodirecionada dos compostos inibidores na purificação cromatográfica constituindo assim um fracionamento biodirecionado do inibidor de tripsina. Para realização dos experimentos, foi obtido um homogeneizado do tubo digestivo de *S. frugiperda* como fonte de tripsina. As lagartas de sexto instar foram obtidas da criação de manutenção do Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Entomologia da UFLA. As lagartas foram imobilizadas a -20 °C por 10 minutos e seus tubos digestivos foram removidos com auxílio de pinça e tesoura. Os tubos digestivos foram macerados em homogeneizador tipo Potter, na proporção de 1 tubo digestivo para 4 mL de água deionizada, a 4 °C.

O extrato bruto foi centrifugado a 10.000 x g a 4 °C por 30 minutos. O sobrenadante, considerado o extrato enzimático, foi armazenado em *freezer* a -20 °C, até sua utilização. O extrato foi diluído de modo a obter-se, no ensaio controle, absorvâncias variando entre 0,1 e 0,9 absorvância (ROSSI et al., 2010).

O substrato para a tripsina foi o cloridrato de *N*- $\alpha$ -Benzoil-DL-arginina-*p*-nitroanilida (BAPNA 98%, Sigma ). Para o preparo da solução 1,25 mmol L<sup>-1</sup>, 54,5 mg de BAPNA foram solubilizados em 1,25 mL de dimetilsulfóxido e o volume completado para 0,1 L com solução tampão Glicina-NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 9,7; sendo essa a solução utilizada como substrato (RAMOS et al., 2013).

As amostras contendo o inibidor consistiram dos extratos obtidos nos procedimentos de otimização da extração, frações obtidas no processo de purificação, frações obtidas em HPLC e compostos purificados.

O ensaio enzimático foi cinético, em quatro períodos de tempo de reação (30, 60, 90 e 120 minutos). Foram adicionados 200  $\mu$ L da amostra, 200  $\mu$ L do extrato enzimático diluído, e 800  $\mu$ L de substrato. Os tubos foram incubados em banho-maria a 30 °C durante todo o tempo de reação. A reação foi paralisada com 200  $\mu$ L de ácido acético 30%. O controle de enzima sem inibidor foi feito substituindo-se a amostra por água destilada. O produto da reação foi quantificado pela leitura da absorvância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm (ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961; RAMOS et al., 2013).

O cálculo da porcentagem de inibição foi realizado utilizando a equação 1:

$$\% \text{ inibição} = \left( \frac{(\text{ABSc} - \text{ABSf})}{\text{ABSf}} \right) \times 100 \quad (1)$$

em que: ABSc = absorvância do controle; ABSf = absorvância das frações; % inibição = porcentagem de *p*-nitroanilida que deixa de ser produzida em comparação ao controle durante o tempo de reação.

Salienta-se que a porcentagem de inibição foi calculada para todas as análises enzimáticas, sendo considerada a faixa variando entre 85-40% de inibição como segura para cálculo da atividade enzimática.

Os valores de tempo (x) e absorbância (y) foram plotados em um gráfico, sendo que o cálculo da mUTI (miliunidade de tripsina inibida) foi realizado utilizando a equação 2

$$mUTI = \frac{(I_c - I_i)}{I_e} \quad (2)$$

em que:  $I_c$  = Inclinação da reta do gráfico de absorbância x tempo (min.) obtida pelos dados do ensaio controle;  $I_i$  = Inclinação da reta do gráfico de absorbância x tempo (min.) obtida pelos dados do ensaio de inibição;  $I_e$  = Inclinação da reta obtida com o padrão de *p*-nitroanilida (ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961; RAMOS et al., 2013).

Salienta-se que, 1 mUTI g<sup>-1</sup> corresponde a 1 nmol de *p*-nitroanilida que deixa de ser produzido devido à presença do inibidor contido em 1 grama de FFM.

Para análise rápida das frações coletadas em HPLC, foi realizado ensaio não cinético de inibição. A análise foi efetuada adicionando-se à mistura reacional 200 µL de amostra contendo o inibidor, 200 µL do extrato enzimático diluído e 800 µL de substrato, iniciando assim a reação. O ensaio controle (sem o inibidor) foi realizado para que a reação ocorresse em velocidade máxima. A reação foi realizada a 30 °C, sendo paralisada, após 30 minutos, com 200 µL de ácido acético 30% e a absorbância determinada no comprimento de onda de 410 nm (ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961; RAMOS et al., 2013).



### **4.3 Otimização da extração do inibidor de tripsina de *S. frugiperda* presente em FFM**

A extração dos inibidores de tripsina presentes em FFM foi otimizada utilizando-se planejamento fatorial  $2^4$  e planejamento composto central  $2^2$ .

#### **4.3.1 Planejamento fatorial $2^4$**

A otimização da extração dos inibidores de tripsina de *S. frugiperda* presentes em FFM foi realizada utilizando-se planejamento fatorial com ponto central  $2^4$  (FAT  $2^4$ ). Para o planejamento (TABELA 1) e obtenção dos resultados, foram utilizados dois níveis e o ponto médio para cada um dos quatro parâmetros avaliados com dois níveis mais ponto central: proporção amostra/solvente (Pr) expresso em peso/volume de FFM extraída com solvente designado para cada experimento:  $1/30=0,0333$ ;  $1/60=0,0166$ ;  $1/40=0,025$ ; tipo de solvente (So) expresso em % de etanol: 30, 60 e 45% utilizado em cada experimento; número de reextrações (Re) sendo realizada uma, três e duas vezes conforme necessárias a cada experimento; e por fim tempo de extração (T) com 60, 120 e 90 minutos de extração em cada experimento determinado. A atividade inibitória da tripsina de *S. frugiperda* foi utilizada como fator determinante na escolha das melhores condições de extração do inibidor presente em FFM (TEOFILO; FERREIRA, 2006).

Para realização dos experimentos, 100 mg da FFM foram acondicionados em tubos Falcon e, em seguida, foram adicionados os solventes (30, 45 e 60% etanol/água) aos experimentos 1 a 19 conforme descrito na Tabela 1. Os tubos foram submetidos à agitação, em banho ultrassônico a 35 kHz, a 40 °C, nos tempos de 60, 90 e 120 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 5.000 x g por 5 min e o extrato sobrenadante armazenado. Repetiram-se os procedimentos no precipitado realizando as reextrações (uma, duas e três vezes) conforme o FAT  $2^4$ . Os sobrenadantes das reextrações de cada

experimento foram agrupados para posterior quantificação cinética da inibição de tripsina que foi utilizada como parâmetro de determinação de quais fatores (Pr, So, Re e T) tiveram maior sucesso na extração do inibidor de tripsina de *S. frugiperda* presente em FFM.

Tabela 1 - Fatorial 2<sup>4</sup> das variáveis independentes avaliadas na extração dos inibidores de tripsina de *Spodoptera frugiperda* presentes em farinha de folhas de mamona.

34

Experimento	Variáveis codificadas				Variáveis utilizadas*			
	X1	X2	X3	X4	Proporção (X1)	Solvente (X2)	Nº Reextrações (X3)	Tempo (X4)
1	1	1	1	1	0,0333	60	3	120
2	-1	1	1	1	0,0166	60	3	120
3	1	-1	1	1	0,0333	30	3	120
4	-1	-1	1	1	0,0166	30	3	120
5	1	1	-1	1	0,0333	60	1	120
6	-1	1	-1	1	0,0166	60	1	120
7	1	-1	-1	1	0,0333	30	1	120
8	-1	-1	-1	1	0,0166	30	1	120
9	1	1	1	-1	0,0333	60	3	60
10	-1	1	1	-1	0,0166	60	3	60
11	1	-1	1	-1	0,0333	30	3	60
12	-1	-1	1	-1	0,0166	30	3	60
13	1	1	-1	-1	0,0333	60	1	60
14	-1	1	-1	-1	0,0166	60	1	60
15	1	-1	-1	-1	0,0333	30	1	60
16	-1	-1	-1	-1	0,0166	30	1	60
17	0	0	0	0	0,025	45	2	90
18	0	0	0	0	0,025	45	2	90
19	0	0	0	0	0,025	45	2	90

\*Proporção expressa em farinha de folhas de mamona/solvente (peso/volume 1/30=0,0333; 1/60=0,0166; 1/40=0,025). Solvente expresso em porcentagem de etanol em água deionizada. Tempo expresso em minutos. Experimentos 17 a 19 são repetições do ponto central (média dos níveis máximo e mínimo utilizados). Fonte: Do autor (2016).

#### **4.3.2 Otimização dos parâmetros para extração do inibidor de tripsina de *S. frugiperda* presente em FFM por planejamento composto central 2<sup>2</sup> (CCD 2<sup>2</sup>)**

Com os resultados obtidos no FAT 2<sup>4</sup>, foi realizado o CCD 2<sup>2</sup> utilizando os parâmetros proporção (Pr) e solvente (So). A Tabela 2 contém o planejamento das condições experimentais de otimização.

Para realização dos experimentos, 100 mg da FFM foram acondicionados em tubos Falcon e, em seguida, foi adicionado o solvente (23,79; 30; 45; 60 e 66,21% etanol/água) nas proporções 1/37,4; 1/40; 1/48; 1/60; 1/66,9 (p/v, FFM/solvente) em cada um dos experimentos. Os tubos foram submetidos à agitação, em banho ultrassônico a 40 °C, por 60 minutos. Após este período, foram centrifugados 5.000 x g por 5 min. Uma reextração nas mesmas condições foi realizada e os sobrenadantes foram agrupados. Ao fim dos experimentos obteve-se o extrato padronizado de FFM.

Tabela 2 - Planejamento Composto Central 2<sup>2</sup> e condições experimentais de otimização da extração do inibidor de tripsina presente em farinha de folhas de mamona.

Experimento	Variáveis codificadas		Variáveis utilizadas*	
	X1	X2	Solvente (X1)	Proporção (X2)
1	-1	-1	30	0,016666
2	1	-1	60	0,016666
3	-1	1	30	0,025
4	1	1	60	0,025
5	-1,414	0	23.79	0,0208
6	1,414	0	66.21	0,0208
7	0	-1,414	45	0,0149
8	0	1,414	45	0,0267
9	0	0	45	0,0208
10	0	0	45	0,0208
11	0	0	45	0,0208
12	0	0	45	0,0208
13	0	0	45	0,0208

\*Solvente expresso em porcentagem de etanol em água deionizada. Proporção expressa em peso/volume (1/37,45=0,0267; 1/40=0,025; 1/40=0,0208; 1/60=0,0166; 1/67,11=0,0149). Experimentos 5 a 8 são pontos localizados em  $\alpha = \pm 1,414$ . Experimentos 9 a 13 são repetições do ponto central. Fonte: Do autor (2016)

#### 4.4 Purificação e identificação do inibidor de tripsina de FFM

O extrato de FFM foi purificado por meio de procedimentos cromatográficos e o inibidor de tripsina identificado por meio de técnicas espectrométricas descritas a seguir.

##### 4.4.1 Cromatografia em sílica tipo flash

O extrato padronizado de FFM foi utilizado para se detectar quais compostos são os responsáveis pela inibição da tripsina de *S. frugiperda*. Utilizou-se uma coluna de vidro com 3 cm de diâmetro, preenchida com 10,88 g de sílica C18 (Sigma-Aldrich), com volume morto de 11 mL. O extrato que foi fracionado consistiu de 1 g do extrato seco em rotoevaporador solubilizado em 5 mL de água ultrapura e aplicado na coluna. A fase móvel consistiu de oito

soluções água/metanol (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70% v/v) sendo que o volume aplicado de 22 mL foi correspondente a duas vezes o volume morto, a ordem foi crescente em força de eluição. As frações obtidas foram coletadas e tiveram sua atividade inibitória de tripsina avaliada. Estas frações foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). As frações que promoveram maior inibição de tripsina foram agrupadas e secas em rotoevaporador. As frações agrupadas foram solubilizadas em água e analisadas em HPLC analítico e preparativo.

#### 4.4.2 Separação cromatográfica

As análises em HPLC foram realizadas no Laboratório de CLAE do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) do Instituto de Química da UNESP – Araraquara, SP.

O equipamento utilizado para separação dos compostos inibidores foi um HPLC-UV/PDA (Shimadzu, Japan), equipado com um *degasser* (DGU-20A3), duas bombas (LC 20AT), um *autosampler* (SIL-20A), um detector UV/PDA (SPD-M20A) e forno (CTO-20A). Foi utilizada uma coluna Ascentis® C18 (250 mm  $\times$  4,6 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ ) acoplada a uma pré-coluna Ascentis® C18 (15 mm  $\times$  3,2 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$ ), para análises em modo analítico. Os volumes injetados foram de 5  $\mu\text{L}$  para as frações obtidas em cromatografia em sílica tipo *flash* e de 20  $\mu\text{L}$  para as demais amostras. A fase móvel utilizada foi um gradiente água/ácido acético 0,1% (A) e metanol 100% (B), com composição inicial de A/B 94:6 (v/v) até 40% de B em 30 min, com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. O comprimento de onda utilizado para detecção foi 254 nm. Este método foi utilizado em modo analítico para as frações obtidas em cromatografia em sílica tipo *flash*, as frações agrupadas, assim como para as frações coletadas em cromatografia em modo preparativo.

A cromatografia em modo preparativo foi realizada utilizando-se o mesmo equipamento, porém, com uma coluna preparativa Luna® C18 (150 mm × 21,20 mm i.d., 5 µm), em fluxo de 10 mL min<sup>-1</sup>. A amostra analisada consistiu nas frações com melhor atividade inibitória, sendo as frações 4 e 5 agrupadas obtidas em cromatografia em sílica tipo *flash* em concentração de 50 mg mL<sup>-1</sup> e o volume injetado de 1 mL.

#### 4.4.3 Análises espectrométricas dos compostos obtidos

As análises foram realizadas no Laboratório II da Plataforma de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da UNESP – Araraquara, SP. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) das frações puras foram obtidos em um espectrômetro Bruker Avance III 600 HD a 600 e 150 MHz para <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C respectivamente. Foram realizadas análises uni e bidimensionais COSY, HMBC e HSQC. As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido-d<sub>6</sub> (Merck), nas concentrações de 0,7083 mg mL<sup>-1</sup> e 5,7667 mg mL<sup>-1</sup> para o primeiro e segundo compostos puros respectivamente.

Os espectros de massas das frações puras foram obtidos em um espectrômetro de Massas Q-TOF Maxis Impact Bruker no modo *scan* completo de 50 a 1500 m/z; ionização por *eletrospray* (ESI) em polaridade positiva; foco ativo; N<sub>2</sub> como gás de secagem em fluxo de 4 L min<sup>-1</sup> com temperatura de 180 °C; pressão do nebulizador a 0,3 Bar; capilar a 2.900V; voltagem de carregamento a 2.000V; *end plate off set* a 500V.

#### 4.5 Efeitos da adição do extrato de FFM em dieta alimentar no desenvolvimento de *S. frugiperda*

Ovos de segunda postura de insetos de criação de laboratório de *S. frugiperda* foram utilizados e mantidos em placas com dieta padrão preparada conforme metodologia de Kasten Junior, Precetti e Parra (1978) (TABELA 3) até a eclosão das lagartas, as quais foram mantidas nestas condições por 48

horas. As lagartas de 48 horas foram transferidas para tubos de vidro (10 cm de altura x 3 cm de diâmetro) na proporção de uma lagarta por recipiente, contendo duas unidades de dieta alimentar (1 cm de diâmetro x 1,5 cm de altura por unidade).

Tabela 3 - Composição da dieta da lagarta-do-cartucho.

Componente	Quantidade
Feijão	166,66 g
Germe de trigo	79,20 g
Levedura de cerveja	50,70 g
Ácido sórbico	1,65 g
Ácido ascórbico	5,10 g
Nipagin	3,15 g
Ágar	27,00 g
Formol	4,15 mL
Solução inibidora*	4,15 mL
Água	1775 mL

\*Solução Inibidora de crescimento microbiano: Ácido propiônico (18,00 mL); Ácido fosfórico (43,00 mL); Água (540,00 mL). Fonte: Kasten Junior, Precetti e Parra (1978).

Para obtenção do extrato de FFM, extraiu-se por 60 min em banho de ultrassom, com etanol 71,7% na proporção 1/48,6 (p/v FFM/etanol) a 40 °C, sendo realizada uma reextração nas mesmas condições. Essa extração foi padronizada previamente. O bioensaio foi constituído por testemunhas contendo água destilada e outros cinco tratamentos contendo o extrato de FFM.

Na testemunha, 280 mL da dieta foram acrescidos de 20 mL de água e nos demais tratamentos foram adicionados 20 mL com extrato de FFM suficiente para que o volume total das dietas de cada tratamento tivesse as concentrações finais de 113,6; 227,3; 454,5; 909,0 e 1818,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Estas concentrações foram estipuladas extrapolando-se doses para uso em campo.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com seis tratamentos de 120 repetições (cada repetição constituída de uma lagarta). Avaliou-se a duração



do período larval, peso da pupa, duração do período pupal, concentração de proteínas nas fezes, longevidade dos adultos, período de pré-oviposição, período de oviposição e quantidade de ovos produzidos por casal.

A concentração de proteínas nas fezes das lagartas de *S. frugiperda* foi determinada com base na metodologia desenvolvida por Bradford (1976). As fezes foram coletadas após o término do período larval, secas em estufa de ventilação forçada a 45 °C. A 15 mg de fezes foram adicionados 200 µL de água destilada e 200 µL de ácido perclórico 1 mol L<sup>-1</sup>. Essa mistura foi homogeneizada e colocada em banho de gelo por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas a 5.000 x g e o sobrenadante desprezado. Ao precipitado foram adicionados 200 µL de NaOH 0,1M e após homogeneização este foi novamente centrifugado. A uma alíquota de 100 µL do sobrenadante de cada amostra foi adicionado 1 mL da solução de Bradford e a concentração proteica foi determinada espectrofotometricamente a 595 nm, tomando-se como base uma curva padrão de BSA (albumina de soro bovina) com massas, variando de 2 a 20 µg (RAMOS et al., 2013).

#### **4.6 Análises estatísticas**

Para análise dos dados obtidos no experimento de triagem FAT 2<sup>4</sup> e para o CCD 2<sup>2</sup>, foi utilizado o programa Chemoface (NUNES et al., 2012). Os ensaios de inibição foram realizados em triplicata de cada tempo e a média utilizada nos cálculos de mUTI e da % de inibição. Foi realizada análise de variância dos dados obtidos: duração do período larval, peso da pupa, duração do período pupal, concentração de proteínas nas fezes, longevidade dos adultos, período de pré-oviposição, período de oviposição e quantidade de ovos produzidos por casal e suas médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância utilizando-se o pacote laercio do *software* R. A análise de

sobrevivência foi realizada utilizando-se o modelo de Weibull, por meio do pacote survival do *software* R (R CORE TEAM, 2015).



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Otimização da extração do inibidor de tripsina de FFM

A inibição da atividade de tripsina de *S. frugiperda* causada pelos extratos obtidos nos experimentos 1.1 a 1.19 (TABELA 4) foi utilizada como resposta para os cálculos do planejamento FAT 2<sup>4</sup>.

Tabela 4 - Inibição induzida pelos extratos de farinha de folhas de mamona obtidos nos experimentos de extração fatorial 2<sup>4</sup>

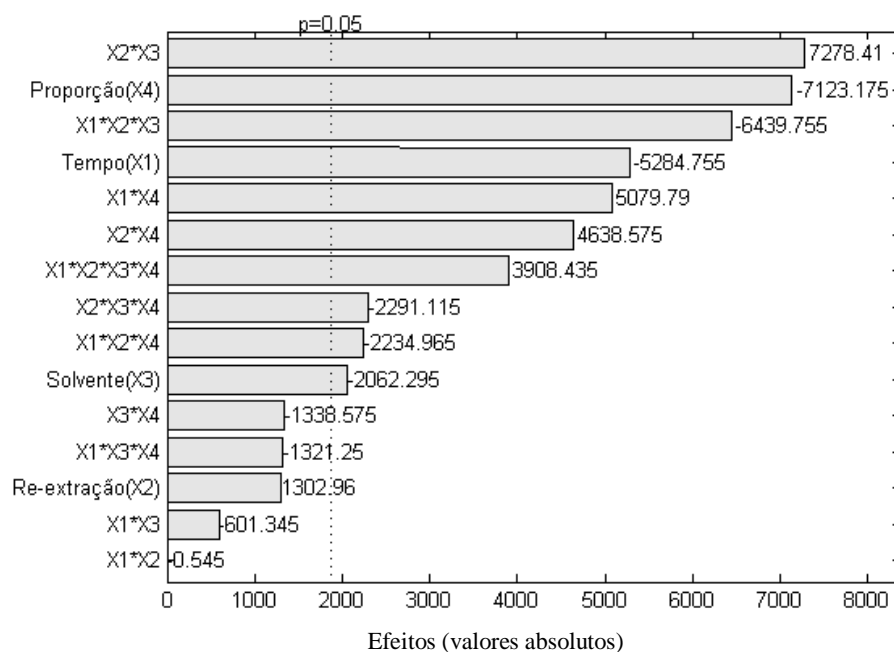
Experimento	Inibição (mUTI g <sup>-1</sup> FFM)
1	38026,46
2	12767,73
3	16665,12
4	3770,84
5	12538,71
6	13426,16
7	31012,8
8	19466,5
9	14359,4
10	14189,55
11	15134,25
12	6410,11
13	14036,87
14	15439,6
15	13254,39
16	12572,11
17	29736,98
18	28991,72
19	26976,36

Fonte: Do Autor (2016).

Os dados dos efeitos (valores absolutos) com significância a 5% que cada parâmetro causou na extração dos inibidores de tripsina encontrados em folhas de mamona são apresentados no gráfico de Pareto (FIGURA 1). Os parâmetros Pr, T e So foram significativos na extração em seus menores níveis

devido aos valores dos efeitos de primeira ordem serem negativos, interações de segunda, terceira e quarta ordens também foram significativas, indicando que os fatores se afetam mutuamente na extração do inibidor de tripsina presente em FFM.

Figura 1 - Gráfico de Pareto do planejamento fatorial  $2^4$ .



Efeitos que ultrapassam a linha de  $p = 0,05$  de significância à direita são considerados significantes para a extração do inibidor de tripsina de folhas de mamona. X1=Tempo; X2=Reextração; X3=Solvente; X4=Proporção. Fonte: Do Autor (2016).

Utilizando-se os coeficientes de regressão linear significantes obtidos na Tabela 5 produziu-se a equação de regressão linear para as superfícies de resposta (Equação 3).

Tabela 5 - Coeficientes de regressão e suas significâncias na equação de regressão linear para a inibição de tripsina de *S. frugiperda*

	Efeitos	Erro	t	p	Significante
Intercepto	$8,91 \times 10^4$	$6,62 \times 10^3$	13,4627	1,76	sim
Tempo( $X_1$ )	-311,9833	54,0658	-5,7704	0,0045	sim
Reextração( $X_2$ )	$-1,72 \times 10^4$	$1,79 \times 10^3$	-9,624	$6,52 \times 10^{-4}$	sim
Solvente( $X_3$ )	-359,9785	108,132	-3,3291	0,0291	sim
Proporção( $X_4$ )	$-1,66 \times 10^6$	$1,95 \times 10^5$	-8,5155	0,001	sim
$X_1 * X_2$	-0,0091	11,2735	-0,0008	0,9994	não
$X_1 * X_3$	-0,6682	0,7516	-0,889	0,4242	não
$X_1 * X_4$	$1,02 \times 10^4$	$1,35 \times 10^3$	7,5099	0,0017	sim
$X_2 * X_3$	242,6137	22,547	10,7604	$4,23 \times 10^{-4}$	sim
$X_2 * X_4$	$2,78 \times 10^5$	$4,06 \times 10^4$	6,8576	0,0024	sim
$X_3 * X_4$	$-5,35 \times 10^3$	$2,71 \times 10^3$	-1,9789	0,1189	não

Fonte: Do Autor (2016).

$$\begin{aligned}
 \text{Inibição} = & 8,91 \times 10^4 - 311,98X_1 - 1,72 \times 10^4 X_2 - 359,98X_3 - \\
 & 1,66 \times 10^6 X_4 + 1,02 \times 10^4 X_1 X_4 + 242,61 X_2 X_3 + 2,78 \times 10^5 X_2 X_4 \quad (3)
 \end{aligned}$$

A análise de variância (TABELA 6) da Equação 3 se mostrou não significativa ( $F_{\text{calc}}=0,8509$ ;  $p=0,5983$ ). Os parâmetros utilizados na extração possuem grande interferência entre si como pôde ser observado na Figura 1, constituindo um sistema complexo a ser analisado. A equação proposta prevê apenas parcialmente como os fatores influenciam a extração do inibidor de tripsina.

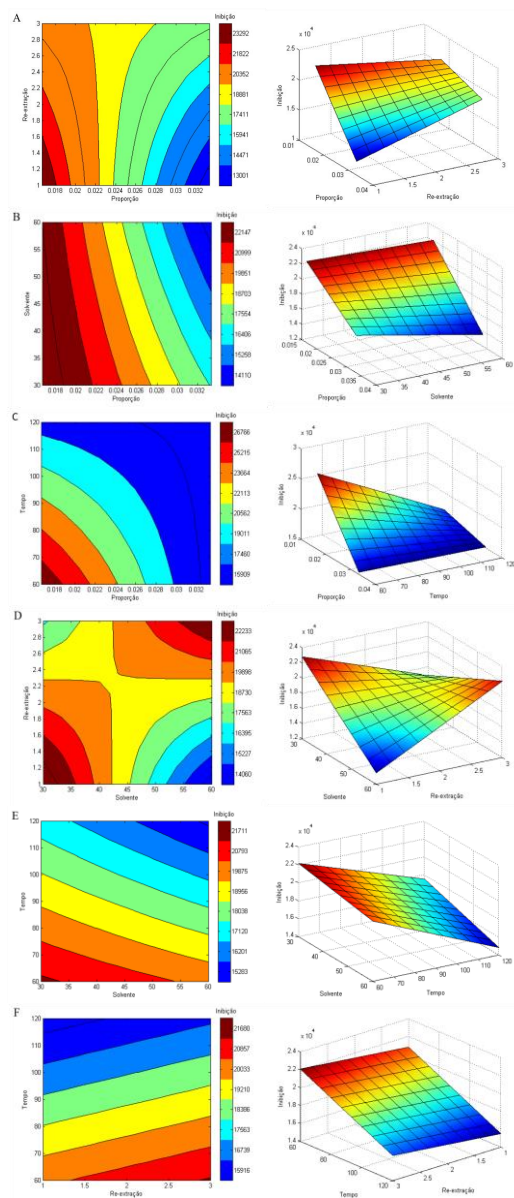
Tabela 6 - ANOVA da equação de regressão linear das superfícies de resposta.

<b>FV</b>	<b>SQ</b>	<b>nGL</b>	<b>MQ</b>	<b>Fcalc.</b>	<b>p</b>
<b>Regressão</b>	$7,48 \times 10^8$	10	$7,48 \times 10^7$	0,8509	0,5983
<b>Resíduos</b>	$8,79 \times 10^8$	10	$8,79 \times 10^7$		
<b>F. Ajuste</b>	$8,72 \times 10^8$	6	$1,45 \times 10^8$	79,4185	$4,11 \times 10^{-4}$
<b>Erro Puro</b>	$7,32 \times 10^6$	4	$1,83 \times 10^6$		
<b>Total</b>	$1,63 \times 10^9$	20			
<b>R<sup>2</sup></b>	0,4597				
<b>R<sup>2</sup> explicável</b>	0,9955				

Fonte: Do Autor(2016).

Apesar do modelo adotado não ser significativo, foram criadas superfícies de resposta para observação de quais fatores avaliados tenderiam em aumentar ou diminuir a inibição de tripsina de *S. frugiperda*. Os dados indicam o aumento linear na inibição com o efeito causado tanto por T, Pr e So (FIGURA 2, expandida no ANEXO A), sendo que em todas as interações observadas os fatores em seus menores níveis apresentaram aumento na inibição. No gráfico de Pareto (FIGURA 1), T, Pr e So são significativos em primeira ordem e em interações de segunda, terceira e quarta ordens. O fator Re apesar de não significativo em primeira ordem na extração apresentou melhores resultados segundo as superfícies de resposta em seu menor valor nas interações com Pr e So, sendo que sua interação com T foi o oposto (FIGURAS 2A, 2D e 2F), seu valor foi fixado para extrações posteriores em uma reextração devido a essa observação. O fator T foi significativo, contudo, a análise das superfícies de resposta indica que seu efeito sobre a extração do inibidor de tripsina de FFM só é mais significativo que Re (FIGURA 2F), por isso ele também foi fixado em seu menor valor (60 min) para extrações posteriores.

Figura 2 - Gráficos de superfície de contorno (2D) e superfície de resposta (3D) do planejamento fatorial  $2^4$  da extração dos inibidores de tripsina de mamona.



A – Proporção amostra/solvente x N<sup>o</sup> reextrações; B – Proporção amostra/solvente x Solvente; C – Proporção amostra/solvente x Tempo; D – Solvente x N<sup>o</sup> reextrações; E – Solvente x Tempo; F – N<sup>o</sup> reextrações x Tempo. Fonte: Do Autor (2016).



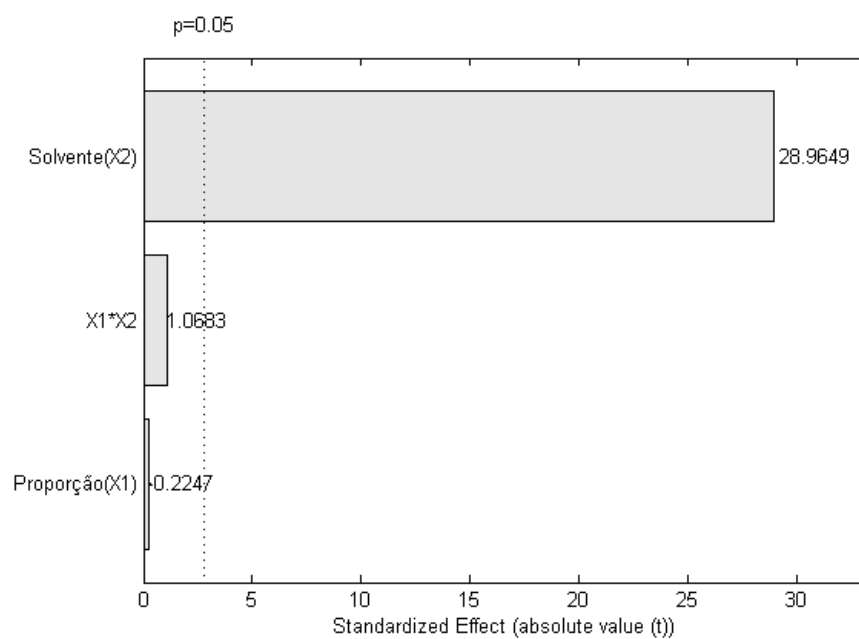
A inibição da atividade de tripsina de *S. frugiperda* causada pelos extratos obtidos nos experimentos 1 a 13 (TABELA 7) foi utilizada como resposta para os cálculos do planejamento CCD 2<sup>2</sup>.

Tabela 7 - Inibição causada pelos extratos de farinha de folhas de mamona obtidos nos experimentos de extração utilizando planejamento composto central 2<sup>2</sup>

<b>Experimento</b>	<b>Inibição (mUTI g<sup>-1</sup> FFM)</b>
1	24447,63
2	34343,10
3	29428,76
4	41884,77
5	12298,25
6	2904,71
7	5921,21
8	59542,43
9	43711,83
10	44215,66
11	42459,86
12	45803,52
13	44047,72

Fonte: Do Autor (2016).

Os dados dos efeitos (valores absolutos) com significância a 5% são apresentados no gráfico de Pareto (FIGURA 3). O parâmetro *S<sub>0</sub>* foi significativo na extração, já *P<sub>r</sub>* e a interação entre os parâmetros não foram significativos.

Figura 3 - Gráfico de Pareto do planejamento composto central 2<sup>2</sup>.

Legenda: Efeitos que ultrapassam a linha à direita são considerados significantes para a extração do inibidor de tripsina de folhas de mamona com 95% de confiança.

Fonte: Do Autor (2016).

Por meio dos coeficientes de regressão linear significantes obtidos na Tabela 8, produziu-se a equação de regressão polinomial para as superfícies de resposta (Equação 4).

Tabela 8 - Coeficientes de regressão do planejamento composto central 2<sup>2</sup> e suas significâncias na equação de regressão polinomial de segunda ordem para a inibição de tripsina de *S. frugiperda*

	Efeitos	Erro	t	p	Significante
Intercepto	-3,84 x 10 <sup>5</sup>	1,53 x 10 <sup>4</sup>	25,0424	1,51 x 10 <sup>-5</sup>	sim
Proporção(X1)	3,58 x 10 <sup>7</sup>	1,18 x 10 <sup>6</sup>	30,4426	6,94 x 10 <sup>-6</sup>	sim
Solvente(X2)	1,63 x 10 <sup>3</sup>	271,5317	6,0105	0,0039	sim
X1*X2	1,02 x 10 <sup>4</sup>	9,59 x 10 <sup>3</sup>	1,0683	0,3456	não
X1 <sup>2</sup>	-8,72 x 10 <sup>8</sup>	2,62 x 10 <sup>7</sup>	-33,305	4,85 x 10 <sup>-6</sup>	sim
X2 <sup>2</sup>	-11,4138	2,0195	-5,6518	0,0048	sim

Fonte: Do Autor (2016).

$$\text{Inibição} = -3,84 \times 10^5 + 3,58 \times 10^7 X_1 + 1,63 \times 10^3 X_2 - 8,72 \times 10^8 X_1^2 - 11,41 X_2^2 \quad (4)$$

A análise de variância (TABELA 9) da Equação 4 se mostrou significativa ( $F_{\text{calc}}=5,217$   $p=0,0258$ ). O  $F_{\text{calc}}$  para falta de ajuste foi de apenas 173,2; valor relativamente insignificante próximo ao Erro Puro de  $5,75 \times 10^6$ . O valor de R<sup>2</sup> não atingiu alto grau de ajuste entre os dados observados aos previstos, porém, maior que no FAT 2<sup>4</sup>.

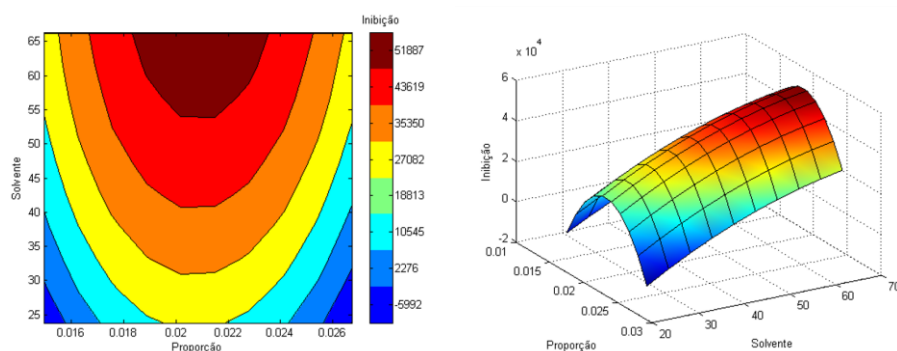
Tabela 9 - ANOVA da equação de regressão polinomial da superfície de resposta do planejamento composto central 2<sup>2</sup>

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
<b>Regressão</b>	2,80 x 10 <sup>9</sup>	5	5,60 x 10 <sup>8</sup>	5,217	0,0258
<b>Resíduos</b>	7,52 x 10 <sup>8</sup>	7	1,07 x 10 <sup>8</sup>		
<b>F. Ajuste</b>	7,46 x 10 <sup>8</sup>	3	2,49 x 10 <sup>8</sup>	173,1967	1,09 x 10 <sup>-4</sup>
<b>Erro Puro</b>	5,75 x 10 <sup>6</sup>	4	1,44 x 10 <sup>6</sup>		
<b>Total</b>	3,55 x 10 <sup>9</sup>	12			
<b>R2</b>	0,7884				
<b>R2 explicável</b>	0,9984				

Fonte: Do Autor (2016).

A Figura 4 exibe a superfície de resposta gerada por meio da Equação 4, sendo que os valores experimentais não atingiram o ponto máximo da curva, porém o cálculo dos pontos máximos através da primeira derivada da Equação 4 foram  $S_o = 71,7\%$  e  $Pr = 0,02057292$  (1/48,6 p/v), ou seja, a extração é mais eficiente nestas condições.

Figura 4 - Gráficos de superfície de contorno (2D) e superfície de resposta (3D) do planejamento composto central  $2^2$  da extração dos inibidores de tripsina de mamona.



Fonte: Do Autor (2016).

Através da otimização dos parâmetros de extração, observa-se que as condições ideais de extração foram: proporção de 1 g de amostra em 48,6 mL de etanol 71,7%, extraída por 60 minutos em banho ultrassônico a 40 °C, com uma reextração nas mesmas condições. A extração nestas condições resultou em um extrato com atividade inibitória de tripsina de 94.837,14 mUTI g<sup>-1</sup> de FFM.

A inibição de tripsina obtida por Rossi et al. (2010) consistiu em extrair os inibidores de tripsina de *S. frugiperda* encontrados em folhas de mamona macerando-as e extraíndo com água destilada na proporção de 1:3 (p/v) a 4 °C sob agitação por 30 minutos; o extrato foi então centrifugado e o sobrenadante apresentou inibição de tripsina de 2.490 mUTI, 38 vezes menor que a obtida neste trabalho. Carvalho (2009) extraiu os inibidores de *S. frugiperda*

encontrados em folhas de mamona utilizando etanol em proporção 1:7 (p/v), sendo que o etanol permaneceu em contato com as folhas por 20 dias para então ser filtrado, esse extrato foi fracionado por cromatografia em fase normal, a maior atividade inibitória foi encontrada na fração eluída com etanol, com 2.000 mUTI, 47 vezes menor que a obtida neste trabalho. Ainda em mamona, Ramos et al. (2013) extraíram inibidores de tripsina de *S. frugiperda* a partir de torta de mamona parcialmente desengordurada por 30 minutos com água na proporção 1:40 (p/v), o extrato teve 21,23 mUTI g<sup>-1</sup> de semente, e após fracionamento em cromatografia sílica, tipo *flash*, foi encontrada inibição de tripsina de 8.906,12 mUTI, 10,7 vezes menor que a obtida neste trabalho.

Apesar de não ser a mesma enzima nem a mesma fonte de inibidor, Jeong et al. (2014) utilizaram procedimentos quimiométricos semelhantes aos utilizados no presente trabalho. Foram avaliados os parâmetros concentração de etanol, temperatura e tempo de extração do inibidor de lipase pancreática, enzima fundamental para absorção de gordura, encontrado nos frutos de *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bur. (Moraceae). A otimização das condições de extração teve como resposta a atividade inibitória de lipase pancreática e o rendimento de extrato produzido. A metodologia utilizada foi o planejamento fatorial Box-Behnken 3<sup>3</sup>, com superfície de resposta. A análise de regressão mostrou um bom ajuste dos dados experimentais e a condição ótima foi obtida com concentração de etanol 74,5%; temperatura de 61,9 °C e o tempo de extração de 13,5 horas. O rendimento e a atividade de lipase pancreática de extração sob condições ótimas foram 65,5% e 54,0%, respectivamente, valores condizentes com os previstos de 65,8% e 47,1% respectivamente. As condições de extração avaliadas no presente trabalho não se aproximaram dos valores teóricos obtidos, contudo, o aumento significativo na inibição de tripsina após extração nas condições ideais confirma que o método foi eficiente.

## 5.2 Purificação cromatográfica

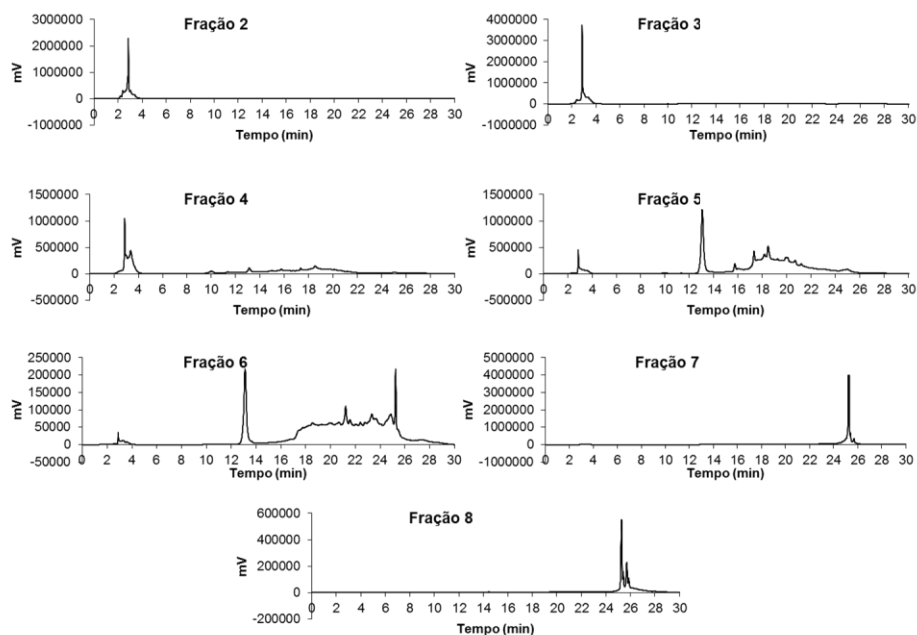
A partir do extrato com as condições padronizadas e maior atividade inibitória de tripsina, foram obtidas as frações na Cromatografia em sílica tipo *flash*. Estas tiveram seu potencial inibidor avaliado através de ensaio de inibição de tripsina não cinético. Os resultados expressos em porcentagem de inibição (TABELA 10) indicaram que as frações 2 a 8 possuem compostos inibidores. Devido ao seu potencial inibitório, 5  $\mu$ L das frações 2 a 8 foram eluídas em HPLC-modo analítico. Os cromatogramas destas frações estão apresentados na Figura 5.

Tabela 10 - Porcentagem de inibição das frações obtidas na Cromatografia Flash

<b>Frações</b>	<b>% Metanol</b>	<b>% de inibição</b>
1	0	37,41
2	10	81,78
3	20	83,89
4	30	82,98
5	40	84,88
6	50	82,65
7	60	84,38
8	70	40,22

Fonte: Do Autor (2016).

Figura 5 - Cromatogramas das frações obtidas no fracionamento do extrato de farinha de folhas de mamona fracionada por meio de cromatografia flash.



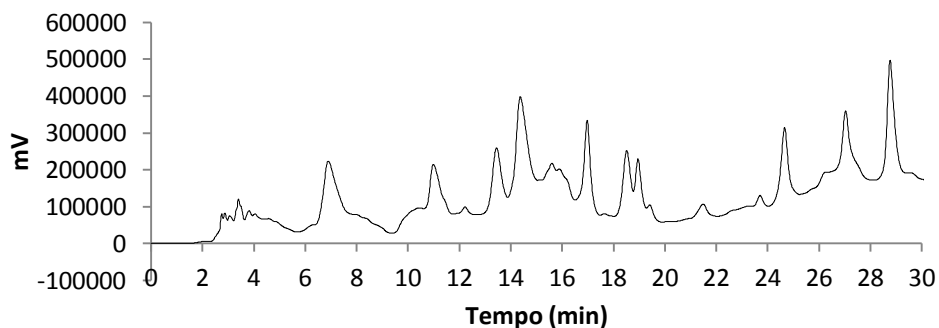
Legenda: Fase móvel metanol/água com força de eluição crescente, frações: 2 = 10%; 3 = 20%; 4 = 30%; 5 = 40%; 6 = 50%; 7 = 60%; Detecção a 254 nm.

Fonte: Do Autor (2016).

Os resultados obtidos em HPLC-CAN, quando analisados com o resultado de inibição das frações, sugerem que o pico com tempo de retenção de 13,09 min pode ser o responsável pela inibição. Este pico encontra-se presente nas frações 4, 5 e 6, e em todas foi encontrada atividade antitriptica. Apesar de ser encontrada inibição também na fração 7, o pico observado apresentou alguns picos menores próximos a sua base, indicando presença de outros compostos que dificultariam a purificação, pois eluem ao mesmo tempo, ainda foi observado a presença de picos mal resolvidos entre 16 e 26 min na fração 6. Assim sendo, foram agrupadas as frações 4 e 5. Estes cromatogramas encontram-se expandidos no Anexo B.

Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  das frações 4 e 5 foram eluídas (FIGURAS 6 e 7) e os picos com melhores resoluções foram coletados e tiveram seus potenciais inibitórios avaliados em um ENC (TABELA 11). Todos os picos coletados, de ambas as frações, apresentaram inibição sobre a tripsina. Foi possível observar no perfil cromatográfico das frações que o aumento do volume de injeção provocou atraso na eluição dos compostos em comparação com os respectivos perfis mostrados na Figura 5.

Figura 6 - Cromatograma da fração 4 obtida em fracionamento por meio de cromatografia flash do extrato de farinha de folhas de mamona.

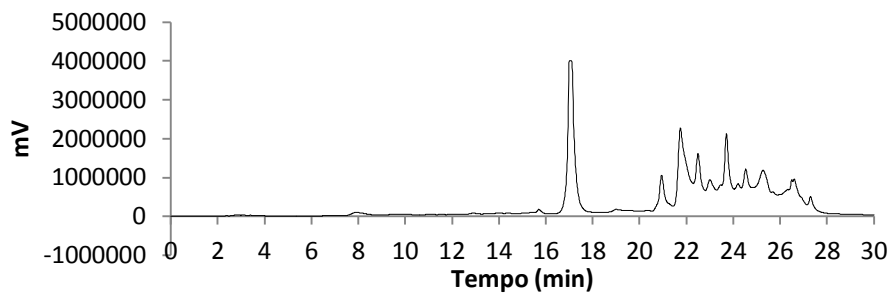


Legenda: Tempo de retenção dos picos coletados: 7,00; 10,92; 13,38; 14,30; 16,93; 21,33; 24,61; 26,98; 28,73 minutos. Detecção a 254 nm.

Fonte: Do Autor (2016).



Figura 7 - Cromatograma da fração 5 obtida em fracionamento por meio de cromatografia flash do extrato de farinha de folhas de mamona.



Legenda: Tempo de retenção dos picos coletados: 15,73; 17,07; 20,90 minutos. Detecção a 254 nm.

Fonte: Do Autor (2016).

Tabela 11 - Atividade inibitória de tripsina nos picos das frações 4 e 5

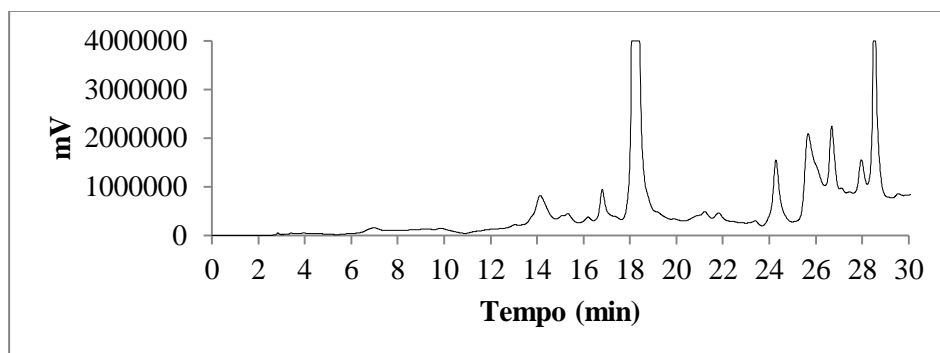
Fração 4		Fração 5	
Tempo de retenção do pico	% inibição	Tempo de retenção do pico	% inibição
7,00	70,69	15,73	43,18
10,92	68,68	17,07	63,87
13,38	69,35	20,9	70,69
14,30	70,47		
16,93	61,07		
21,33	62,98		
24,61	68,68		
26,98	69,91		
28,73	70,36		

Fonte: Do Autor (2016)

Após agrupadas, 20  $\mu$ L da Fr 4-5 foram eluídos para avaliação da mudança no perfil cromatográfico e na resolução dos picos principais (FIGURA 8). É possível observar que o agrupamento das frações possibilitou a separação dos picos mais expressivos pois o perfil se manteve o mesmo tanto em HPLC-CAN quanto em HPLC-CPR com volume de injeção de 1 mL na concentração

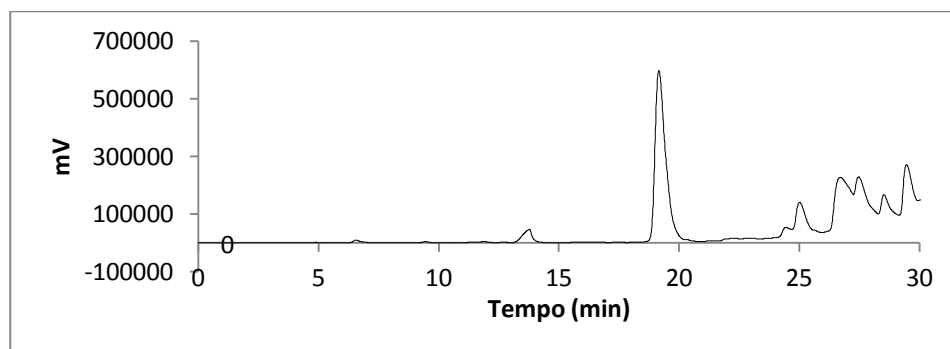
de  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  (FIGURA 9), facilitando a coleta de dois picos com boa resolução, aparentemente puros, para identificação e caracterização.

Figura 8 - Cromatograma das frações 4 e 5 agrupadas obtidas por meio de fracionamento em cromatografia flash do extrato de farinha de folhas de mamona.



Legenda: Detecção a 254 nm.  
Fonte: Do Autor (2016).

Figura 9 - Cromatograma da fração Fr 4-5 eluída em HPLC preparativo.

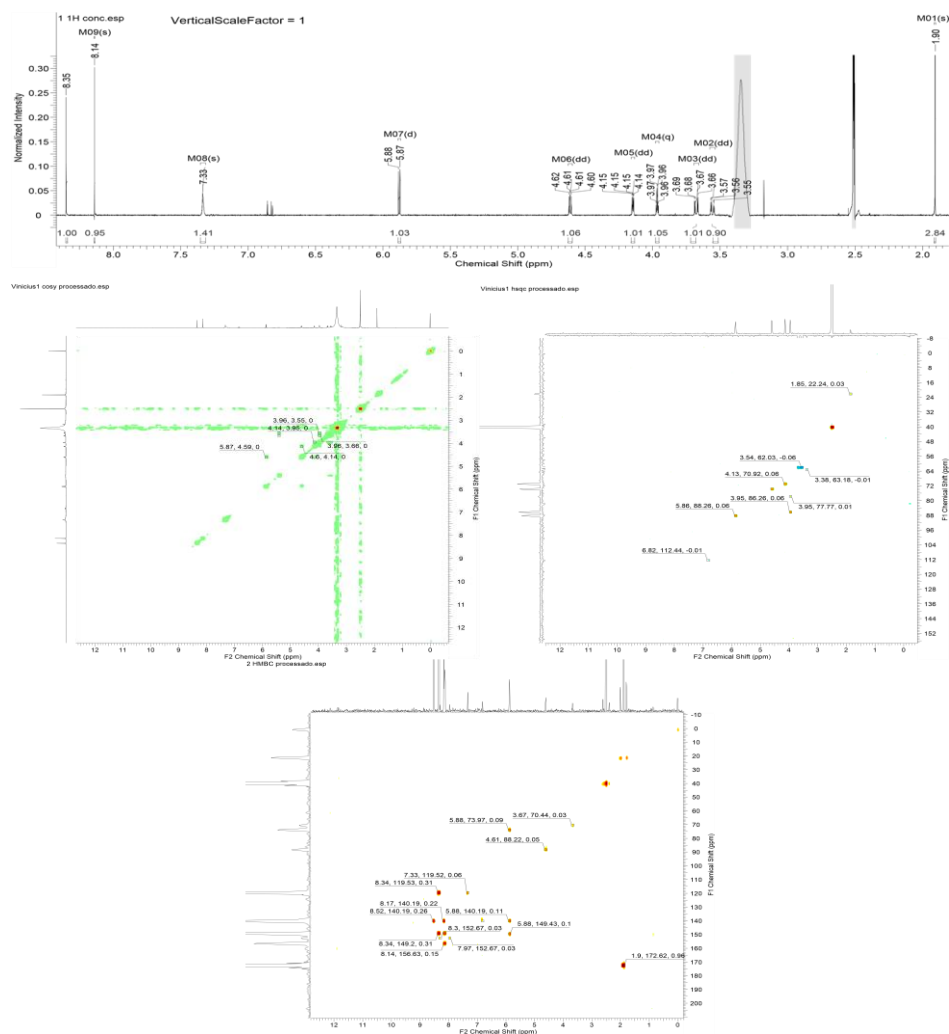


Legenda: Foram coletados os picos eluídos em  $t_r = 13,79$  minutos e em  $t_r = 19,16$  minutos para identificação e caracterização estrutural. Detecção a 254 nm.  
Fonte: Do Autor (2016).

### **5.3 Identificação e Caracterização por meio de Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas**

Os deslocamentos químicos, as constantes de acoplamento obtidas dos espectros de RMN -  $^1\text{H}$ , COSY, HMBC e HSQC para o composto coletado após separação cromatográfica com  $t_r = 13,79$  min. podem ser observados na Figura 10 (Dados completos Anexo B).

Figura 10 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , COSY, HSQC e HMBC para o composto majoritário coletado após separação cromatográfica com  $t_r = 13,79$  min.



Legenda:  $^1\text{H}$  600 MHz;  $^{13}\text{C}$  150 MHz; dimetilsulfóxido- $d_6$ .

Fonte: Do Autor (2016).

Os sinais  $\delta_{\text{H}}$  8,14 e 8,35 (H-2 e H-8 respectivamente) observados na região de aromáticos com área de integração de um hidrogênio cada apresentam

correlação HSQC direta com os carbonos C-2 e C-8 ( $\delta_C$  152,67 e 140,21 respectivamente). O singlete H-2, mais blindado, trata-se de hidrogênio em sistema heterocíclico aromático, apresentando correlação HMBC com os carbonos C-4 ( $\delta_C$  149,43) e C-6 ( $\delta_C$  156,63), já o singlete H-8, menos blindado, apresenta correlação HMBC com os carbonos C-4 e C-5 ( $\delta_C$  119,53). Os carbonos C-2, C-4, C-5, C-6 e C-8 são desblindados e se encontram na região de compostos aromáticos, como são apenas cinco, a hipótese que formam um composto heterocíclico é reforçada. Como os sistemas H-C-2 e H-C-8 não apresentam correlação HMBC é possível que estes não pertençam ao mesmo anel. Os valores observados e as correlações estabelecidas evidenciam a presença de uma unidade adenina na estrutura em análise, fato corroborado pela literatura (LI; YU; JI, 2014).

Adicionalmente, o sinal em  $\delta_H$  5,88 (d; 6,20 Hz, H-1') com característica de hidrogênio anomérico de unidade de ribose apresentou correlação HSQC com C-1' ( $\delta_C$  88,26), mostrando estar ligado a este carbono; já a correlação HMBC com C-4, C-8 e C-2' ( $\delta_C$  73,69) indica proximidade entre estes carbonos, dois dos quais pertencentes à unidade adenina descrita anteriormente. Os hidrogênios H-1', H-2', H-3', H-4', H-5'a e H-5'b ( $\delta_H$  5,88; 4,61; 4,15; 3,97; 3,56 e 3,68 respectivamente) apresentaram correlação HMBC, HSQC e COSY entre si de forma consistente com a descrição na literatura de uma unidade de ribose ligada à unidade adenina. A presença dos sinais em  $\delta_H$  1,90 e  $\delta_C$  22,24 e  $\delta_C$  172,62 deve-se à contaminação de ácido acético presente na fase móvel da separação cromatográfica. O sinal em  $\delta_H$  7,33 é característico do grupo  $NH_2$  presente na unidade adenina com utilização de  $DMSO - d_6$  e a ausência dos sinais das hidroxilas da unidade ribose provavelmente deve-se à presença de  $H_2O$  formando ligações de hidrogênio. Por este mesmo motivo os sinais  $\delta_H$  8,17 e  $\delta_H$  8,52 em correlação HMBC com o C-8 podem ter sido causados por ligação de

hidrogênio em N-7 e N-9 com a água presente durante a análise de RMN. No espectro de massas (ANEXO B), o íon precursor formado  $(M + H)^+$  possui 268,1045  $m/z$ . Os deslocamentos e o íon precursor obtidos são consistentes com a literatura para o composto adenosina (FIGURA 11) cuja composição elementar é  $C_{10}H_{13}N_5O_4$  (LI; YU; JI, 2014; ZHAO et al., 2013).

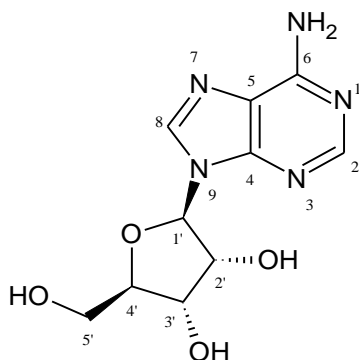
Este é o primeiro relato de isolamento, identificação e caracterização de adenosina em *R. communis*. As constantes de acoplamento (J) e os deslocamentos químicos podem ser observados na Figura 10, Tabela 12 e no Anexo B.

Tabela 12 - Dados espectroscópicos para o composto majoritário coletado após separação cromatográfica com  $t_r = 13,79$  min. ( $^{13}C$  150 MHz;  $^1H$  600 MHz; dimetilsulfóxido  $d_6$ ).

Nº	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm) – J em Hz
2	152,67	8,14; s
4	149,43	
5	119,53	
6	156,63	
8	140,21	8,35; s
1'	88,26	5,88 ; d (6,20)
2'	73,69	4,61; dd (5,00; 6,20)
3'	70,44	4,15; dd (3,20; 5,00)
4'	86,26	3,97; ddd (3,20; 3,50)
5'a	62,03	3,56; dd (3,50; 12,10)
5'b	62,03	3,68; dd (3,50; 12,10)

Fonte: Do Autor (2016).

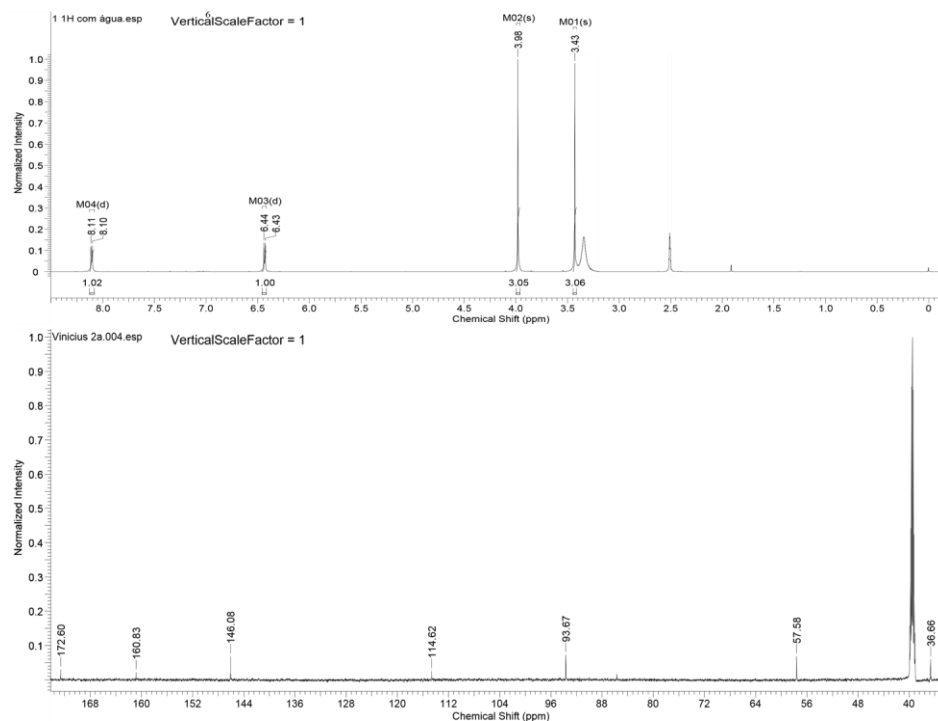
Figura 11 - Fórmula estrutural do composto purificado e identificado como adenosina.



Fonte: Do Autor (2016).

Os deslocamentos químicos, as constantes de acoplamento obtidas dos espectros de RMN -  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o composto majoritário coletado após separação cromatográfica com  $t_r = 19,16$  min. podem ser observados na Figura 12.

Figura 12 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para o composto majoritário coletado após separação cromatográfica com  $t_r = 19,16$  min.



$^1\text{H}$  600 MHz;  $^{13}\text{C}$  150 MHz dimetilsulfóxido  $\text{d}_6$ . Fonte: Do Autor (2016).

Há a presença de sinais de dois dupletos acoplados, com integração de um hidrogênio cada, no espectro de  $^1\text{H}$ . O primeiro encontra-se mais blindado em  $\delta_{\text{H}}$  6,43 (H-5) e outro menos em  $\delta_{\text{H}}$  8,11 (H-6) com constante de acoplamento  $J = 7,70$  Hz. Estes sinais são característicos da região de hidrogênios ligados a uma unidade aromática e a constante de acoplamento alta que se encontram adjacentes; como nenhum outro sinal de hidrogênio foi observado é forte a evidência de que o sistema aromático apresenta assimetria nos outros quatro substituintes ou trata-se de anel contendo heteroátomos. A diferença entre os sinais é maior que a esperada para dois hidrogênios em orientação orto em um anel aromático clássico, o que reforça a hipótese de assimetria no composto.



Os outros dois sinais presentes no espectro de  $^1\text{H}$  são característicos de grupos metila ligados a grupos eletronegativos, mas assim como H-5 e H-6, seus sinais apresentam diferença quanto aos deslocamentos químicos. Os dois sinais integram três hidrogênios cada, porém, o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,43 (H-1') é menos blindado que o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  3,98 (H-5'). Como ambos sinais não apresentam constante de acoplamento entre si ou com os demais hidrogênios presentes no composto, infere-se que cada um deles encontra-se ligado a heteroátomos diferentes, H-5' ao mais eletronegativo.

Foram observados oito sinais no espectro de  $^{13}\text{C}$ , sendo que dois sinais são característicos de grupos metila, correlacionando os sinais 36,66 (C-1') e  $\delta_{\text{C}}$  57,58 (C-5') com H-1' e H-5' respectivamente. O sinal de C-5' é característico de grupo metoxila ligado à unidade aromática, o sinal em  $\delta_{\text{C}}$  172,60 (C-4) também é característico de carbono de sistema aromático ligado ao oxigênio de grupo metoxila. O sinal de C-4 também se encontra na região de carbono de ácido carboxílico, como observado para o composto adenosina, que sofreu contaminação com ácido acético. Este sinal poderia ser devido ao mesmo motivo, contudo, não há o sinal de metila do ácido acético nos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto majoritário coletado após separação cromatográfica com  $t_{\text{r}} = 19,16$  min, portanto C-4 encontra-se ligado ao oxigênio do grupo metoxila C-5'.

Outro sinal interessante apresenta deslocamento  $\delta_{\text{C}}$  114,62 (C-2'), este sinal correlaciona-se com carbono de nitrila ligado a anel aromático. Seu efeito em aumentar a blindagem é observado em C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  85,71), carbono ao qual se encontra ligado.

O espectro de massas em modo de ionização ESI apresentou o pico do íon precursor formado  $(\text{M} + \text{H})^+$  com 165,0664 m/z. O conjunto de informações obtido com os deslocamentos nas análises de RMN e a massa de alta resolução em espectrometria de massas comparadas com a literatura sugerem que o

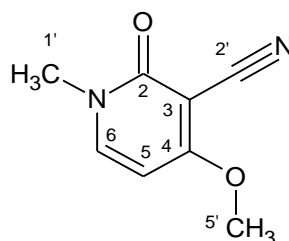
composto majoritário coletado em  $t_r = 19,16$  min. é um dos principais alcaloides presentes em mamona, a ricinina, cuja fórmula molecular é  $C_8H_8N_2O_2$ . Os deslocamentos de  $^1H$  e  $^{13}C$  RMN podem ser observados na Figura 12 e na Tabela 13, a estrutura da molécula na Figura 13 e os dados detalhados no material suplementar do anexo C (GUO et al., 2015; PENG et al., 2014).

Tabela 13 - Dados espectroscópicos para o composto majoritário coletado após separação cromatográfica com  $t_r =$  min. ( $^{13}C$  150 MHz;  $^1H$  600 MHz; dimetilsulfóxido  $d_6$ ).

Nº	$d_C$ (ppm)	$d_H$ (ppm) – J em Hz
6	146,62	8,11; d (7,7)
5	93,67	6,43; d (7,7)
4	172,6	
3	85,71	
2	160,83	
5'	57,58	3,98; s
2'	114,62	
1'	36,66	3,43; s

Fonte: Do Autor (2016).

Figura 13 - Fórmula estrutural do composto purificado e identificado como ricinina.



Fonte: Do Autor (2016).

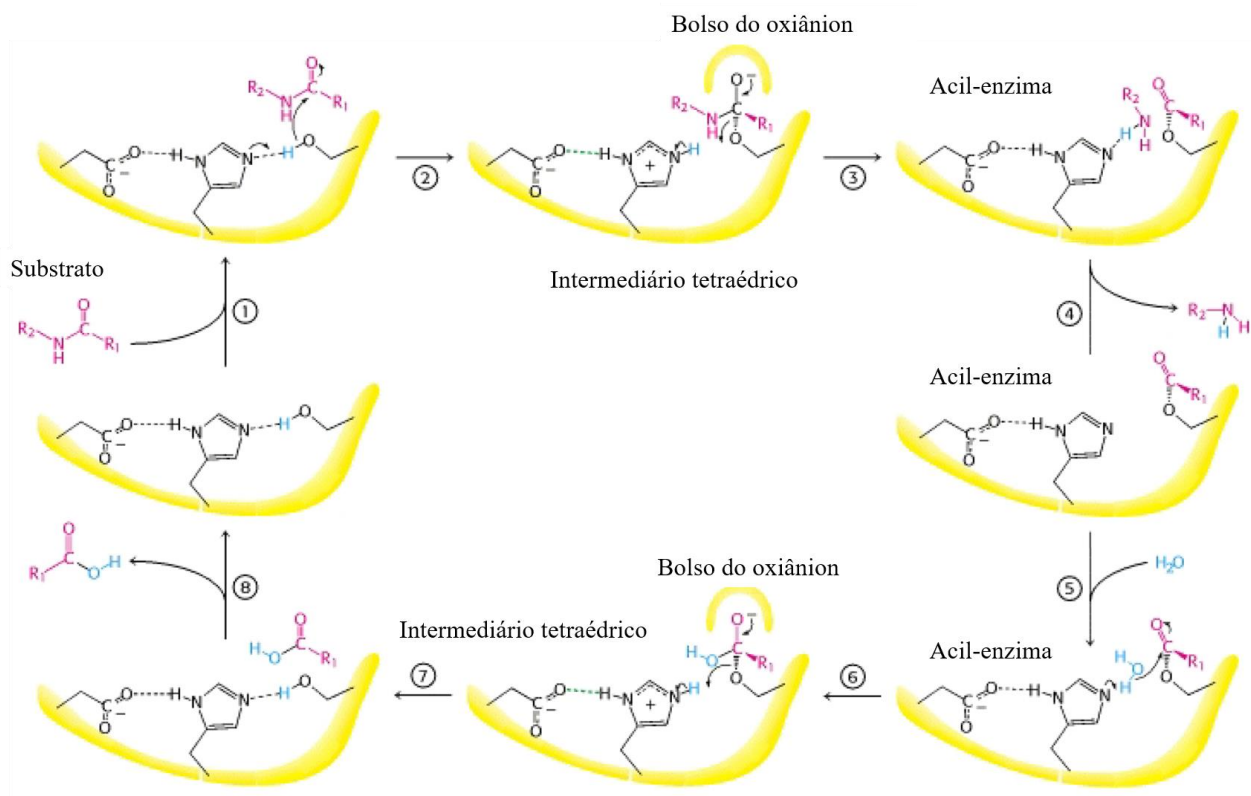
A ricinina é um alcaloide neutro tóxico encontrado tanto em folhas quanto em sementes de mamona, os sintomas da ingestão incluem danos ao

fígado e rins, vômitos e convulsões, podendo levar à morte, por isso vários estudos são dedicados a entender e avaliar como o composto atua no organismo (GUO et al., 2015; PENG et al., 2014). Entretanto, é possível citar estudos utilizando ricinina como possível fármaco no tratamento de amnésias e atividade antiacetilcolinesterase (FERRAZ et al., 1999; KHAN et al., 2016) e também no controle de pragas como *S. exigua* e *S. frugiperda* (BULLANGPOTI et al., 2011; FLORES-MACÍAS et al., 2016; RAMOS-LOPEZ et al., 2010).

Há a hipótese que inibição da atividade da tripsina de *S. frugiperda* por ricinina pode estar diretamente relacionada ao sítio catalítico desta enzima ou ao bolsão S1, responsável pela especificidade de tripsina à substratos contendo lisina ou arginina, estes aminoácidos caracterizam-se por serem carregados positivamente.

O sítio catalítico de tripsina caracteriza-se pela tríade formada pelos resíduos Aspartato 102, Histidina 57 e Serina 195. O mecanismo de catálise observado na Figura 14 mostra que a etapa inicial da reação de quebra da ligação peptídica envolve remoção do próton da Ser 195 pela His 57 em conjunto com Asp 102, deixando o oxigênio da Ser 195 com carga negativa livre para formar o intermediário tetraédrico com o substrato (LIN et al., 2014).

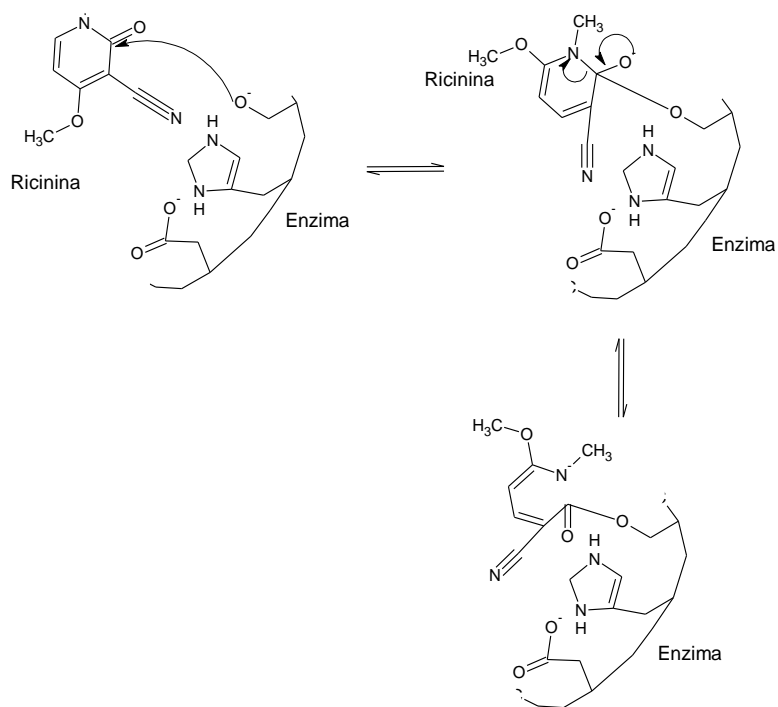
Figura 14 - Mecanismo de catálise enzimática de tripsina.



Fonte: Do Autor (2016)

A Ser 195 em sua forma aniônica pode se ligar à ricinina por meio do nitrogênio da nitrila e a ressonância do anel aromático estabilizar a carga negativa adicional da Ser 195 (FIGURA 15).

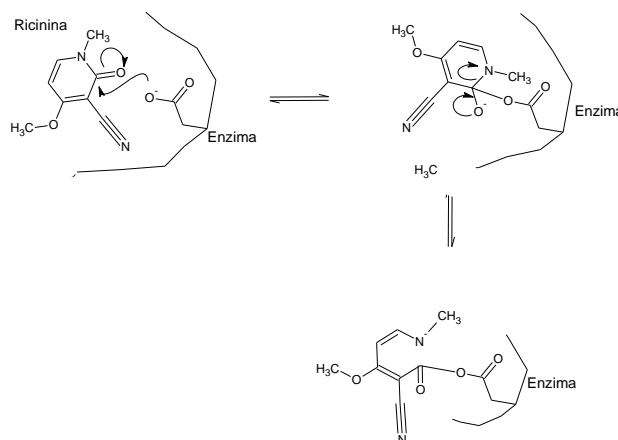
Figura 15 - Ligação de ricinina ao sítio catalítico de tripsina.



Fonte: Do autor

O bolsão S1 (FIGURA 16) possui um aspartato no fundo carregado negativamente, por isso a especificidade de tripsina por substratos contendo grupos carregados positivamente. Além de lisina e arginina, o outro aminoácido carregado positivamente é a histidina, porém é muito grande para caber no bolsão S1 devido ao anel na cadeia lateral. A forma de ligação e estabilização da ricinina ao bolso S1 é a mesma proposta para o sítio catalítico (FENG; ZHANG, 2012).

Figura 16 - Ricinina ligada ao bolsão S1 de tripsina.



Fonte: Do Autor (2016).

As duas hipóteses da forma como o inibidor ricinina pode se ligar à tripsina são plausíveis, e da forma apresentada, a inibição da tripsina de *S. frugiperda* por ricinina seria competitiva em vista da ligação formada estar em equilíbrio e, portanto, reversível.

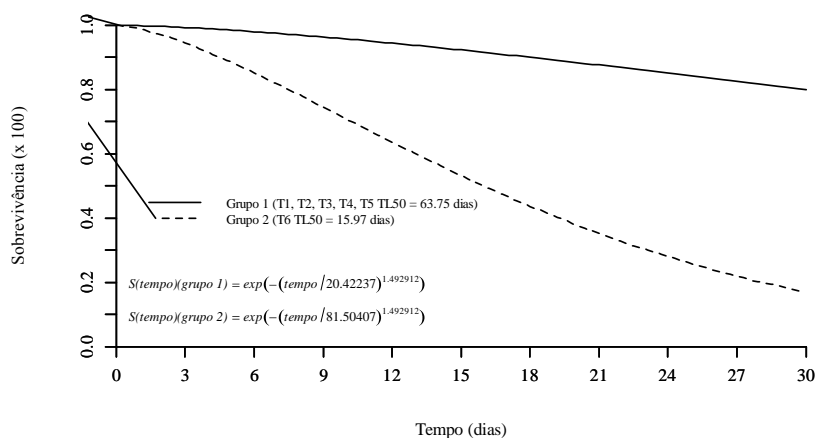
#### 5.4 Atividade inibitória de tripsina por ricinina e adenosina

Na análise das frações agrupadas (Fr 4-5), apenas os picos 1 ( $t_r=14,09$  min) e 2 ( $t_r=18,13$  min) puderam ser utilizados nos procedimentos de identificação visto que ambos apresentaram atividade inibitória da tripsina de *S. frugiperda*. Picos esses que de acordo com as análises de RMN e espectrometria de massas foram identificados respectivamente como adenosina e ricinina. A atividade antitrípica foi observada apenas em ricinina, com  $103,21$  mUTI  $\text{mg}^{-1}$  de ricinina após purificação. O rendimento da purificação deste composto foi da ordem de  $0,71\%$  em relação ao extrato de FFM e  $0,277\%$  em relação à FFM, logo essa atividade inibitória foi obtida de apenas  $361$  mg de FFM.

### 5.5 Efeito do Extrato de Folhas de Mamona no Desenvolvimento de *S. frugiperda*

O bioensaio durou 57 dias, tempo extremamente longo de avaliação para *S. frugiperda*. Nesse período, a sobrevivência das lagartas de *S. frugiperda* foi reduzida apenas pelo tratamento com maior concentração do extrato de FFM. O valor do tempo letal para 50% da população (TL50) do controle e tratamentos com concentrações 113,6; 227,3; 454,5 e 909,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi calculado em 63,75 dias, observado no Grupo 1 da Figura 17, isso indica que nas concentrações menores o inibidor não causa a mortalidade significativa dos insetos no período larval.

Figura 17 - Sobrevivência de lagartas da espécie *Spodoptera frugiperda* ao longo do tempo, alimentadas com dieta artificial contendo diferentes concentrações do extrato de farinha de folhas de mamona.



Legenda: Grupo 1: Lagartas alimentadas com dieta contendo o tratamento controle e tratamentos nas concentrações de 113,6; 227,3; 454,5 e 909,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extrato (T1, T2, T3, T4 e T5 respectivamente), TL50 = 63,75 dias. Grupo 2: Lagartas alimentadas com dieta contendo o tratamento na concentração de 1.818,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extrato (T6) TL50 = 15,97 dias.

Fonte: Do Autor (2016).

Nos tratamentos com concentração de extrato 0; 113,6; 227,3 e 454,5; 909,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  poucos insetos morreram (6,66; 8,33; 10,00; 8,33 e respectivamente) durante todo o bioensaio, o que justifica o agrupamento destes tratamentos na Figura 14. No tratamento com concentração de extrato de 1818,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 79,17% dos insetos morreram, valor significativamente acima dos demais tratamentos. Neste tratamento ainda foi observado que o período larval, cuja média foi de 26,21 dias (TABELA 14), apresentou grande dispersão em torno da média com insetos morrendo nos primeiros instares larvais até larvas ainda vivas com 56 dias.

Como poucos insetos chegaram à fase adulta no tratamento contendo 1.818,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não foi possível avaliar as características referentes à reprodução neste tratamento (TABELA 14).

O aumento na concentração de proteínas nas fezes foi significativo e diretamente proporcional ao aumento na concentração de extrato de FFM na dieta mesmo na menor concentração de extrato utilizada. Este resultado valida todos os demais, pois a baixa absorção de proteínas causa prejuízo ao crescimento e desenvolvimento do inseto. As concentrações de extrato de FFM de 113,6; 227,3 e 454,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  aparentam ser toleradas pelos insetos e por isso quase não há alteração nos parâmetros avaliados. A concentração de 909,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extrato causou maiores alterações em relação às três concentrações mais baixas, contudo, a concentração de 1.818,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foi a que mais afetou negativamente os insetos, causando inclusive maior mortalidade, o que impediu a avaliação dos parâmetros de adultos, maior redução no peso das pupas e aumento do período pré-pupal, indicando maior dificuldade em construir o casulo que é feito principalmente de seda, um polímero proteico (TABELA 14).

A duração do período larval foi aumentada significativamente de 14,57 dias no controle para 26,21 dias na maior concentração (TABELA 14). Este



aumento pode estar intimamente relacionado com a redução da capacidade das lagartas em absorver proteínas; a concentração de proteínas nas fezes aumentou em relação ao controle em todas as concentrações de extrato utilizadas. Isso condiz com o efeito inibitório da atividade da tripsina de *S. frugiperda* observado *in vitro* tanto no extrato de FFM quanto em ricinina.

Tabela 14 - Parâmetros biológicos do desenvolvimento de *Spodoptera frugiperda* alimentada com dietas contendo extrato de farinha de folhas de mamona.

[ ] extrato ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0	113,6	227,3	454,5	909,0	1818,2	F	p $\leq$	CV (%)
<b>Parâmetros avaliados</b>									
Duração período larval (dias)	14,57a	15,03a	15,50a	16,07a	19,85b	26,21c	51,81	2,2x10 <sup>-16</sup>	38.28
[ ] Proteínas fezes ( $\mu\text{g proteína/ mg fezes}$ )	1,26a	1,47b	1,45b	1,55c	1,67d	1,69d	17791	7,33x10 <sup>-12</sup>	9.08
Duração período pré-pupal (dias)	1,90a	1,95a	1,93a	1,97a	2,11b	2,17b	2,74	0,02	25.70
Duração período pupal (dias)	9,00a	9,13a	9,24a	8,97a	9,38a	9,00a	1,1	0,36	15.62
Massa pupal (mg)	211,50a	213,00a	217,30a	218,00a	202,70b	164,40c	13,47	2,19x10 <sup>-12</sup>	13.47
Período de pré-oviposição (dias)	2,43a	2,24a	2,26a	2,32a	2,86a	-*	1,63	0,17	35.57
Longevidade fêmea (dias)	12,90a	13,19a	12,52a	14,16a	14,63a	-*	0,58	0,67	37.48
Longevidade macho (dias)	14,95a	14,00a	14,83a	14,00a	14,50a	-*	0,2	0,94	31.23
Período de oviposição (dias)	8,81a	8,38a	8,83a	8,95a	9,5a	-*	0,36	0,84	32.23
Quantidade de ovos (média/casal)	2384,24a	2605,05a	2517,00a	2437,58a	1638,94b	-*	3,58	0,0092	36.00

\* Não foi possível avaliar estes parâmetros

Médias seguidas da mesma letra na mesma linha não apresentam diferença estatística a 5% de significância segundo o teste de Scott-Knott. Fonte: Do Autor (2016)

O aumento da duração do período larval pode reduzir os danos ao milho em longo prazo em campo, pois, mesmo que as lagartas se tornem mariposas saudáveis, haverá um atraso de aproximadamente 11 dias em cada geração devido ao aumento da duração do período larval. Além disso, um maior período larval aumenta a probabilidade de que as lagartas sejam predadas ou adoeçam.

Não houve efeito significativo na duração do período pupal, mas houve aumento significativo do período pré-pupal das lagartas alimentadas com dieta contendo as concentrações maiores de extrato de FFM.

A massa das pupas apresentou redução significativa nos insetos tratados com as duas maiores concentrações de extrato de FFM; o tratamento com maior concentração reduziu a massa das pupas em 22,3% em comparação aos insetos tratados com dieta controle. A assimilação de proteínas através da alimentação é o método mais simples de aquisição de aminoácidos que são essenciais ao desenvolvimento normal de grande parte dos seres vivos, sendo que alguns aminoácidos essenciais só são produzidos pelas plantas. A inibição da atividade da tripsina de *S. frugiperda* reduziu a massa das pupas pois a limitação na obtenção de aminoácidos foi crítica no desenvolvimento normal dos insetos.

Os adultos não apresentaram diferenças significativas na maioria dos parâmetros avaliados, apenas o tratamento com concentração de 909,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extrato causou redução no número de ovos por casal (TABELA 14).

Ao longo da evolução, os insetos têm desenvolvido diferentes estratégias de adaptação para contornar o efeito negativo dos inibidores de proteinases de plantas (HIVRALE et al., 2013; MELLO; SILVA-FILHO, 2002; MOON et al., 2004).

As menores concentrações de extrato de FFM podem ter ativado a defesa nos insetos e por isso não afetaram negativamente seu desenvolvimento, contudo, o custo metabólico dos insetos tratados com as maiores concentrações foi evidente devido à redução da sobrevivência, aumento do período pré-pupal e

redução na quantidade de ovos por casal. Isso condiz com uma estratégia adaptativa que consiste do aumento da atividade das enzimas digestivas após a ingestão do inibidor. Broadway et al. (1986) foram os primeiros pesquisadores a examinar os efeitos fisiológicos dos inibidores sobre as proteinases digestivas dos insetos. Estudaram lagartas de *H. zea* e *Spodoptera. exigua* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) alimentadas em dieta artificial contendo inibidor de tripsina de soja e inibidor de proteinase de batata II e verificaram que, após ingestão crônica destes inibidores, os insetos aumentaram o nível de atividade de tripsina, uma das proteinases intestinais primárias do processo digestivo. Também, Brito et al. (2001) estudando *H. virescens* observaram que a resistência a inibidores de folhas de tabaco era fruto da expressão de novas tripsinas.

O fato da massa das pupas nos tratamentos com menores concentrações serem estatisticamente iguais ao controle, provavelmente deve-se à maior absorção de aminoácidos devido à presença de isoenzimas que não geraram custo metabólico e melhoraram o processo digestivo dos insetos, pois estes podem ainda sintetizar enzimas insensíveis ou menos sensíveis aos inibidores. Jongsma et al. (1995), estudando larvas de *S.exigua* cronicamente expostas à folhas de tabaco transgênicas expressando o inibidor de tripsina da batata II, demonstraram que os insetos se adaptaram à ingestão dos inibidores pela mudança na síntese das proteinases insensíveis, induzindo o aumento de 2,5 a 3 vezes a atividade proteolítica. De forma semelhante, Jongsma e Bolter (1997) estudaram os efeitos da ingestão crônica de folhas de batata contendo altos níveis de inibidores de proteinases intestinais nas larvas do coleóptero *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) e mostraram que a atividade geral das proteinases caiu 42% nas larvas alimentadas em plantas nas quais os inibidores foram induzidos. Em contrapartida, houve um aumento de 2,5 vezes na atividade das enzimas insensíveis ao inibidor.

Após a ingestão crônica dos inibidores de proteinase de soja, as lagartas de *S. frugiperda* foram capazes de se adaptar por meio da alteração na expressão das enzimas proteolíticas presentes em seus intestinos. Os resultados evidenciaram a presença de nova atividade tripsinolítica e um considerável aumento da atividade proteolítica de quimotrisina, a qual provavelmente é menos sensível ao inibidor (PAULILLO et al., 2000). Também Lara et al. (2000) avaliaram a adaptação das lagartas de *S. exigua*, após serem alimentadas em plantas transgênicas de tabaco expressando altos níveis de inibidores de tripsina de cevada. Verificaram que os insetos se adaptaram compensando a redução de 25% na atividade das tripsinas pelo aumento da atividade de exopeptidases insensíveis ao inibidor testado.

Tripsinas presentes nos intestinos de lagartas de *H. zea* alimentadas com 0,5% de inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz foram caracterizadas, verificando a presença de uma nova tripsina (Hz15) a qual, nos ensaios enzimáticos, se mostrou insensível aos inibidores testados (Kunitz, Bowman Birk, inibidor de batata tipo II e inibidor de mostarda). Além disso, foi determinada a sequência de aminoácidos das enzimas sensíveis e insensíveis aos inibidores, através da massa dos peptídeos das diferentes isoformas de tripsina e verificaram a presença de cinco regiões que diferiam entre as isoformas e que sobrepujam com os resíduos de aminoácidos de contato entre enzima e inibidor (VOLPICELLA et al., 2003).

As estratégias adaptativas estão diretamente relacionadas à expressão dos genes que codificam as enzimas susceptíveis e não susceptíveis aos inibidores. Um estudo detectou a expressão diferencial nos genes de tripsina presentes nos intestinos de lagartas de *H. armigera* alimentadas com inibidores tipo Kunitz e Bowman-Birk. Através de análises semiquantitativas com *Northern blotting*, os pesquisadores observaram que, durante as oito primeiras horas de exposição, houve um aumento no nível das espécies de RNA

mensageiro estudadas. Este padrão se mantém depois de 72h de exposição e o nível dos RNAs correspondentes à tripsina sensível retorna ao mesmo nível que o controle. Paralelamente a isso, os ensaios enzimáticos de atividade da tripsina mostraram alteração na quantidade e característica desta proteinase no decorrer do tempo. A mudança nas proteinases condiz com as mudanças nas espécies de RNAm (BOWN; WILKINSON; GATEHOUSE, 2004).

A expressão gênica diferencial de lagartas de *S. frugiperda*, submetidas à dieta suplementada com inibidor de proteinase de soja, apresentou 38% dos genes expressos diferencialmente relacionados ao processo digestivo. Nesse estudo foram identificados dois grupos de proteinases diretamente envolvidos no processo de adaptação: um grupo preexistente e um grupo induzido. Ambos os grupos eram formados por tripsinas e quimotripsinas. Foi observado também que as lagartas de *S. frugiperda* adotam uma estratégia de aumento geral das proteinases intestinais, tanto as já presentes no intestino quanto as induzidas a partir do contato com o inibidor. Essa estratégia opõe-se a estratégia chamada de seletiva, em que somente as proteinases intestinais insensíveis aos inibidores seriam induzidas e mantidas em alto nível de expressão (BRIOSCHI, 2006).

Os mecanismos de defesa que os insetos possuem contra os metabólitos secundários produzidos pelas plantas são principalmente dois: o primeiro envolve a superexpressão da proteinase inibida, o que aumenta sua atividade frente ao inibidor; já no segundo, são sintetizadas várias isoenzimas e algumas não serão inibidas. Ambos os mecanismos de defesa causam prejuízo ao inseto pois retiram aminoácidos essenciais ao desenvolvimento para a síntese das enzimas digestivas, causando assim um déficit no crescimento. O ensaio *in vivo* é tão necessário quanto a detecção de inibição de tripsina *in vitro*, pois a interação planta-inseto é de natureza muito mais complexa, não podendo ser avaliada somente em condições de laboratório (BRIOSCHI et al., 2007; PAULILLO et al., 2000).

Os resultados obtidos por Ramos-Lopez et al. (2010) apresentaram efeitos negativos na duração larval, sobrevivência larval e pupal e peso pupal dos insetos tratados com o extrato metanólico de sementes de mamona. Houve aumento na duração larval assim como redução do peso de pupas e da sobrevivência larval e pupal na concentração de 1.600 ppm, e na concentração de 9.600 ppm nenhum inseto sobreviveu, resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho

Ramos-Lopez et al. (2010) compararam as CL50 dos extratos hexânico, metanólico, acetato de etila de folhas e sementes, além de ricinina e óleo de rícino purificados. Os extratos mais polares causaram maiores efeitos no desenvolvimento da lagarta-do-cartucho. Os autores concluíram que a redução no desenvolvimento desse inseto foi provocada pela ricinina (alcaloide) e o óleo de rícino. O efeito tóxico foi atribuído principalmente à ricinina, composto encontrado em maior quantidade nas sementes com características polares e com CL50 de 380 ppm (FERRAZ et al., 1999).

Em trabalhos estudando o efeito de extratos de folhas e sementes de mamona, o efeito prejudicial ao crescimento de *S. frugiperda* também foi observado, havendo diminuição principalmente no ganho de peso, aumento na concentração de proteína não digerida nas fezes, além de maior mortalidade nos tratamentos que nos controles (CARVALHO, 2009; RAMOS et al., 2013; ROSSI et al., 2012).

O efeito subletal do extrato de FFM somado ao aumento da concentração de proteínas solúveis nas fezes observados no presente trabalho são suportados pela literatura recente, por isso são fortes indícios que o inibidor de tripsina presente em folhas de mamona seja a ricinina.

## 6 CONCLUSÕES

Os parâmetros de extração otimizados por métodos quimiométricos aumentaram significativamente a atividade inibitória do extrato. Os compostos adenosina e ricinina foram purificados e identificados a partir do extrato de farinha de folhas de mamona. Após purificação, o pico contendo adenosina não apresentou atividade antitriptica, no entanto, ricinina inibiu a atividade de tripsina de *S. frugiperda*. O extrato de FFM afetou negativamente o desenvolvimento de *S. frugiperda* a partir de 900  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .





## **7 PERSPECTIVAS FUTURAS**

Este trabalho inicia uma linha de pesquisa promissora no controle de *S. frugiperda*. Novos estudos de toxicidade a outros organismos benéficos e ou pragas, aplicação em campo, estudos teóricos com análogos de ricinina, síntese de novos inibidores de tripsina baseados na estrutura da ricinina, avaliação econômica do uso de ricinina pura ou extrato de folhas de mamona, entre tantas outras possibilidades são algumas das questões a serem respondidas sobre esta área de estudo.



## REFERÊNCIAS

- ABOLLINO, O. et al. The role of chemometrics in single and sequential extraction assays: a review part I: extraction procedures, uni- and bivariate techniques and multivariate variable reduction techniques for pattern recognition. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 688, n. 2, p. 104-121, 2011.
- ACEVSKA, J. et al. Chemometric approach for development, optimization, and validation of different chromatographic methods for separation of opium alkaloids. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Berlin, v. 403, n. 4, p. 1117-1129, 2012.
- ALVES, D. S. **Prospecção de metabólitos de Anonáceas ativos para *Spodoptera frugiperda* e *Tetranychus* ssp.** 2014. 261 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- ALVES, D. S. et al. *Coffea racemosa* extract as an alternative for the control of coffee leaf miner. **Ciencia e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 2, p. 250-258, mar./abr. 2011.
- ALVES, D. S. et al. Selection of active plant extracts against the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 3, p. 352-362, 2013.
- AMOABENG, B. W. et al. Cost:benefit analysis of botanical insecticide use in cabbage: Implications for smallholder farmers in developing countries. **Crop Protection**, Kidlington, n. 57, p. 71-76, Mar. 2014.
- AMVRAZI, E. G.; TSIROPOULOS, N. G. Chemometric study and optimization of extraction parameters in single-drop microextraction for the determination of multiclass pesticide residues in grapes and apples by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, n. 45, p. 7630-7638, 2009.
- ARIMURA, G.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. **Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v. 1734, n. 2, p. 91-111, 2005.
- BALDWIN, I. T. Ecologically motivated analysis of plant herbivore interactions in native tobacco. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 127, n. 4, p. 1449-1458, 2001.

BARROS, E. M.; TORRES, J. B.; BUENO, A. F. Oviposição, desenvolvimento e reprodução de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em diferentes hospedeiros de importância econômica. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 39, n. 6, p. 996-1001, 2010.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2007. 480 p.

BECERRIL-BRAVO, E. et al. Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of fragrance allergens in water. **Chemosphere**, Kidlington, v. 81, n. 11, p. 1378-1385, 2010.

BIRKETT, M. A. et al. New roles for cisjasmone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 16, p. 9329-9334, 2000.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidoptera larval in response to dietary protease inhibitors. **Physiological Entomology**, Hoboken, v. 29, p. 278-290, 2004.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, n. 1/2, p. 248-254, 1976.

BRIOSCHI, D. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 37, n. 12, p. 1283-1290, 2007.

BRIOSCHI, D. **Identificação e caracterização de genes envolvidos na adaptação de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) aos inibidores de proteinase de soja**. 2006. 86 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2006.

BRITO, L. O. et al. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Kidlington, v. 128B, p. 365-375, 2001.

BROADWAY, R. M. et al. Dietary regulation of serine are resistant to serine proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 43, p. 855-874, 1997.

BROADWAY, R. M. et al. Plant proteinase inhibitors: a defense against herbivorous insects? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Hoboken, v. 41, p. 33-38, 1986.

BROADWAY, R. M.; VILLANI, M. G. Does host range influence susceptibility of herbivorous to non-host plant proteinase inhibitors? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Hoboken, v. 76, p. 303-312, 1995.

BULLANGPOTI, V. et al. Toxicity of ethyl acetate extract and ricinine from *Jatropha gossypifolia* senescent leaves against *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). **Journal of Pesticide Science**, Tokyo, v. 36, n. 2, p. 1-4, 2011.

CAMPISI, B. et al. Chemometric analysis and extraction processes of mandarine essential oils. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 312, n. 2, p. 199-255, 1995.

CAÑAS-HOYOS, N.; MÁRQUEZ, E. J.; SALDAMANDO-BENJUMEA, C. I. Heritability of wing size and shape of the rice and corn strains of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 45, n. 4, p. 411-419, Aug. 2016.

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

CARVALHO, G. **Extração e análises cromatográficas de um inibidor de tripsina presente em folhas de mamona e sua ação no desenvolvimento da lagarta-do-cartucho do milho**. 2009. 59 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CHRISTELLER, J. T. et al. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. **European Journal of Biochemistry**, Kidlington, v. 254, n. 1, p. 160-167, 1998.

CORREA FIGUEIREDO, M. de L. et al. Biological control with *Trichogramma pretiosum* increases organic maize productivity by 19.4%. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 35, n. 3, p. 1175-1183, 2015.

CORREA FIGUEIREDO, M. de L.; MARTINS-DIAS, A. M. P.; CRUZ, I. Relationship between fall armyworm and their natural biological control agents in the maize crop. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 41, n. 12, p. 1693-1698, dez. 2006.

COSTA FERREIRA, S. L. et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1158, n. 1/2, p. 2-14, 2007.

CRUZ, I. **Manual de identificação de pragas do milho e seus principais inimigos naturais**. Brasília, DF: EMBRAPA, 2008. 211 p.

DINESH, D. S. et al. The potentiality of botanicals and their products as an alternative to chemical insecticides to sandflies (Diptera: Psychodidae): a review. **Journal of Vector Borne Diseases**, Mumbai, v. 51, n. 1, p. 1-7, 2014.

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

FALCO, M. C. et al. Mechanisms of Sugarcane response to herbivory. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1/4, p. 113-122, 2001.

FENG, W.; ZHANG, S. A trypsin homolog in amphioxus: expression, enzymatic activity and evolution. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 1745-1753, 2012.

FERRAZ, A. C. et al. Pharmacological evaluation of ricinine, a central nervous system stimulant isolated from *Ricinus communis*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Kidlington, v. 63, n. 3, p. 367-375, 1999.

FLORES-MACÍAS, A. et al. Effect of potassium nitrate on the production of ricinine by *Ricinus communis* and its insecticidal activity against *Spodoptera frugiperda*. **Revista Fitotecnia Mexicana**, Chapingo, v. 39, n. 1, p. 41-47, 2016.

FORDYCE, J. A.; AGRAWAL, A. A. The role of plant trichomes and caterpillar group size on growth and defense of the pipevine swallowtail *Battus philenor*. **Journal of Animal Ecology**, Hoboken, v. 70, n. 6, p. 997-1005, 2001.

FREITAS, A. F. et al. Effects of methanolic extracts of annona species on the development and reproduction of *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 43, n. 5, p. 446-452, 2014.

GALLO, D. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p.

GANDREDDI, S. et al. Evaluating the role of a trypsin inhibitor from soap nut (*Sapindus trifoliatus* L. Var. Emarginatus) seeds against larval gut proteases, its purification and characterization. **BMC Biochemistry**, London, v. 16, n. 1, p. 1-16, Dec. 2015.

GATEHOUSE, J. A. Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. **Current Protein & Peptide Science**, Sharjah, v. 12, n. 5, p. 409-416, 2011.

GIACOMINO, A. et al. The role of chemometrics in single and sequential extraction assays: a review, part II: cluster analysis, multiple linear regression, mixture resolution, experimental design and other techniques. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 688, n. 2, p. 122-139, 2011.

GIRARD, C. et al. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 28, n. 4, p. 229-237, 1998.

GUILLEN-CASLA, V. et al. Determination of serotonin and its precursors in chocolate samples by capillary liquid chromatography with mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1232, p. 158-165, 2012.

GUO, P. et al. Chronic toxicity of crude ricinine in rats assessed by <sup>1</sup>H NMR metabolomics analysis. **RSC Advances**, Milton, v. 5, n. 34, p. 27018-27028, 2015.

HARUTA, M. et al. Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 1, n. 2, p. 181-191, 1995.

HIVRALE, V. K. et al. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors from *Albizia lebeck* seeds in the *Helicoverpa armigera* larvae. **Arthropod-Plant Interactions**, Dordrecht, v. 7, n. 3, p. 259-266, 2013.



INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.

**Levantamento sistemático da produção agrícola.** Rio de Janeiro, 2016. 113 p.

JEONG, J. Y. et al. Optimization of pancreatic lipase inhibition by *Cudrania tricuspidata* fruits using response surface methodology. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Kidlington, v. 24, n. 10, p. 2329-2333, 2014.

JONGSMA, M. A.; BEEKWILDER, J. Co-evolution of insect proteases and plant protease inhibitors. **Current Protein & Peptide Science**, Sharjah, v. 12, n. 5, p. 437-447, 2011.

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

JONGSMA, M. A. et al. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of proteinase activity insensitive of inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, p. 8041-8045, 1995.

KASTEN JUNIOR, P.; PRECETTI, A. A. C. M.; PARRA, J. R. P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 53, n. 1, p. 68-78, 1978.

KHAN, B. et al. Evaluation of Anti-Acetylcholinesterase activity and antioxidant potential of Ricinine (a Central Nervous System Stimulant) isolated from *Ricinius communis* L. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, Karachi, v. 38, n. 2, p. 326-326, 2016.

KIRBASLAR, S. I.; BOZ, I.; KIRBASLAR, F. G. Composition of Turkish lemon and grapefruit peel oils. **Journal of Essential Oil Research**, Philadelphia, v. 18, n. 5, p. 525-543, 2006.

KLIEBENSTEIN, D. J. et al. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis glucosinolate* accumulation. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 126, n. 2, p. 8811-8825, 2001.

KLOMKLAO, S. et al. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). **Food Chemistry**, London, v. 129, n. 4, p. 1348-1354, 2011.

KUWAR, S. S. et al. Adaptive regulation of digestive serine proteases in the larval midgut of *Helicoverpa armigera* in response to a plant protease inhibitor. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 98, n. 4, p. 1238-1240, 2015.

LARA, P. et al. Adaptation of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to barley trypsin inhibitor BTI-CMe expressed in transgenic tobacco. **Trangenic Research**, Dordrecht, v. 9, p. 169-178, 2000.

LEITE, A. C. et al. Isolation of the alkaloid ricinine from the leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) through counter-current chromatography. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 983-985, 2005.

LI, W. L.; YU, L.; JI, Y. B. Chemical constituents of n-butanol extract of *Capparis spinosa* L. **Asian Journal of Chemistry**, Ghaziabad, v. 26, n. 11, p. 3435-3437, 2014.

LIMA, B. M. F. V.; MOREIRA, J. O. T.; ARAGÃO, C. A. Avaliação de extratos vegetais no controle de mosca-branca, *Bemisia tabaci* biótipo B em abóbora. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 44, n. 3, p. 622-627, set. 2013.

LIN, S. J. et al. Structures of neutrophil serine protease 4 reveal an unusual mechanism of substrate recognition by a trypsin-fold protease. **Structure**, Cambridge, v. 22, n. 9, p. 1333-1340, 2014.

LOPES, A. R. et al. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, Hoboken, v. 55, n. 3, p. 140-152, 2004.

MACHADO, O. L. T. et al. Characterization of of allergenic 2S albumin isoforms from *Ricinus communis* seeds. **Allergologie**, Deisenhofen-Muechen, v. 26, n. 2, p. 45-51, 2003.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S.; BROADWAY, R. M. Identification of six chymotrypsin cDNAs from larval midguts of *Helicoverpa zea* and *Agrotis ipsilon* feeding on the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 31, n. 6/7, p. 633-644, 2001a.

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**, Kidlington, v. 31, n. 6/7, p. 645-657, 2001b.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 71-78, 2002.

MELO, W. C. et al. Acid and enzymatic hydrolysis of the residue from Castor Bean (*Ricinus communis* L.) oil extraction for ethanol production: detoxification and biodiesel process integration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 19, n. 3, p. 418-425, 2008a.

MELO, W. C. et al. Ethanol production from castor bean cake (*Ricinus communis* L.) and evaluation of the lethality of the cake for mice. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1104-1106, 2008b.

MONNERAT, R. et al. Evidence of field-evolved resistance of *Spodoptera frugiperda* to Bt corn expressing Cry1F in Brazil that is still sensitive to modified Bt toxins. **PLOS One**, San Francisco, v. 10, n. 4, p. 1-12, 2015.

MOON, J. et al. Transcriptional regulation in cowpea brushed guts during adaptation to a plant defense protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, Hoboken, v. 13, n. 3, p. 283-297, 2004.

MOSOLOV, V. V.; VALUEVA, T. A. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 41, n. 3, p. 227-246, 2005.

MOSOLOV, V. V.; VALUEVA, T. A. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 44, n. 3, p. 233-240, 2008.

NEVES, A. C. D. O.; BERNARDO, C. T.; SANTOS, F. A. M. dos. Co-existence of ants and termites in *Cecropia pachystachya* Trécul (Urticaceae). **Sociobiology**, Feira de Santana, v. 61, n. 1, p. 88-94, 2014.

NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by lepidoptera. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 47, p. 57-92, 2002.

NUNES, C. A. **Abordagem quimiométrica da oxidação de glicerol sobre nanopartículas de ouro suportadas em carvão ativado**. 2011. 103 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, Nov. 2012.

NUNES, C. A.; GUERREIRO, M. C. Chemometric approaches on glycerol oxidation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> over supported gold nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, Amsterdam, v. 370, p. 145-151, Apr. 2013.

OLIVA, M. L. V. et al. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. **Biochimie**, Paris, v. 92, n. 11, p. 1667-1673, 2010.

OMOTO, C. et al. Field-evolved resistance to Cry1Ab maize by *Spodoptera frugiperda* in Brazil. **Pest Management Science**, Hoboken, v. 72, n. 9, p. 1727-1736, 2016.

ONG, E. S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v. 812, n. 1/2, p. 23-33, 2004.

ONG, E. S.; CHEONG, J. S. H.; GOH, D. Pressurized hot water extraction of bioactive or marker compounds in botanicals and medicinal plant materials. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1112, n. 1/2, p. 92-102, 2006.

ONG, E. S.; LEN, S. M. Evaluation of surfactant-assisted pressurized hot water extraction for marker compounds in *Radix Codonopsis pilosula* using liquid chromatography and liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 26, n. 17, p. 1533-1540, 2003.

PANDA, N.; KHUSH, G. S. **Host plant resistance to insects**. Wallingford: CAB International; International Rice Research Institute, 1995. 431 p.

PATANKAR, A. G. et al. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Kidlington, v. 31, n. 4/5, p. 453-464, 2001.

PAULILLO, L. et al. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, Cary, v. 93, n. 3, p. 892-896, 2000.

PENG, J. et al. A metabonomic analysis of serum from rats treated with ricinine using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **PloS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. 1-11, 2014.

POGUE, M. G. A world revision of the genus *Spodotera guenée* (Lepidoptera: Nocuidae). **Memoirs of the American Entomological Society**, Philadelphia, v. 43, n. 28, p. 212, 2002.

POMPERMAYER, P. et al. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Hoboken, v. 99, n. 1, p. 79-85, 2001.

PUTTARAJ, S. et al. Effect of detoxification of castor seed (*Ricinus-Communis*) protein isolate on its nutritional quality. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 46, n. 1, p. 63-70, 1994.

R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2015. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

RAKWAL, R.; AGRAWAL, G. K.; JWA, N. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. **Gene**, Amsterdam, v. 236, n. 1/2, p. 189-198, 2001.

RAMOS, L.; WILHELM, H. Current status of biodiesel development in Brazil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Totowa, v. 123, n. 1, p. 807-819, 2005.

RAMOS, V. et al. Extraction and isolation of anti-tryptic castor-bean (*Ricinus communis* L.) substances and their effects on *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Chilean Journal of Agricultural Research**, Chillan, v. 73, n. 2, p. 128-134, 2013.

RAMOS-LOPEZ, M. A. et al. Activity of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 9, n. 9, p. 1359-1365, 2010.

RODRIGUEZ-SAONA, C.; THALER, J. S. The jasmonate pathway alters herbivore feeding behaviour: consequences for plant defences. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Hoboken, v. 115, n. 1, p. 125-134, 2005.

ROSSI, G. D. et al. Biochemical analysis of a castor bean leaf extract and its insecticidal effects against *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 41, n. 6, p. 503-509, 2012.

ROSSI, G. D. et al. Coffee leaf miner trypsin inhibition with castor bean leaf extracts mediated by a non-protein agent. **Ciencia e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 361-366, mar./abr. 2010.

ROY, I.; GUPTA, M. Purification of a “double-headed” inhibitor of alpha-amylase/proteinase K from wheat germ by expanded bed chromatography. **Bioseparation**, Dordrecht, v. 9, n. 4, p. 239-245, 2000.

RYAN, C. A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopatology**, Palo Alto, v. 28, p. 425-449, 1990.

RYAN, C. A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. **Annual Reviews Plant Physiology**, Palo Alto, v. 24, p. 173-196, 1973.

SAURINA, J. Characterization of wines using compositional profiles and chemometrics. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Kidlington, v. 29, n. 3, p. 234-245, 2010.

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

SEIDEL, V. Initial and bulk extraction of natural products isolation. In: SARKER, S. D.; NAHAR, L. (Ed.). **Natural products isolation**. New York: Springer Science, 2012. p. 27-41. (Methods in Molecular Biology, 864).

SILVA, C. P. et al. Induction of digestive  $\alpha$ -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: bruchidae) in response to ingestion of common bean  $\alpha$ -amylase inhibitor 1. **Journal of Insect Physiology**, Kidlington, v. 47, n. 11, p. 1283-1290, 2001.

SILVA, R. G. G. et al. Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larvae. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 70, p. 48-55, Aug. 2015.

SOUZA, T. P. et al. Comparative analysis of expression profiling of the trypsin and chymotrypsin genes from Lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, New York, v. 196, p. 67-73, June/July 2016.

STORER, N. P. et al. Discovery and characterization of field resistance to Bt maize: *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) in Puerto Rico. **Journal of Economic Entomology**, Cary, v. 103, n. 4, p. 1031-1038, Aug. 2010.

TABASHNIK, B. E.; RENSBURG, J. B. J. van; CARRIÈRE, Y. Field-evolved insect resistance to Bt crops: definition, theory, and data. **Journal of Economic Entomology**, Cary, v. 102, n. 6, p. 2011-25, Dec. 2009.

TAVARES, W. D. et al. Potential use of Asteraceae extracts to control *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and selectivity to their parasitoids *Trichogramma pretiosum* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Telenomus remus* (Hymenoptera: Scelionidae). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 384-388, 2009.

TEOFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Chemometrics II: spreadsheets for experimental design calculations, a tutorial. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TIFFIN, P.; GAUT, B. Molecular evolution of the wound-induced serine proteinase inhibitor wip1 in zea and related genera. **Molecular Biological Evolution**, Lawrence, v. 18, n. 11, p. 2092-2101, 2001.

TIRELLI, A. A. et al. Effect of tanical fractions on biological and nutritional parameters of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 6, p. 1417-1424, nov./dez. 2010.

TRAN, P.; CHEESBROUGH, T. M.; KEICKHEFER, R. Plant proteinase inhibitors are potential anticereal aphid compounds. **Journal of Economic Entomology**, Cary, v. 90, p. 1672-1677, 1997.

UNIVERSITY OF FLORIDA. **Featured creatures:** entomology & amp. nematology. Disponível em:  
<[http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall\\_armyworm.htm](http://entnemdept.ufl.edu/creatures/field/fall_armyworm.htm)>. Acesso em: 9 jul. 2016.

VIRLA, E. G. et al. Fall Armyworm Strains (Lepidoptera: Noctuidae) in Argentina, their associate host plants and response to different mortality factors in laboratory. **Florida Entomologist**, Lutz, v. 91, n. 1, p. 63-69, 2008.

VOLPICELLA, M. et al. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v. 270, n. 1, p. 10-19, Jan. 2003.

WOLD, S. Chemometrics: what do we mean with it, and what do we want from it? **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam, v. 30, p. 109-115, , 1995.

YALAVARTHI, C.; THIRUVENGADARAJAN, V. S. A review on identification strategy of phyto constituents present in herbal plants. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, Madurai, v. 4, n. 2, p. 123-140, 2013.

YU, S. J. Insensitivity of acetylcholinesterase in a field strain of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 84, n. 2, p. 135-142, 2006.

YU, S. J.; MCCORD, E. Lack of cross-resistance to indoxacarb in insecticide-resistant *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). **Pest Management Science**, Hoboken, v. 63, n. 1, p. 63-67, 2007.

ZANGERL, A. Furanocoumarin induction in wild parsnip: evidence for an induced defense against herbivores. **Ecology**, Durham, v. 71, n. 5, p. 1926-1932, 1990.

ZHANG, H.; AL, E. Multivariate approach to the Fenton process for the treatment of landfill leachate. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 161, n. 2/3, p. 1312, Jan. 2009.

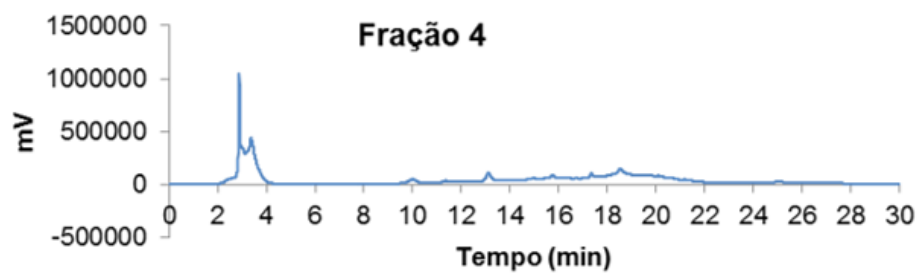
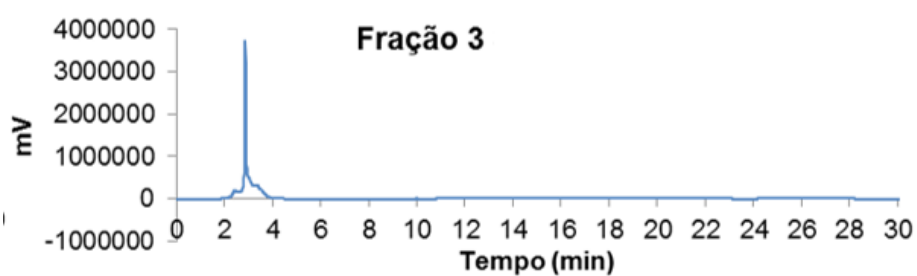
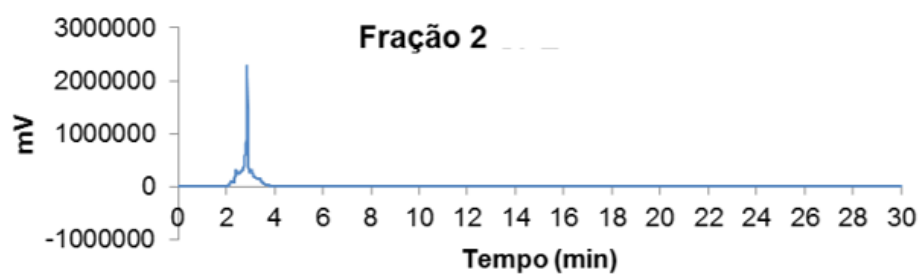
ZHAO, H. Q. et al. Characterization of nucleosides and nucleobases in natural Cordyceps by HILIC-ESI/TOF/MS and HILIC-ESI/MS. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 8, p. 9755-9769, 2013.

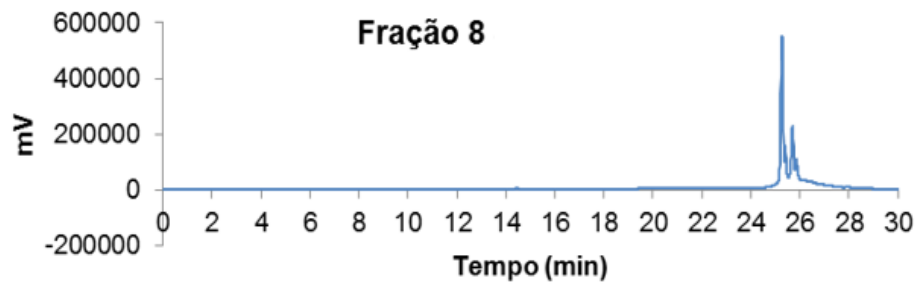
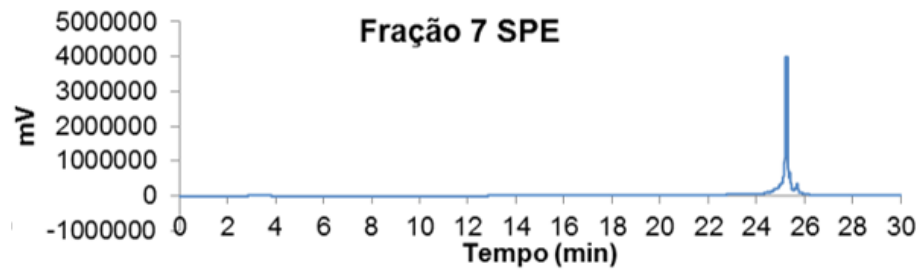
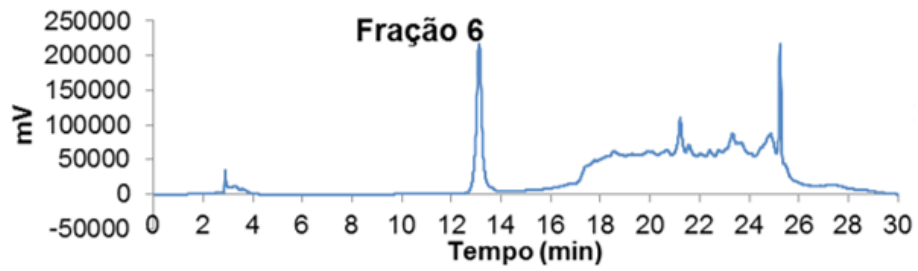
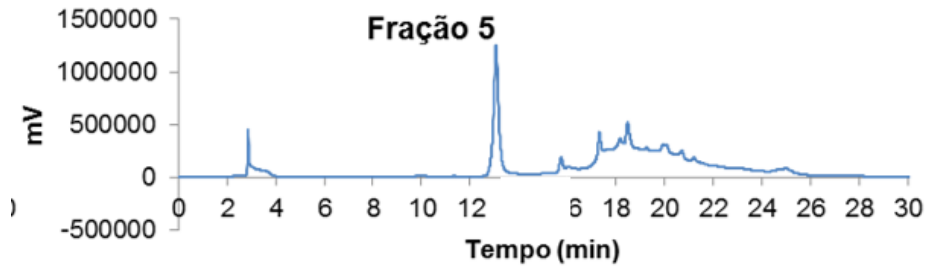
ZHU, F.; POELMAN, E. H.; DICKE, M. Insect herbivore-associated organisms affect plant responses to herbivory. **New Phytologist**, Hoboken, v. 204, n. 2, p. 315-321, 2014.



ZHU, Y. C. et al. Evidence of multiple/cross resistance to Bt and organophosphate insecticides in Puerto Rico population of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 122, p. 15-21, July 2015.

**ANEXO A – CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR  
MEIO DE CROMATOGRAFIA FLASH**





## ANEXO B – SUPERFÍCIES DE RESPOSTA DA EXTRAÇÃO UTILIZANDO FAT $2^4$

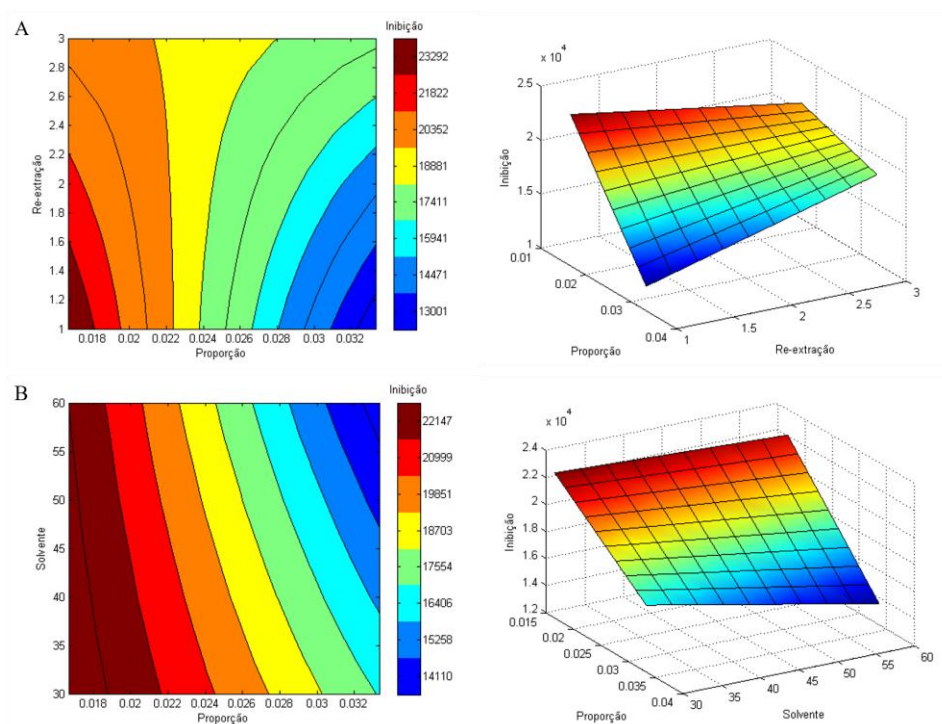


Figura 1 – Gráficos de superfície de contorno (2D) e superfície de resposta (3D) do planejamento fatorial  $2^4$  da extração dos inibidores de tripsina de mamona. A – Proporção x Re-extração; B – Proporção x Solvente; C – Proporção x Tempo; D – Solvente x Re-extração; E – Solvente x Tempo; F – Re-extração x Tempo

(continua)

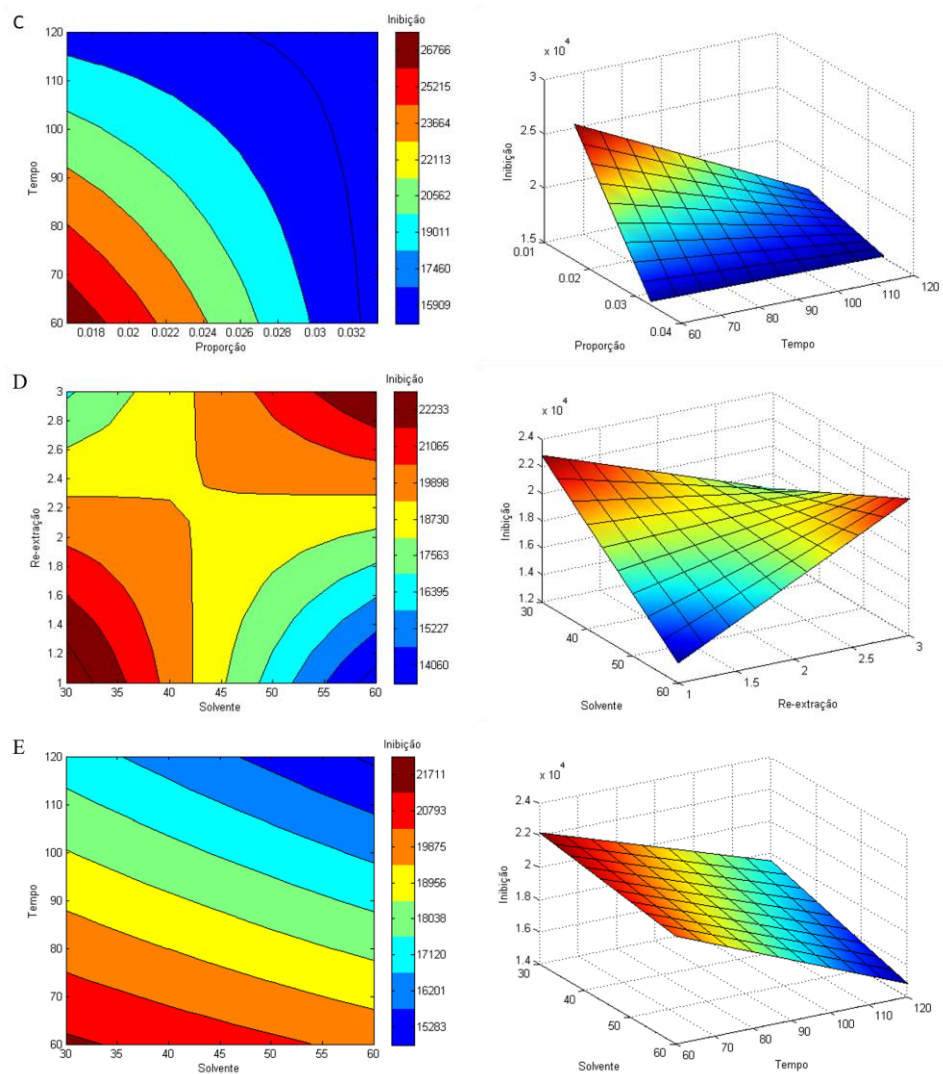


Figura 1 – Gráficos de superfície de contorno (2D) e superfície de resposta (3D) do planejamento fatorial  $2^4$  da extração dos inibidores de tripsina de mamona. A – Proporção x Re-extração; B – Proporção x Solvente; C – Proporção x Tempo; D – Solvente x Re-extração; E – Solvente x Tempo; F – Re-extração x Tempo

(continuação)

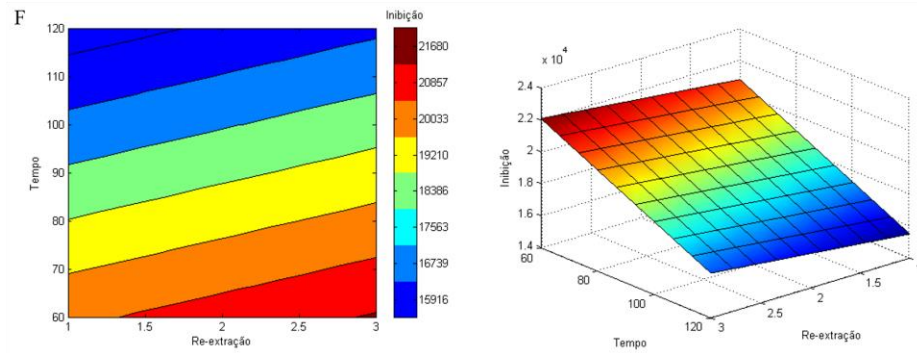


Figura 1 – Gráficos de superfície de contorno (2D) e superfície de resposta (3D) do planejamento fatorial  $2^4$  da extração dos inibidores de tripsina de mamona. A – Proporção x Re-extração; B – Proporção x Solvente; C – Proporção x Tempo; D – Solvente x Re-extração; E – Solvente x Tempo; F – Re-extração x Tempo

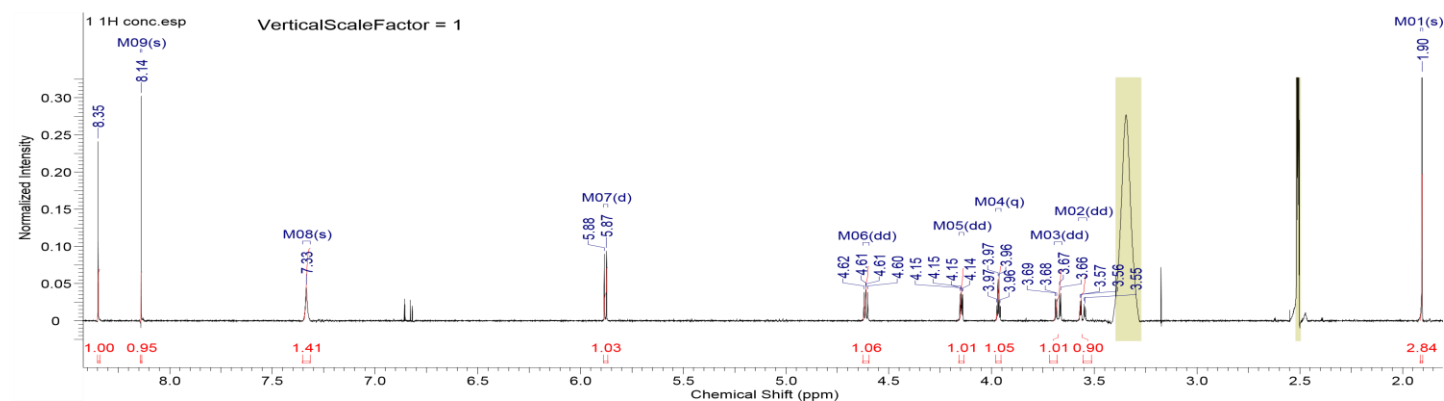
(conclusão)

## ANEXO C - ESPECTROS DE RMN DE HIDROGÊNIO, COSY, HMBC E HSQC E ESPECTRO DE MASSAS DO COMPOSTO ADENOSINA

### Hidrogênio

<i>Acquisition Time (sec)</i>	4.9982	<i>Comment</i>	Vinicius P1 1H 04/10/2013		<i>Date</i>	04 Oct 2013 08:24:48
<i>Date Stamp</i>	04 Oct 2013 08:24:48					
<i>File Name</i>	C:\Users\Vinicius\Documents\Doutorado\Dados e estatística\RMN\P1\Vinicius P1\Vinicius P1\1 1H conc\fid				<i>Frequency (MHz)</i>	600.13
<i>Nucleus</i>	1H	<i>Number of Transients</i>	16	<i>Origin</i>	spc	<i>Original Points Count</i> 32768
<i>Owner</i>	nmsu	<i>Points Count</i>	32768	<i>Pulse Sequence</i>	zgpg	<i>Receiver Gain</i> 90.50
<i>SW(cyclical) (Hz)</i>	6555.94	<i>Solvent</i>	DMSO-d6	<i>Spectrum Offset (Hz)</i>	26	<i>Spectrum Type</i> STANDARD
<i>Sweep Width (Hz)</i>	6555.74	<i>Temperature (degree C)</i>	26.152			

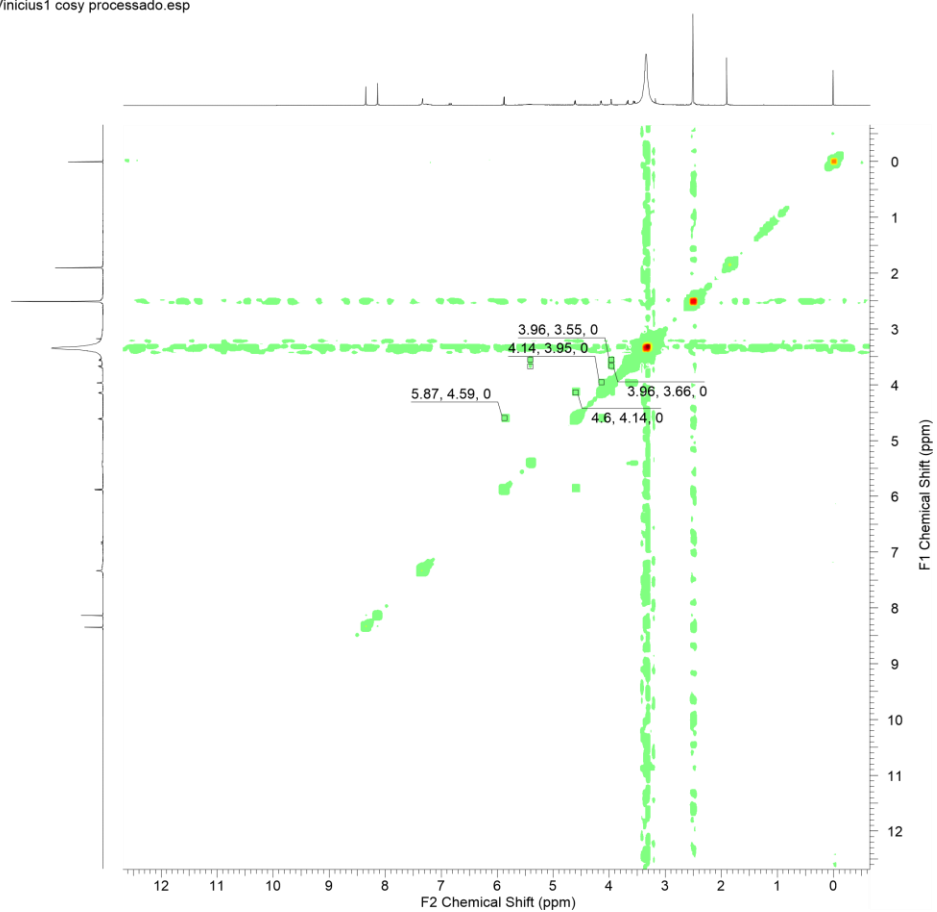
1H NMR (600 MHz, DMSO-D6)  $\delta$  ppm 1.90 (s, 3 H) 3.56 (dd,  $J=12.10, 3.50$  Hz, 1 H) 3.68 (dd,  $J=12.10, 3.50$  Hz, 1 H) 3.97 (q,  $J=3.47$  Hz, 1 H) 4.15 (dd,  $J=5.00, 3.20$  Hz, 1 H) 4.61 (dd,  $J=6.20, 5.00$  Hz, 1 H) 5.88 (d,  $J=6.20$  Hz, 1 H) 7.33 (s largo) 8.14 (s, 1 H) 8.35 (s, 1 H)



### Cosy

No.	F2 (ppm)	F1 (ppm)	F2 Range (ppm)	F1 Range (ppm)
1	3.96	3.66	3.961	3.664
2	3.96	3.55	3.961	3.548
3	4.14	3.95	4.140	3.955
4	4.60	4.14	4.604	4.137
5	5.41	3.55	5.409	3.548
6	5.41	3.67	5.409	3.672
7	5.87	4.59	5.873	4.594

Vinicius1 cosy processado.esp

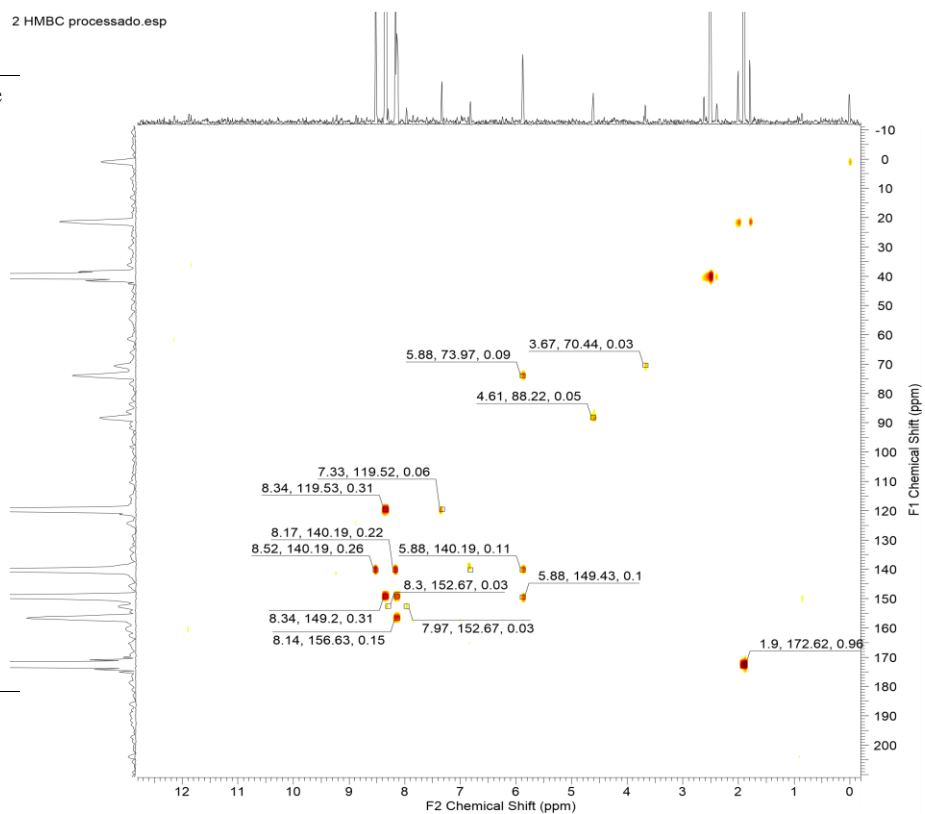




### HMBC

No.	F2 (ppm)	F1 (ppm)	F2 Range (ppm)	F1 Range (ppm)
1	1.90	172.62	1.903	172.608
2	3.67	70.44	3.674	70.443
3	4.61	88.22	4.609	88.227
4	5.88	140.19	5.879	140.189
5	5.88	73.97	5.879	73.961
6	5.88	149.43	5.879	149.417
7	6.82	140.19	6.819	140.189
8	7.33	119.52	7.333	119.517
9	7.97	152.67	7.968	152.675
10	8.14	149.21	8.142	149.200
11	8.14	156.63	8.143	156.627
12	8.17	140.19	8.168	140.189
13	8.30	152.67	8.299	152.675
14	8.34	119.53	8.344	119.517
15	8.34	149.20	8.344	149.200
16	8.52	140.19	8.521	140.189

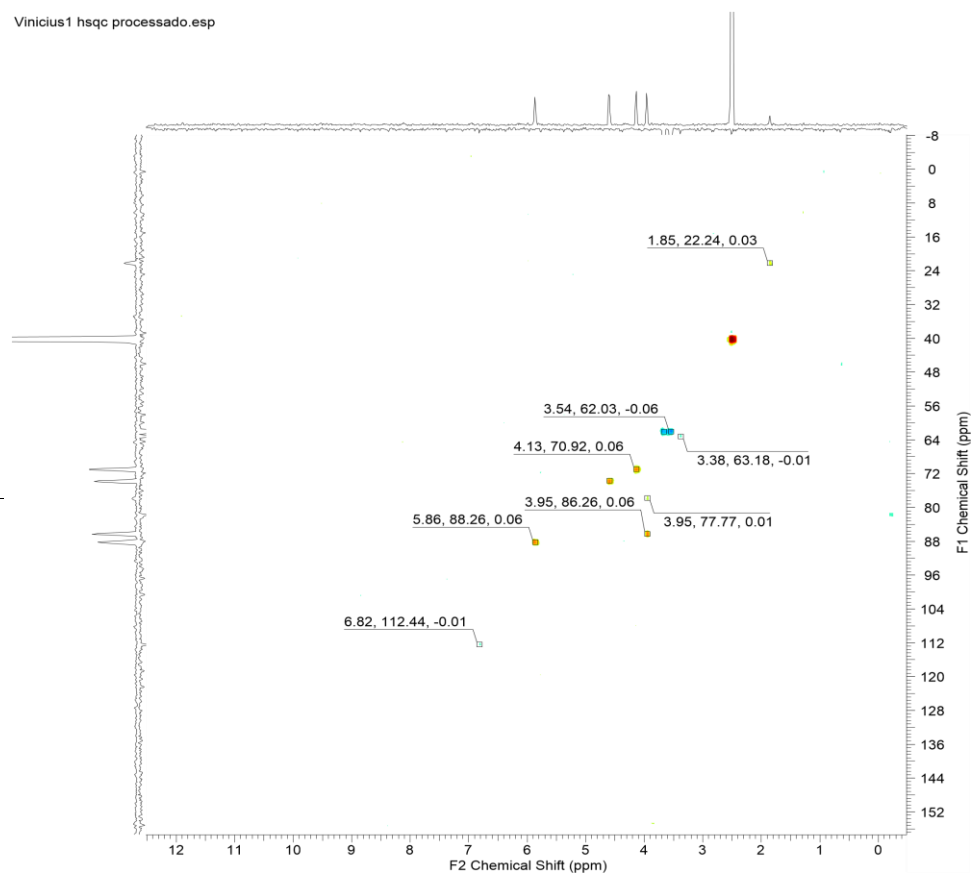
2 HMBC processado.esp



## HSQC

No.	F2 (ppm)	F1 (ppm)	F2 Range (ppm)	F1 Range (ppm)
1	1.85	22.24	1.849 - 22.238	
2	3.38	63.18	3.378 - 63.183	
3	3.54	62.03	3.542 - 62.034	
4	3.66	62.04	3.663 - 62.034	
5	3.95	86.26	3.950 - 86.252	
6	3.95	77.77	3.950 - 77.759	
7	4.13	70.92	4.132 - 70.916	
8	4.59	73.69	4.592 - 73.698	
9	5.86	88.26	5.862 - 88.258	
10	6.82	112.44	6.818 - 112.443	

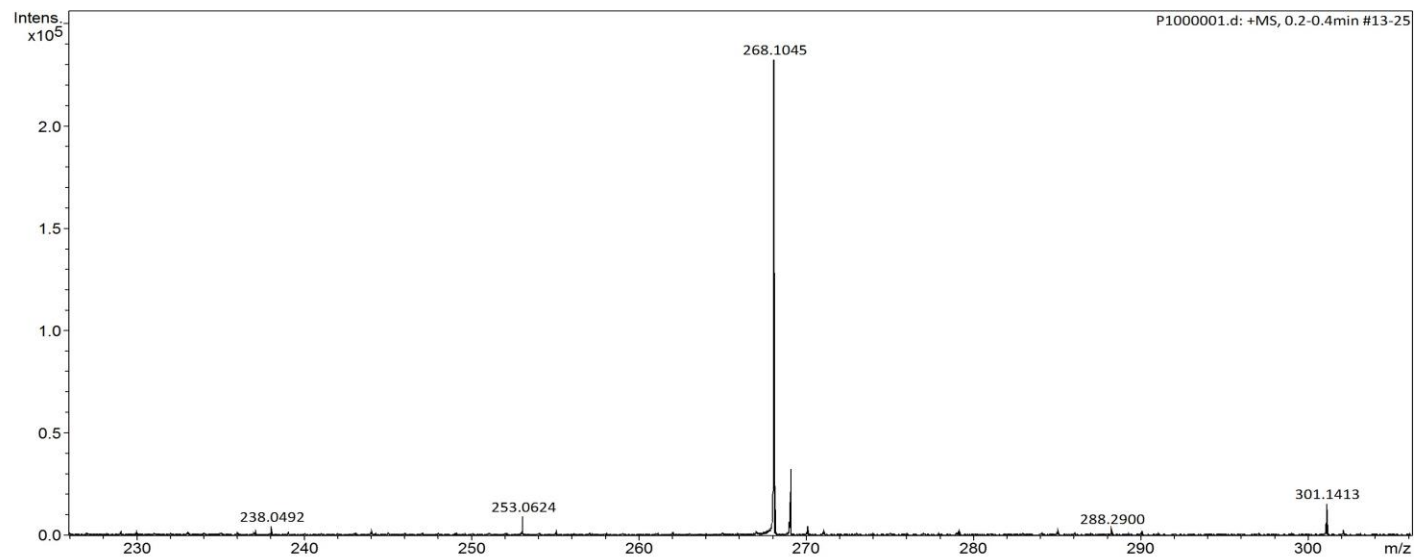
Vinicius1 hsqc processado.esp



## Espectro de massas

106

<b>Analysis Info</b>		Acquisition Dat	4/17/2015 3:3	1:31 PM	
Analysis Name	D:\Data\Analises\2015\Analises Abril\P1000001.d	Operator	BDAL@DE	282001.00121	
Method	Tune_pos_Standard.m	Instrument	maXis impact		
Sample Name	P1				
Comment	Amostra Vinicius-UFLA				
<b>Acquisition Parameter</b>		Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.3 Bar
Source Type	ESI	Set Capillary	2900 V	Set Dry Heater	180°C
Focus	Active	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan Begin	50 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Divert Valve	Source
Scan End	1500 m/z	Set Corona	0 nA	Set APCI Heater	0°C



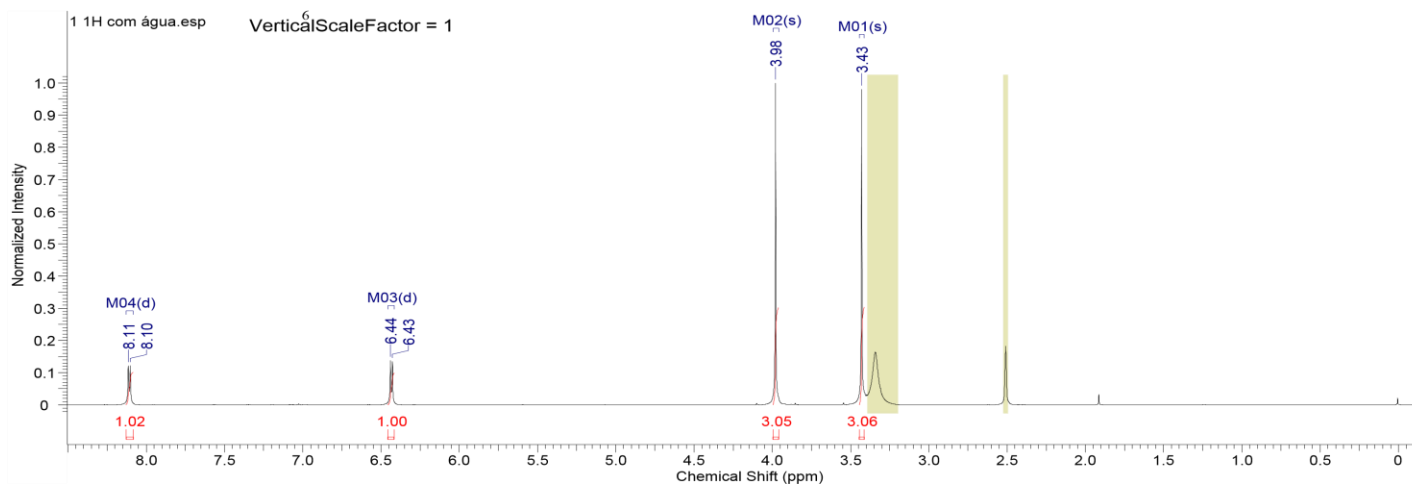
**ANEXO D - ESPECTROS DE RMN DE HIDROGÊNIO, CARBONO E ESPECTRO DE MASSAS DO  
COMPOSTO RICININA**

108

**Hidrogênio**

<i>Acquisition Time (sec)</i>	2.7263	<i>Comment</i>	Vinicius 2 30/09/2013 - manual		<i>Date</i>	30 Sep 2013 14:08:16		
<i>Date Stamp</i>	30 Sep 2013 14:08:16							
<i>File Name</i>	C:\Users\Vinicius\Documents\Doutorado\Dados e estatística\RMN\Vinicius 2a\1 1H com água\fid				<i>Frequency (MHz)</i>	600.13		
<i>Nucleus</i>	1H	<i>Number of Transients</i>	16	<i>Origin</i>	spect	<i>Original Points Count</i>	32768	
<i>Owner</i>	nMrsu	<i>Points Count</i>	3276	<i>Pulse Sequence</i>	zg30	<i>Receiver Gain</i>	80.60	
<i>SW(cyclical) (Hz)</i>	12019.23	<i>Solvent</i>	DMSS		<i>Spectrum Offset (Hz)</i>	3706.0515	<i>Spectrum Type</i>	STANDARD
<i>Sweep Width (Hz)</i>	12018.86	<i>Temperature (degree C)</i>	26.14					

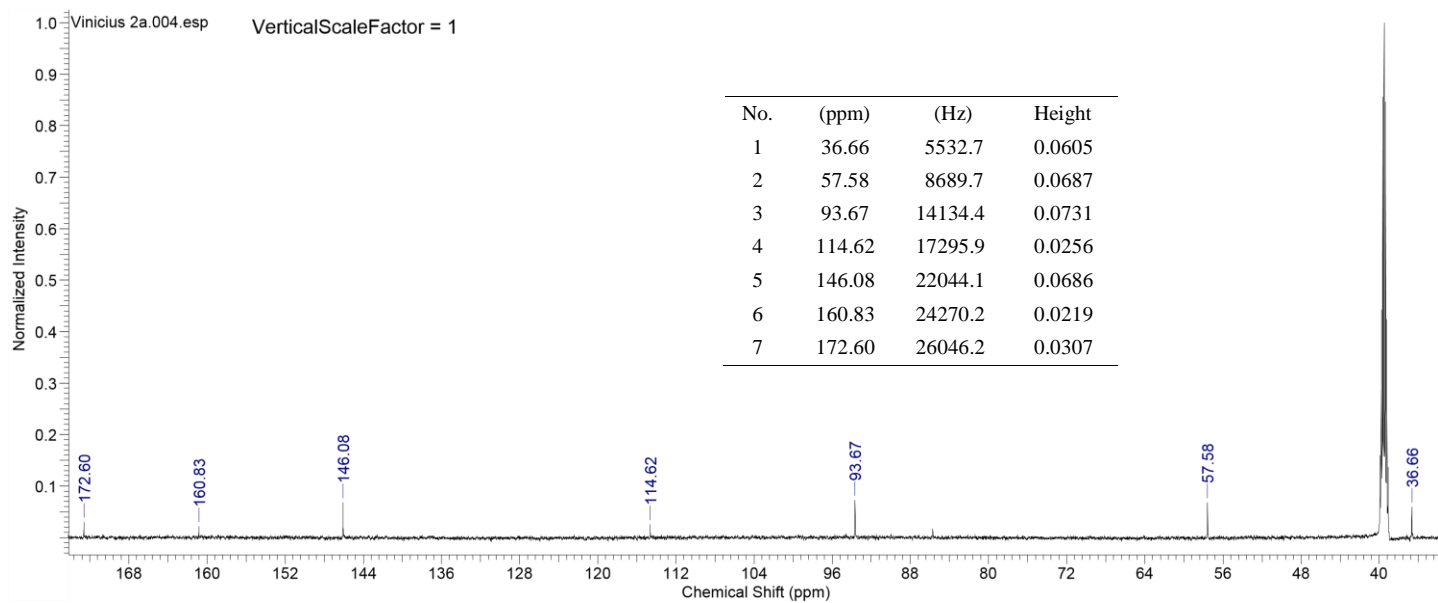
1H NMR (600 MHz, DMSO-*d*) δ ppm 3.43 (s, 3 H) 3.98 (s, 3 H) 6.43 (d, *J*=7.70 Hz, 1 H) 8.11 (d, *J*=7.70 Hz, 1 H)



## Carbono

<b>Acquisition Time (sec)</b>	0.9088	<b>Comment</b>	Vinicius 2 13C 02/10/2013		<b>Date</b>	02 Oct 2013	
<b>Date Stamp</b>	02 Oct 2013 08:29:04	<b>File Name</b>	C:\Users\Vinicius\Documents\Doutorado\Dados e estatística\RMN\Vinicius 2a4 13C\fid				
<b>Frequency (MHz)</b>	150.90	<b>Nucleus</b>	13C	<b>Number of Transients</b>	154	<b>Origin</b>	spect
<b>Original Points Count</b>	32768	<b>Owner</b>	nmrsu	<b>Points Count</b>	32768	<b>Pulse Sequence</b>	zgpg30
<b>Receiver Gain</b>	71.80	<b>SW (cyclical) (Hz)</b>	36057.69	<b>Solvent</b>	DMSO-d6	<b>Spectrum Offset (Hz)</b>	15015.2930
<b>Spectrum Type</b>	STANDARD	<b>Sweep Width (Hz)</b>	36056.59	<b>Temperature (°C)</b>	26.402		

<sup>13</sup>C NMR (150 MHz DMSO-*d*<sub>6</sub>) 36,66; 57,58; 93,67; 114,62; 146,08; 160,83; 172,60



## Espectro de massas

Analysis Info		Acquisition E		4/17/2015 2:45:21 PM	
Analysis Name	D:\Data\Analises\2015\Analises Abril\P2000001.d	Operator	BDAL@DE		
Method	Tune_pos_Standard.m	Instrument	maXis impact	282001.00121	
Sample Name	P2				
Comment	Amostra Vinicius-UFLA				
Acquisition Parameter		Ion Polarity		Positive	
Source Type	ESI	Set Capillary	2900 V	Set Nebulizer	0.3 Bar
Focus	Active	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Heater	180°C
Scan Begin	50 m/z	Set Charging Voltage	2000 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1500 m/z	Set Corona	0 nA	Set Divert Valve	Source
				Set APCI Heater	0°C

