

**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**

GISLAINE APARECIDA CARVALHO

2009

GISLAINE APARECIDA CARVALHO

**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**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agroquímica, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador
Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2009

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Carvalho, Gislaine Aparecida.

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 / Gislaine Aparecida Carvalho. – Lavras : UFLA, 2009.

59 p. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2009.

Orientador: Custódio Donizete dos Santos.

Bibliografia.

1. *Spodoptera frugiperda*. 2. *Ricinus communis* L. 3. Tripsina. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 581.4
– 631.8

GISLAINE APARECIDA CARVALHO

**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**

Dissertação apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do Curso de
Mestrado em Agroquímica, para obtenção do
título de “Mestre”.

APROVADA em 17 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. Geraldo Andrade Carvalho UFLA

Prof. Dr. Matheus Puggina de Freitas UFLA

Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos
UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me ter feito conhecer o seu amor, pelas grandes oportunidades a mim concedidas e por sua infalível providência.

Ao professor Dr. Custódio Donizete dos Santos, pela sua orientação desde a iniciação científica até o presente trabalho, por sua amizade e paciência e, principalmente, por acreditar em minha capacidade.

Ao Departamento de Química e ao Laboratório de Bioquímica da UFLA.

À professora Maria das Graças Cardoso, pela sua co-orientação e disposição em colaborar com este trabalho.

As professoras Angelita Duarte Corrêa e Celeste Maria Patto de Abreu, pelos conselhos sempre pertinentes e pela amizade;

Aos professores Mário César Guerreiro e Adelir Aparecida Saczk pela colaboração nas análises de HPLC.

Ao professor Geraldo Andrade Carvalho por me ceder os insetos e orientar nas análises “in vivo” no Laboratório de Seletividade do Departamento de Entomologia.

À Tia Miriam, pela valiosa ajuda, amizade e pelo incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

A minha grande amiga Luciana de Paula Naves por todos os momentos que lutamos juntas, superando cada obstáculo e, principalmente, por nossa amizade.

Aos amigos conquistados durante a pós-graduação: Rafaella, Ana Paula, Letícia, Luciana, Maria Cristina, Ellen, Anette, Guilherme, Stefânia, Juliana, Priscila, Pollyana, Estela, Cristian, Simone, Abel, José Renato, pelos momentos compartilhados.

À técnica do Laboratório de Bioquímica, Xulita, pela disponibilidade e boa vontade.

À DeJane, Dona Irene, Rafaela, Aline e Paulize pela disposição e ajuda nos trabalhos.

Aos meus pais, Edson e Terezinha pela formação que me deram, pelo amor, dedicação, incentivo e por todo tipo de apoio que me foi fornecido; ao meu noivo, Henrique pelo apoio, paciência e extrema compreensão que me devotou durante esse período e ao meu irmão Felipe sempre prestativo e confiante;

Aos meus familiares, por todo incentivo e confiança que em mim depositaram.

À FAPEMIG pelo suporte financeiro para a realização deste trabalho.

A todos que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	vi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 Interação planta x inseto	3
2.2 Inibidores de proteinases	6
2.3 Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases de plantas.....	9
2.4 Plantas geneticamente modificadas expressando inibidores.....	12
2.5 Mamona	14
2.5 <i>Spodoptera frugiperda</i>	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Obtenção do extrato aquoso e dos extratos etanólicos de folhas de mamona (<i>Ricinus communis</i> L.)	18
3.2 Obtenção de enzimas digestivas de <i>Spodoptera frugiperda</i>	19
3.3 Ensaio de inibição da atividade da tripsina de <i>S. frugiperda</i>	20
3.4 Montagem da coluna de cromatografia de adsorção.....	20
3.5 Teste de inibição das frações obtidas na cromatografia de adsorção.....	21
3.6 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	21
3.7 Teste de inibição das frações obtidas no HPLC.....	22
3.8 Espectrometria de massas das frações obtidas no CLAE	22
3.9 Ensaio biológico	23
3.9.1 Preparação da dieta artificial.....	23

3.9.2 Parâmetros biológicos.....	24
3.9.2.1 Utilização do alimento por lagartas de <i>S. frugiperda</i> , em dieta artificial, acrescida do pico etanólico da cromatografia de adsorção do extrato de folhas de mamona.....	24
3.10 Determinação de proteína nas fezes.....	25
3.11 Análise estatística	25
4 RESULTADOS	26
4.1 Inibição de tripsina de <i>S. frugiperda</i> por extratos aquoso e etanólico 1 de folhas de mamona	26
4.2 Rendimento do extrato etanólico 2 de folhas de mamona	26
4.3 Inibição de tripsina pelas frações obtidas na cromatografia de adsorção	27
4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	28
4.5 Espectrometria de massas	29
4.6 Bioensaios.....	31
4.6.1 Efeito das diferentes concentrações do inibidor de tripsina sobre a duração das fases de larva e pupa de <i>S. frugiperda</i>	31
4.6.2 Consumo alimentar e peso das fezes das lagartas alimentadas com diferentes concentrações do inibidor de tripsina.....	32
4.6.3 Porcentagem de sobrevivência das lagartas, número e peso médio de pupas formadas	32
4.6.4 Curva de crescimento.....	34
4.7 Determinação de proteínas nas fezes.....	35
5 DISCUSSÃO	36
5.1 Purificação e identificação de inibidores de proteinases	36
5.2 Resistência de plantas devido à presença de inibidores.....	39
6 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
ANEXOS	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Inibição de tripsina de <i>S. frugiperda</i> por meio de extratos etanólico (1) e aquoso de mamona.....	26
FIGURA 2. Atividade de tripsina inibida (mUTI) de <i>S. frugiperda</i> por grama de extrato de folhas de mamona das frações obtidas pela coluna de adsorção em sílica.....	27
FIGURA 3. Cromatograma de HPLC (370 nm) da fração etanol.....	28
FIGURA 4. Atividade de tripsina de <i>S. frugiperda</i> no controle (♦) e nas frações obtidas do CLAE (■).....	29
FIGURA 5. Espectros de massa das frações obtidas no HPLC (A – 27min.; B – 28min.; C – 29min.; D – 30 min.).....	30
FIGURA 6. Curva de crescimento de lagartas de <i>S. frugiperda</i> utilizando dietas com diferentes concentrações do pico de inibição (eluído com etanol) obtido da coluna de adsorção juntamente com o controle – dieta sem o extrato inibitório.	35

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Composição da dieta artificial utilizada para a criação de <i>S. frugiperda</i>	24
TABELA 2. Duração do período larval e pupal (dias) de <i>S. frugiperda</i> provenientes de larvas de primeiro instar. Temperatura de 25±2°C, UR de 70±10% e fotofase de 12 horas.....	31
TABELA 3. Consumo alimentar e peso das fezes (± EP) de <i>S. frugiperda</i> proveniente de lagartas alimentadas, desde a eclosão, com dieta artificial acrescida do extrato inibidor de tripsina. Temperatura de 25±2°C, UR de 70±10% e fotofase de 12 horas.....	32
TABELA 4. Porcentagem de sobrevivência e peso médio das pupas (± EP) alimentadas com diferentes concentrações do inibidor de tripsina. Temperatura de 25±2°C, UR de 70±10% e fotofase de 12 horas.....	33
TABELA 5. Número de pupas formadas no final do ciclo.....	34
TABELA 6. Proteínas excretadas nas fezes de <i>S. frugiperda</i> (±EP).....	35

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BapNa:	(D-L) Benzoil-arginina-para-nitroanilida
BSA:	Albumina soro bovina
CpTI:	Inibidor de tripsina de feijão de corda
Da:	Daltons
EP:	Erro padrão
g:	Aceleração da gravidade
CLAE:	Cromatografia líquida de alta eficiência
IP:	Inibidor de proteinase
IPBII:	Inibidor de proteinase batata II
ITM:	Inibidor de tripsina de mamona
KDa:	Kilo Dalton
MTI-2:	Inibidor de tripsina de mostarda-2
NaOH:	Hidróxido de sódio
P.A.:	Puro para análise
pH:	Potencial hidrogeniônico
RMN:	Ressonância magnética nuclear
RPM:	Rotações por minuto
SBBI:	Inibidor de soja Bowman Birk
SBTI:	Inibidor de serino tripsina Kunitz
SPI:	Inibidor de serino proteinase
SKTI:	Inibidor de tripsina da soja Kunitz
TRIS:	Tri-hidroximetilaminometano
mUTI:	Mili Unidade de tripsina inibida
UR:	Umidade relativa

RESUMO

CARVALHO, Gislaine Aparecida. **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, MG.*

Ao longo de sua evolução, as plantas têm se defendido do ataque de insetos e de outros organismos, através de inúmeros mecanismos, entre os quais destacam-se a síntese e o acúmulo de proteínas de defesa, tais como os inibidores de proteinase. Desde a descoberta dos inibidores de proteinases como agentes de defesa vegetal, várias tentativas têm sido feitas para sua utilização no melhoramento vegetal. Esses inibidores constituem uma das barreiras químicas de defesa da planta e atuam no intestino dos insetos herbívoros pela inibição da digestão de proteínas, provocando a superprodução de enzimas digestivas, reduzindo a disponibilidade dos aminoácidos essenciais para produção de outras proteínas. Testes de inibição da tripsina foram feitos, pelo fato dessa enzima participar da digestão primária de proteínas e seu mau funcionamento resultar na redução de aminoácidos disponíveis para o inseto. Como fonte do inibidor, utilizou-se o extrato etanólico de folhas de mamona, que demonstrou uma inibição da atividade de tripsina de *Spodoptera frugiperda* de aproximadamente 66%. Com testes preliminares constatou-se que este inibidor é uma molécula orgânica não proteica diferente das demais descritas na literatura que são protéicas. Objetivou-se com este trabalho isolar esta(s) substância(s) presente nas folhas de mamona, usando técnicas de cromatografia de adsorção no qual obteve-se inibição nas frações etanol e metanol e, também, um pico de ativação na fração clorofórmio/acetato de etila. Para dar prosseguimento ao processo de purificação, a fração etanol foi escolhida devido ao fato do seu maior potencial de inibição. Esta fração foi submetida a análises de CLAE, obtendo-se quatro tempos de retenção (26, 27, 28 e 29 min.) que inibiram a enzima tripsina. Foram feitas análises *in vivo* com a lagarta de *S. frugiperda*, adicionando em dietas artificiais, o extrato etanólico saído da coluna de adsorção nas concentrações de 0; 0,06; 0,12; 0,25 e 0,5 % e constatou-se a interferência deste em dois parâmetros, um aumento de 11 dias na duração da fase larval e uma diminuição no peso das pupas em 27 mg, ambos na concentração de 0,5%. Em relação à curva de crescimento, pôde-se observar que a concentração de 0,5% de inibidor foi capaz de causar uma deficiência evidente no padrão de desenvolvimento das lagartas, em relação aos outros tratamentos, apresentando um alongamento da

*Comitê Orientador: Dr. Custódio Donizete dos Santos – UFLA (Orientador), Dra. Maria das Graças Cardoso – UFLA e Dra. Angelita Duarte Corrêa - UFLA

fase larval, em 11 dias em relação à testemunha. Também houve um atraso em relação ao início da formação de pupas de 3 dias em relação ao controle. A determinação de proteínas nas fezes demonstrou que na concentração de 0,5% havia 11µg de proteínas, na concentração de 0,25% obteve-se 6,2 µg e, na testemunha, apenas 1,4 µg de proteínas.

ABSTRACT

CARVALHO, Gislaine Aparecida. **Extraction and chromatographic analyses of a present inhibitor of tripsina in leaves of mamona and its action in the development of the lagarta-do-cartucho of the maize.** 2009. 59 p. Dissertation (Master in Agrochemistry) Federal University of Lavras, Lavras, M G.*

Along their evolution, plants have been protecting themselves from insects' attacks and from other organisms using countless mechanisms. The protecting protein synthesis and accumulation, such as the proteinase inhibitors, stand out in the process. From the discovery of the proteinase inhibitors as vegetal protecting agent many efforts have been done to its use for vegetal improvement. These inhibitors constitute one of the plant's protecting chemical barriers and making an overproduction of digesting enzymes. It decreases the readiness of other amino acids to product more proteins. Trypsin's inhibition tests were done because this particular enzyme takes part in the digestion of primary proteins and its irregular functioning ends up in decreasing the amino acids ready for the insects. As an inhibitor source, it was used ethanol's extract from castor oil plants' leaves that showed an inhibition of the trypsin's activity in *Spodoptera frugiperda* from about 66%. In previous tests it was clear that this inhibitor was an organic molecule different from the ones described in the field literature which are protein derived. The main goal of this work was isolate this (these) substance (s) present in castor oil plants' leaves using adsorption chromatography in which the ethanol and methanol fractions were gotten. It was also used an activation peek on the chloroform/acetate etila fraction. To continue with the purification process, the ethanol fraction was chosen because it has a higher inhibition potential. To this fraction was given a series of analysis of HPLC, having four different retention times (26,27,28 and 29 minutes) that inhibited the trypsin's enzyme. Analysis were given in vivo with the *S. frugiperda* caterpillar adding in artificial diets the ethanol extract taken from the adsorption column on the following concentrations: 0; 0,06; 0,12; 0,25 and 0,5% and it made clear the interference of that in two parameters, a gaining of 11 days in the larval phase duration and a decreasing in pupa's weight in 27 mg, both in concentration 0,5%. In relation to the growing curve, it was seen that the concentration of 0,5 % of the inhibition was capable to cause an evident deficiency on the standard caterpillar's development in relation to the other treatments, showing a larger larval phase in 11 days in relation to the witness. There was also retardation in relation to the pupa's formation in 3 days in

*Guidance Committee: Dr. Custódio Donizete dos Santos – UFLA (Adviser), Dra. Maria das Graças Cardoso – UFLA and Dra. Angelita Duarte Corrêa - UFLA

relation to the control. The proteins determination in feces showed that on the 0,5% concentration there was 11 μ g of proteins, on the concentration of 0,25%, 6,2 μ g and on the witness only 1,4 μ g of proteins.

1 INTRODUÇÃO

As plantas sofrem constantemente agressões de pragas e patógenos, responsáveis por grandes perdas na agricultura, pois, além de causarem doenças e injúrias, alimentam-se dos tecidos da planta (Gatehouse et al., 1992). Entretanto, elas apresentam certos graus de resistência ao ataque de pragas e patógenos, tendo, para isso, desenvolvido durante a evolução mecanismos de defesa.

De uma maneira geral o uso de inseticidas têm sido o método mais eficiente no combate a esses insetos, existindo no mercado um grande número de produtos registrados. Entretanto, são caros e em alguns casos ineficazes e perigosos se usados de forma intensiva e incorreta. Até a descoberta de inseticidas organossintéticos, na primeira metade do século passado, as substâncias extraídas de vegetais eram amplamente utilizadas no controle de insetos. As variações na eficiência do controle, devido às diferenças na concentração do ingrediente ativo entre plantas e, principalmente, os baixos efeitos residuais, que apontava à necessidade de várias aplicações em períodos curtos, fez com que os inseticidas vegetais fossem gradativamente substituídos pelos sintéticos.

É inegável a preocupação crescente com o meio ambiente, dessa forma, observa-se o crescimento da agricultura orgânica, visando evitar os efeitos prejudiciais dos produtos químicos aos agroecossistemas e, assim, substituí-los por métodos alternativos de controle de pragas e doenças, preservação das propriedades do solo, manejo de plantas daninhas, cobertura morta, adubação verde e rotações de culturas, entre outras práticas (Luz et al., 2005). Nesse contexto, segundo Vasconcelos et al. (2006), uma alternativa que vem sendo retomada para o controle de pragas é o uso de metabólitos secundários presentes

em algumas plantas, as quais são chamadas de “plantas inseticidas”. Diversas substâncias oriundas dos produtos intermediários ou finais do metabolismo secundário dessas plantas, que podem ser encontradas nas raízes, folhas e sementes, entre eles, rotenóides, piretróides alcalóides e terpenóides, interferem severamente no metabolismo de outros organismos, causando impactos variáveis, como repelência, deterrência alimentar e de oviposição, esterilização, bloqueio do metabolismo e interferência no desenvolvimento sem, necessariamente, causar a morte (Lancher, 2000; Medeiros, 1990).

Diante disso, novas tecnologias têm sido estudadas, dentre as quais, deve-se ressaltar a utilização de inibidores de proteinase (Johnson et al., 2000). Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a transferência de genes, que codificam inibidores de proteinases (IP) para outras espécies sexualmente incompatíveis, resultando em plantas mais resistentes a determinados insetos-praga.

Assim, objetivou-se com este trabalho purificar um inibidor de tripsina de lepidópteros presente nas folhas de mamona e estudar a atuação deste inibidor, incorporado à dietas artificiais, sobre a enzima tripsina de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e, conseqüentemente, avaliar os seus efeitos sobre o desenvolvimento e biologia das lagartas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Interação planta x inseto

Nos ecossistemas naturais, as plantas e os insetos são apenas alguns dos organismos vivos, que estão continuamente interagindo de uma forma complexa. As várias atividades benéficas desempenhadas pelos insetos em relação às plantas como a polinização e a defesa e, pelas plantas, em relação aos insetos como prover abrigo, local para oviposição e alimento, mostram a estreita associação entre estes dois organismos (Panda & Khush, 1995). Por outro lado, os insetos podem atacar as plantas e, dependendo do nível da herbivoria, estes podem ser extremamente prejudiciais, levando-as até mesmo à morte.

Com o objetivo de diminuir o ataque dos insetos, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa, que incluem barreiras físicas e químicas, além de complexas vias de sinalização (Falco et al., 2001). Dentre elas estão a indução de proteínas de defesa (Haruta et al., 1995), a liberação para o ambiente de compostos voláteis, que atraem predadores dos insetos herbívoros (Birkett et al., 2000), a síntese de metabólitos secundários (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 barreiras impostas pelas plantas. Estas estratégias incluem a metabolização e seqüestro de compostos tóxicos (Scott & Wen, 2001; Nishida, 2002), mecanismos de fuga (Zangerl, 1990) e alteração nos padrões de expressão gênica (Silva 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. Uma outra estratégia usada pelas plantas é a indução da síntese destas substâncias, em resposta às injúrias causadas pelo ataque dos herbívoros.

Estes dois mecanismos de defesa são responsáveis por prevenir a maioria dos ataques, embora exista um número reduzido de insetos que são capazes de se adaptarem de forma específica, causando danos às plantas.

Uma classe de substância que está intimamente relacionada à defesa das plantas é a dos inibidores de proteinases (IP). Os níveis destes IP 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 fito-hormônios (Rakwal et al., 2001). 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 de plantas funcionam como inibidores específicos das proteinases digestivas dos insetos, formando um complexo estável no qual a proteólise é limitada e extremamente lenta (Tiffin & Gaut, 2001). Em última instância, os IP atuam, causando uma deficiência em aminoácidos, que influencia o crescimento e desenvolvimento dos insetos, podendo, eventualmente causar a sua morte devido à inibição das proteinases digestivas ou devido à produção maciça destas enzimas, reduzindo a disponibilidade dos aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas (Jongsma & Bolter, 1997; Pompermayer et al., 2001). Ao tornarem mais lento o desenvolvimento dos herbívoros, estes inibidores prolongam o período em que predadores poderiam ser atraídos para as plantas atacadas por meio de compostos voláteis liberados por elas, contribuindo de forma indireta no controle dos insetos (Baldwin, 2001) e diminuem o número de gerações das pragas.

Nesse aspecto, durante a evolução, plantas e insetos desenvolveram mecanismos ecológicos, fisiológicos e bioquímicos, para diminuir os efeitos negativos dessa interação. As plantas desenvolveram mecanismos extraordinários contra as proteinases dos insetos, tais como: o aumento da

atividade de inibidores nos tecidos (Rakwal et al., 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 proteínases (Roy & Gupta, 2000), o aumento da complexidade dos inibidores com propriedades bioquímicas diferentes por meio da produção de iso-inibidores (Tiffin & Gaut, 2001), a 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). Em contrapartida, os insetos desenvolveram maneiras de superar os efeitos negativos causados pelos IP presentes em suas plantas hospedeiras. Estas incluem o aumento da atividade das enzimas do trato digestivo e a síntese de enzimas menos sensíveis (Paulillo et al., 2000), a modificação do espectro ou atividade relativa de várias hidrolases digestivas (Patankar et al., 2001), a quebra de inibidores via proteínases (Girard et al., 1998) e a diminuição da sensibilidade das enzimas aos inibidores (Brito et al., 2001) via formação de polímeros de alto peso molecular insensíveis aos IPs.

Estudos mostraram que lagartas de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1808) (Lepidoptera: Noctuidae) eram capazes de superar os efeitos de vários IP de plantas hospedeiras, alterando a composição das enzimas do trato digestivo após a ingestão destes IP (Patankar et al., 2001). O mesmo foi observado para *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1767) (Lepidoptera: Noctuidae), *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) (Lepidoptera: Noctuidae) (Mazumdar-Leighton & Broadway, 2001a, b) e *Heliothis virescens* (Fabricius, 1781) (Lepidoptera: Noctuidae) (Brito et al., 2001). Mazumdar-Leighton & Broadway (2001a) mostraram que insetos da ordem Lepidoptera apresentavam tripsinas constitutivas e tripsinas induzidas, que após a ingestão de IPs eram insensíveis aos inibidores. Resultados semelhantes foram descritos para as quimotripsinas (Mazumdar-Leighton & Broadway, 2001b) e para as α -amilases (Silva et al., 2001). Além

disto, a produção de proteinases que hidrolizam os IPs permite aos insetos superarem tais defesas das plantas e utilizarem os inibidores digeridos como fonte de aminoácidos (Girard et al., 1998).

2.2 Inibidores de proteinases

Ao longo da evolução, as plantas têm se defendido do ataque de insetos e de outros organismos através de inúmeros mecanismos, entre os quais destacam-se a síntese e o acúmulo de proteínas de defesa tais como os inibidores de proteinases (Ryan, 1990). Desde a descoberta dos inibidores de proteinases como agente de defesa vegetal, inúmeras tentativas têm sido feitas para a sua utilização no melhoramento vegetal.

Devido à grande diversidade e abundância dos inibidores na natureza, adota-se um complexo sistema de classificação de acordo com a proteinase inibida, da homologia entre as estruturas primárias e terciárias e, também, do aspecto evolutivo. Diversas famílias de plantas possuem um grande e complexo grupo de inibidores de proteinases, que atuam na defesa do vegetal. Essas proteínas estão presentes em diversas partes da planta como as folhas, os tubérculos e as 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 da ordem 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, quimotripsina), para proteólise das proteínas ingeridas. Estudos demonstraram que as proteinases dos insetos da ordem Lepidoptera, apresentam pH entre 8,5 a 10, os quais são ótimos para atividade desta classe de enzima (Sivakumar et al., 2005). Em contrapartida, nas ordens Hemiptera e Coleoptera, os inibidores de cisteíno proteinases se mostram

mais eficientes, as quais têm importante papel na digestão das proteínas da alimentação (Ryan, 1990).

As pesquisas sobre os efeitos dos inibidores de proteinases de plantas sobre as proteinases digestivas dos insetos iniciaram por volta de 1950 sendo que, seu envolvimento como agente protetor contra insetos recebeu forte suporte nos anos de 1960 a 1970 (Ryan, 1973).

Os inibidores de proteinase 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 devido à super produção de enzimas digestivas, reduzindo a disponibilidade dos aminoácidos essenciais para produção de outras proteínas (Jongsma & Bolter, 1997).

Experimentos *in vitro*, com extratos intestinais de diferentes larvas e inibidores purificados mostram que os inibidores são eficientes se incorporados na dieta dos insetos (Franco et al., 2002; Pompermayer et al., 2001; Pompermayer et al., 2003).

Em contrapartida, pesquisas demonstram que o papel defensivo desses inibidores, embora sejam eficientes em muitos experimentos são apenas parte de uma complexa interação de adaptação entre plantas e insetos.

Os efeitos de dietas protéicas acrescidas de inibidores de proteinases foram estudados por Markwick et al. (1995). Os autores encontraram uma relação linear entre ganho de peso larval médio e níveis de caseína na dieta de *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae). Quando IPs foram incorporados à dieta artificial, os efeitos sobre a taxa de crescimento de lagartas de *C. pomonella* foram mais pronunciados onde os níveis de caseína eram mais elevados. Os IPs de batata foram os mais efetivos na redução da taxa de crescimento seguido de IPs de soja. No entanto, a mais significativa redução observada na taxa de crescimento ocorreu com lagartas alimentadas com dieta contendo uma combinação de IP de batata e inibidor de carboxipeptidase.

A influência de inibidores de proteinase sobre as enzimas digestivas e desenvolvimento de insetos de diferentes Ordens foram analisadas. A ingestão crônica de inibidores de serina proteinase (SPI) reduziu significativamente a atividade proteolítica, *in vivo*, daquelas espécies com hábitos alimentares relativamente especializados. No entanto, a ingestão crônica de SPI não influenciou a sobrevivência de lagartas com hábitos alimentares relativamente generalizados. Baseados nesses resultados foi proposto um mecanismo para seleção de IP, para defesa fitoquímica contra insetos herbívoros (Broadway & Villani, 1995).

Um interessante trabalho com o inibidor de proteinase do tipo Kunitz (SBTI) desenvolvido por Broadway (1997) revelou que a ingestão de SBTI por lagartas de *H. zea*, *A. ipsilon* e *Trichoplusia ni* (Hubner, 1803) (Lepidoptera: Noctuidae) aumentou o tempo de retenção do alimento no trato digestivo dos insetos e o nível de atividade de enzimas proteolíticas que foram 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. Baseada nessas observações, a autora sugere 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 podem ser úteis ao controle dos afídios dos cereais, Tran et al. (1997) testaram cinco inibidores de proteinase de plantas, em três espécies de afídios alimentados em dieta artificial. Os IPs de batata, quando incorporados em dieta artificial, na concentração de 1mM, aumentaram a mortalidade no último ínstar dos afídios e reduziram a produção de ninfas nos bioensaios. Os IPs de soja apresentaram efeitos abióticos variáveis, oscilando entre significativo e não significativo, dependendo da espécie de afídio analisada.

2.3 Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases de plantas

Ao longo do tempo, os insetos têm desenvolvido diferentes estratégias de adaptação, para contornar o efeito negativo dos inibidores de proteinase de plantas, sendo estas o maior obstáculo no manejo de pragas (Mello & Silva-Filho, 2002; Moon et al., 2004).

Uma estratégia adaptativa é o 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. Nesse trabalho, os autores estudaram larvas de *H. zea* e *Spodoptera exigua* (Hübner, 1808) (Lepidóptera: Noctuidae) alimentadas em dieta artificial, contendo inibidor de tripsina de soja e inibidor de proteinase de batata II e verificaram que após uma ingestão crônica do inibidor de tripsina de soja e inibidor de proteinase de batata II os insetos aumentaram o nível de atividade das tripsinas, umas das proteinases intestinais primárias, que participam de seu 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 moléculas de tripsinas.

Outra estratégia é através de enzimas hidrolíticas que fragmentam os inibidores. Michauld et al. (1995), pesquisando a interação bioquímica entre as proteinases digestivas do coleoptera *Otiorynchus sulcatus* (Fabricius) (Coleoptera: Curculionidae) e dois inibidores de proteinase (Oryzacystatin I e II) verificaram que proteinases desses insetos foram capazes de clivar o inibidor oryzacystatin II, gerando um composto intermediário instável, que subsequentelemente, é totalmente hidrolisado.

Os insetos podem ainda sintetizar enzimas insensíveis ou menos sensíveis aos inibidores. Jongsma et al. (1995), estudando lagartas de *S. exigua* cronicamente expostas a folhas de tabaco transgênicas, expressando IPBII demonstraram que os insetos se adaptam à ingestão dos inibidores pela mudança

do repertório das proteinases, induzindo 2,5 a 3 vezes a atividade das proteinases insensíveis. No mesmo ano, Bolter & Jongma avaliaram os efeitos da ingestão crônica de folhas de batata, contendo altos níveis de inibidores de proteinase intestinal das larvas do coleoptero *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) e mostraram que a atividade geral das proteinases caiu 42%, nas larvas alimentadas em plantas em que os inibidores foram induzidos. Em contrapartida, houve uma indução 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 através da alteração das enzimas proteolíticas presentes em seus intestinos. Os resultados mostraram a presença de nova atividade trípica e um considerável aumento da atividade quimotríptica, as quais, provavelmente, são menos sensíveis ao inibidor (Paulillo et al., 2000). Também, Lara et al. (2000) estudaram a adaptação das larvas de *S. exigua*, após serem alimentadas com plantas transgênicas de tabaco, expressando altos níveis de inibidores de tripsina de cevada. Pela pesquisa verificaram que os insetos se adaptaram, compensando a redução de 25% na atividade das tripsinas pelo aumento da atividade de exopeptidases insensíveis específicas ao inibidor testado.

Tripsinas presentes nos intestinos de lagartas de *H. zea* alimentadas com 0,5% de inibidor de tripsina de soja (SKTI) foram caracterizadas, verificando a presença de uma nova tripsina (Hz15) a qual, nos ensaios enzimáticos, se mostrou insensível aos inibidores testados (SKTI, Bowman Birk – SBBI, PI-2 inibidor de batata tipo II e MTI-2 inibidor de mostarda). Além disso, foi determinada a seqüência de aminoácidos das enzimas sensíveis e insensíveis aos inibidores através da massa dos peptídeos das diferentes isoformas de tripsina e verificaram a presença de 5 regiões que diferiam entre as isoformas e que

sobrepujam com os resíduos 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 aos inibidores. Bown et al. (2004) detectaram expressão diferencial nos genes de tripsina presentes nos intestinos de lagartas do mesmo gênero (*Helicoverpa armigera*) (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). alimentadas com inibidores SKTI e SBBI. Através de análises semiquantitativas com Northern blotting, os pesquisadores observaram que durante as oito primeiras horas de exposição há um aumento no nível das espécies de RNA mensageiro estudadas. Esse padrão se mantém depois de 72h de exposição e o nível dos RNAs correspondentes à tripsina sensível retorna ao mesmo nível que o controle e depois decai 2 vezes. Paralelamente a isso, os ensaios enzimáticos de atividade da tripsina mostram alteração na quantidade e característica desta proteinase no decorrer do tempo que corroboram com as mudanças nas espécies de RNAm.

A expressão gênica diferencial de lagartas de *S. frugiperda* submetidas à dieta suplementada com inibidor de proteinase de soja, mostrou que 38% dos genes expressos diferencialmente estavam 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 são 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 àquela chamada de seletiva, em que somente as proteinases intestinais insensíveis aos inibidores seriam induzidas e mantidas em alto nível de expressão (Brioschi, 2006).

2.4 Plantas geneticamente modificadas expressando inibidores

Plantas geneticamente modificadas, expressando inibidores, estão sendo utilizadas como uma alternativa ao uso de pesticidas químicos. A busca de fatores aplicados à resistência de plantas a insetos-praga e patógenos tem recebido considerável importância e, neste sentido, a engenharia genética oferece a possibilidade da introdução de genes que podem tornar as plantas menos susceptíveis aos ataques de insetos. Ênfase vem sendo dada à utilização de genes, que codificam inibidores de enzimas digestivas com atividade inseticida, devido ao seu poder de reduzir e/ou provocar a morte dos insetos.

A síntese e o acúmulo destas substâncias ocorrem em diferentes estágios de desenvolvimento das plantas, sendo normalmente encontradas em tecidos de armazenamento como sementes e tubérculos. Existem evidências de que o aumento destes compostos nos tecidos vegetais está relacionado a ferimentos ou alimentação de insetos ou danos mecânicos menores (Ryan, 1990). Diante disto, é esperado que estas substâncias, independente de sua origem, desempenhem sua função biológica, em resposta ao ataque do inseto alvo na planta geneticamente modificada.

Um aspecto bastante importante, quanto ao uso de genes codificadores de inibidores de enzimas em transformação de planta, com o intuito de controlar o ataque de insetos, é a seleção destes inibidores a partir de estudos detalhados, levando em consideração a fisiologia e a bioquímica de sua digestão pelo inseto.

O primeiro relato de plantas transgênicas, expressando inibidores protéicos se deu em 1987, quando Hilder et al., introduziram em plantas de fumo, via *Agrobacterium tumefaciens*, um gene que codifica um inibidor de proteinase serínica do tipo Bowman-Birk de feijão de corda (*Vigna unguiculata*) (Linnaeus, 1843) (Fabales: Fabaceae), denominado de CpTI. Este extrato foi utilizado para a realização de bioensaios contra lagartas de *H. virescens*, mostrando que houve uma diminuição da sobrevivência e biomassa do inseto,

além de uma redução de aproximadamente 50% de danos quando comparadas às plantas controle. Este efeito também foi observado, quando testado contra outros lepidópteros como *H. zea*, *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Manduca sexta*. Este mesmo gene foi transferido para outras culturas, como o arroz, demonstrando em campo um aumento significativo de resistência contra duas de suas pragas, *Sesamia inferens* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae) (Xu et al., 1996).

Desde então, muitas outras plantas de interesse comercial, como: cereais, batata, feijão e ervilha, foram transformadas com genes codificadores de inibidores de proteinases serínicas e passaram a apresentar resistência às pragas, oferecendo proteção efetiva contra, por exemplo, insetos-pragas (Duan et al., 1996; Gatehouse et al., 1999; Ishimoto et al., 1996; Morto et al., 2000; Xu et al., 1996); entretanto, poucos são os casos da utilização de inibidores de proteinase serínica contra coleópteros (De Leo et al., 2001).

Muitos desses inibidores, tais como o inibidor de tripsina de soja e o de feijão-de-corda, afetam o desenvolvimento de vários insetos da ordem Lepidoptera (Broadway & Duffey, 1986), os quais possuem uma grande quantidade de proteinases serínicas em seus tratos digestivos (Applebaum, 1985).

O inibidor MTI-2 de mostarda foi eficiente contra lagartas de *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Yponomeutidae), quando expresso em plantas de *Arabidopsis thaliana* (Linnaeus) (Brassicales: Brassicaceae), causando altos níveis de mortalidade e uma acentuada redução no desenvolvimento, sendo, também, eficiente contra *Mamestra brassicae* (Linnaeus) (Lepidoptera: Noctuidae), quando expresso em folhas de fumo transgênicos e contra *S. littoralis*, quando expresso em sementes de granola (De Leo et al., 2001).

O inibidor de Bowman-Birk SBBI e o inibidor tipo Kunitz SKTI, ambos de plantas de soja, quando expressos individualmente em plantas de cana-de-açúcar transgênicas, retardam, significativamente, o desenvolvimento das lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera: Crambidae) (Falco & Silva-Filho, 2003).

Os inibidores de proteinases cisteínicas também vêm sendo utilizados para transformação de plantas, visando o controle dos insetos pertencentes, principalmente, à ordem Coleoptera. A maioria dos genes que codificam para estes inibidores mostrou efeitos deletérios contra coleópteros, quando incorporados em dieta artificial (Edmond et al., 1996; Koiwa et al., 1998) e poucos são os relatos que mostram o efeito destes, quando introduzidos em plantas transgênicas.

Os primeiros relatos de plantas transgênicas, utilizando inibidores de amilases dizem respeito à produção de ervilhas, expressando o gene de α AL-1 em níveis suficientes para tornar as sementes resistentes aos bruquídeos, *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Bruchidae), *Callosobruchus chinenses* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Bruchidae) e *Bruchus pisorum* (Linnaeus 1758) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) (Chrispeels, 1996; Shade et al., 1994). Anteriormente, Ishimoto et al. (1989) demonstraram o efeito inseticida deste mesmo inibidor em plantas de feijão azuki completamente resistente ao caruncho, *C. maculatus*. Em experimentos recentes, Morton et al. (2000) mostraram que ervilhas transgênicas, expressando α AI-2, mostraram-se menos protegidas ao ataque de caruncho, *B. pisorum*, quando comparada com às ervilhas que expressam o α AI-1.

2.5 Mamona

A mamona (*Ricinus communis* L.), uma dicotiledônea pertencente à família Euphorbiaceae, inclui um grande número de espécies nativas da região

tropical, sendo originária da antiga abissínia, hoje Etiópia, no continente africano. É uma planta de hábito arbustivo, com diversas colorações de caule, folhas e frutos tipo racemos. Seus frutos geralmente possuem espinhos, suas sementes apresentam diferentes tamanhos, formatos e grande variabilidade de coloração. É uma planta oleaginosa com considerável potencial para economia do país, pois, esta resiste a longos períodos de seca, além das questões de mão-de obra e produção de matéria prima para diversas aplicações na indústria (Amorin-Neto et al., 2001).

A mamoneira é tratada tradicionalmente como planta daninha em algumas culturas e indesejada na produção pecuária, por conter alguns dos mais poderosos agentes tóxicos vegetais. O eventual consumo de folhas ou frutos por animais, geralmente ocasiona sua intoxicação. Quando ocorre como infestante, suas grandes folhas podem sombrear diferentes espécies cultivadas, ocasionando perdas de produtividade. Do ponto de vista de utilização comercial, por apresentar eficiência fotossintética relativamente baixa, a mamoneira pode ser qualificada como espécie de alta sensibilidade à competição com espécies daninhas por água, luz e nutrientes (Anjos & Silva et al., 2005).

A produção mundial de mamona de 2000 a 2004 chegou a um milhão de toneladas em grão e cerca de 400 mil toneladas de óleo de mamona. Os maiores produtores têm sido a Índia e a China, com cerca de 60% a 20% da produção mundial, respectivamente, o que representa uma produção em torno de 600 a 200 mil toneladas (Savy Filho, 2005; Souza et al., 2004). O cultivo da mamona está em expansão no Brasil. Praticamente toda a produção é industrializada, sendo o produto principal o óleo, utilizado como base para o biodiesel, combustível não fóssil e menos poluente do que os derivados de petróleo (Queiroz et al., 2005) e, como subproduto a torta de mamona, adubo orgânico de boa qualidade devido à eficiência na recuperação de terras esgotadas, pois é um composto ricamente nitrogenado (Fonseca et al., 2005).

O Brasil é, atualmente, o terceiro país produtor de mamona e tem potencial para aumentar rapidamente sua participação nesse mercado, pois dispõe de áreas aptas e tecnologia de cultivo. A crescente demanda pelo óleo de mamona exige um melhor nível tecnológico empregado nas lavouras, com uso de insumos industriais, sistemas de preparo do solo, plantio, colheita e uso de sementes melhoradas, com pureza, germinação e vigor satisfatório.

2.5 *Spodoptera frugiperda*

S. frugiperda ocorre anualmente em áreas tropicais e subtropicais (Snow & Coopeland, 1969). Trata-se de um inseto de metamorfose completa e seus ovos possuem coloração verde-clara, passando para alaranjado após 12 a 15 horas de desenvolvimento do embrião; próximo à eclosão, os ovos mostram-se escurecidos devido à cápsula cefálica do embrião que pode ser vista através do cório translúcido (Cruz, 1995).

Os ovos são colocados em massas, com média de 100 ovos, em camadas sobrepostas e, aparentemente, não há local preferido na planta (Cruz & Figueiredo, 1994). O número de posturas depositado por fêmea é de no máximo treze e um único indivíduo pode depositar até oito posturas em um só dia (Cruz, 1995). Entretanto, a fertilidade das fêmeas pode variar de acordo com a alimentação que o inseto recebe no período larval (Murúa & Virla, 2004). A fase de ovo tem duração de 3 dias a 25°C e viabilidade média de 92% (Murúa & Virla, 2004).

As larvas inicialmente são claras, passando para pardo escuro a esverdeada até quase preta. Iniciam a alimentação pelo cório dos próprios ovos e depois raspam as folhas mais novas da planta (Luginbill, 1928). A larva recém-nascida tece um fio de seda que é usado como meio de dispersão e/ou escape de inimigos naturais, sendo que a habilidade de tecer é perdida após o primeiro ínstar larval (cerca de dois dias após a eclosão). Entretanto, os fios de seda foram

também observados no segundo ínstar e no início do terceiro, constatando-se que nesta ocasião as larvas caminhavam até 47 metros em uma hora (Cruz, 1995). No final da fase, a larva chega a atingir 50 mm de comprimento.

É comum encontrar apenas uma lagarta desenvolvida por cartucho devido ao hábito canibal da espécie. Porém, podem ser encontradas larvas de diferentes ínstars dentro de um mesmo cartucho. O período larval varia de 12 a 30 dias e ocorre dentro do cartucho da planta (Luginbill, 1928).

Atualmente, tem se verificado aumento no número de ataques de *S. frugiperda* às espigas de milho, sendo comum o inseto alimentar-se da base da espiga, danificando os grãos e ocasionando prejuízos elevados. Além do dano direto, através do orifício deixado pela lagarta, pode ocorrer também a penetração de patógenos, que produzem toxinas e, que causam problemas à saúde humana e a de animais domésticos (Cruz et al., 1999).

Quando completamente desenvolvida, a lagarta deixa o cartucho e penetra no solo, onde se transforma em pupa de aproximadamente 15 mm de comprimento. A lagarta prefere geralmente solos arenosos e, em situações onde o solo era muito argiloso, já foram encontradas pupas na planta (Sarmiento et al., 2002). A pupa possui coloração avermelhada até quase preta. A fase tem duração de 10 a 12 dias em média.

A mariposa mede cerca de 35 mm de envergadura, tem a coloração das asas anteriores parda-escuras e posteriores branco-acinzentadas, com pontos claros na região central de cada asa. A atividade das mariposas começa ao pôr-do-sol e atinge seu pico entre duas e quatro horas mais tarde, quando ocorre o acasalamento (Cruz, 1995). A longevidade do adulto é de cerca de 12 dias e a oviposição ocorre a partir do terceiro dia, após a emergência da fêmea. O ciclo completo do inseto (ovo-adulto) dá-se em aproximadamente 30 dias (Murúa & Virla, 2004).

3 MATERIAL E MÉTODOS

As lagartas de *S. frugiperda* utilizadas nos ensaios bioquímicos e biológicos foram obtidas da criação de manutenção do Laboratório de Seletividade do Departamento de entomologia da Universidade Federal de Lavras – UFLA, onde são mantidas à $25 \pm 2^\circ \text{C}$, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa e fotofase de 12 horas, alimentando-se de dieta artificial (Karster-Junior et al., 1978).

As posturas (conjunto de ovos) foram coletadas e colocadas em copos plásticos com capacidade de 50 mL contendo 7 g de dieta artificial. O conjunto foi fechado com tampa acrílica. As lagartas utilizadas nos ensaios biológicos tinham cinco dias de vida.

3.1 Obtenção do extrato aquoso e dos extratos etanólicos de folhas de mamona (*Ricinus communis* L.)

Para a obtenção do extrato aquoso e extrato etanólico 1 com inibidor, utilizaram-se folhas de mamona de uma espécie de ocorrência espontânea no Campus da UFLA, denominada mamoninha do caule vermelho. Foram coletadas folhas de tamanho e aspectos visuais padronizados, evitando-se folhas que apresentassem sinais de lesões por pragas, doenças ou qualquer outro tipo de injúria. Após serem destacadas da planta, as folhas foram transportadas até o Laboratório de Bioquímica da UFLA, onde retiraram-se os pecíolos e nervuras principais, cortando-as em pedaços de aproximadamente 1 cm^2 . Em seguida, macerou-se o material cortado, utilizando-se um almofariz e um pistilo.

Após obter uma massa homogênea, adicionou-se o meio de extração (água ou etanol) resfriada a 4°C , numa proporção definida em 1:4 (peso de folhas/volume de meio de extração) e colocou-se em um agitador orbital a 4°C ,

sob agitação de 150 rpm por 30 minutos. Decorrido esse tempo, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, descartou-se o sedimento e armazenou-se o sobrenadante, que foi utilizado nos ensaios de inibição. A obtenção dos extratos foi realizada com três repetições.

A obtenção do extrato etanólico 2 foi feita com 100g das folhas cortadas em pedaços de 1cm² e colocadas em erlenmeyer, juntamente com o álcool etílico P.A. na proporção de 1:7 (peso de folhas/volume de meio de extração). A mistura foi armazenada no escuro por 20 dias.

Decorridos os 20 dias, o extrato foi filtrado em funil de Büchner, contendo papel filtro acoplado a uma bomba de vácuo e o filtrado recolhido foi rotaevaporado à temperatura de 65° C por 20 minutos. Para eliminar todo o etanol, o extrato foi colocado em uma estufa à 45°C por três dias e a sua massa determinada. Este extrato foi utilizado nos ensaios de inibição e nas análises cromatográficas.

3.2 Obtenção de enzimas digestivas de *Spodoptera frugiperda*

As lagartas de quinto instar foram imobilizadas em gelo por 5 minutos. Em seguida, com o auxílio de estiletes e pinças, retiraram-se seus tegumentos, separando-se o intestino médio e descartando-se os intestinos anterior e posterior.

O intestino médio foi macerado em homogeneizador do tipo Potter na proporção de 1 intestino médio de *S. frugiperda* para 4 mL de água a 4° C. Após a maceração, filtrou-se o homogeneizado em tela de nylon de 100 micrômetros e centrifugou-se a 30.000 x g por 10 minutos a 4°C. Essa solução constituiu o extrato enzimático de *S. frugiperda*, utilizado nos ensaios de inibição de tripsina.

3.3 Ensaio de inibição da atividade da tripsina de *S. frugiperda*

A atividade do inibidor de tripsina foi determinada baseado em Kakade et al. (1974), pela comparação entre um ensaio cinético (com pelo menos 4 períodos de tempo) da atividade de tripsina (Erlanger et al., 1961) de *S. frugiperda* na presença e ausência do inibidor. Também foram feitos ensaios controle sem a enzima, sem substrato, sem enzima e inibidor e sem substrato e inibidor analisados da mesma forma que os experimentais. Os resultados foram expressos em miliunidades de tripsina inibida (mUTI), que consiste no desaparecimento da absorção de luz correspondente a 1 nanoMol de *p*-nitroanilida (produto formado durante a atividade da tripsina sobre o substrato BapNA) durante 1 minuto de reação em 1g de folhas de mamona fresca.

3.4 Montagem da coluna de cromatografia de adsorção

Utilizou-se uma coluna de vidro de 50 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. A sílica utilizada foi Kieselgel 60 (0,040 – 0,063 mm; 230-400 mesh) do fabricante Merck.

A coluna foi preenchida com uma mistura pastosa composta por sílica e clorofórmio P.A. Essa “pasta” foi colocada na coluna, tomando-se o cuidado para não formar bolhas. Acima da sílica, adicionou-se terra de diatomácea e, finalmente, acoplou-se uma bomba de pressão ao topo da coluna.

A amostra aplicada na coluna foi preparada adicionando-se 5 mL de metanol P.A a 1,5 g do extrato etanólico 2 preparado anteriormente. Agitou-se a mistura até completa solubilização e depois foi aplicado 1 mL desse extrato na coluna.

A série eluotrópica utilizada foi a seguinte: hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol, metanol e ácido acético.

As frações coletadas tinham volumes variados (aproximadamente 100 mL) e a troca de solventes ocorreu pela observação de manchas na coluna.

Coletaram-se as diferentes manchas formadas de acordo com a eluição dos diferentes solventes em recipientes distintos.

Observou-se que o volume das frações obtidas na cromatografia era muito grande e, possivelmente, o inibidor estaria muito diluído, inviabilizando sua detecção. Dessa maneira, rotaevaporaram-se as frações obtidas até que o solvente da fração em questão fosse totalmente evaporado. Ressuspendeu-se o remanescente em 5mL de etanol para todas as frações, a fim de padronizar as análises seguintes.

3.5 Teste de inibição das frações obtidas na cromatografia de adsorção

A atividade de tripsina inibida foi determinada em cada fração como descrito no subitem 3.4, porém utilizou-se etanol puro no lugar dos extratos de cada fração, para a determinação da atividade da tripsina no controle (sem inibidor ou sem a fração cromatográfica).

3.6 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A separação cromatográfica foi realizada em um cromatógrafo líquido Shimadzu LC 20A, equipado com um injetor automático, com um volume de injeção de 20µL e um detector UV-VIS. A coluna utilizada foi a C₁₈ (250 mm x 4,6 mm x 5 µm - Nucleosil) e uma pré-coluna C₁₈ (15 mm x 3,2 mm – partícula de 7 µm). A pré-coluna C₁₈ foi utilizada a fim de evitar que partículas ficassem retidas na base do cromatógrafo. A temperatura do forno foi de 45° C.

As análises foram feitas através de eluição por gradiente na qual o eluente B (metanol grau HPLC) foi adicionado ao eluente A (água miliq) através de rampa linear de 20 a 100% em 45 minutos (gradiente de eluição mostrado no Quadro 1), retornando à concentração inicial nos últimos 5 minutos. As frações com um volume aproximado de 1 mL foram coletadas de 1 em 1 minuto em tubos de vidro por um tempo total 50 minutos.

QUADRO 1: Gradiente de eluição de CLAE

Tempo (min.)	[% Água]	[% Metanol]
0	80	20
40	20	80
45	0	100
50	80	20

3.7 Teste de inibição das frações obtidas no HPLC

As 50 frações obtidas foram utilizadas nos ensaios de inibição de tripsina, segundo Kakade et al. (1974). Foram realizados ensaios-controle para monitorar as variações que a diferença de concentração dos eluentes poderiam provocar nos ensaios, visto que a proporção de metanol influencia a atividade da enzima tripsina. Para isso, injetou-se no CLAE somente etanol (solvente utilizado para solubilizar o inibidor) nas mesmas condições da amostra, e coletou-se da mesma maneira.

3.8 Espectrometria de massas das frações obtidas no CLAE

A fim de se obter informação acerca da estrutura molecular do composto responsável pela inibição da tripsina de *S. frugiperda*, obtiveram os espectros de massas das frações obtidas pelo CLAE e que inibiam a tripsina.

A espectrometria de massas foi realizada pelos processos Foto-Fenton e UV/H₂O₂ e foram analisados por LC/MS Trap (Agilent – 1100). As amostras foram inseridas no aparelho por infusão a um fluxo de 5 µL/min, com controle de carga no quadropolo (ICC) ajustado para 30.000. A temperatura do gás de secagem (N₂) foi de 325° C e fluxo de 4L min⁻¹, com potencial de extração de íons de -3.500 V.

3.9 Ensaio biológico

3.9.1 Preparação da dieta artificial

As dietas foram preparadas conforme procedimento descrito por Kasten-Junior et al. (1978). Foram colocados: o feijão cozido, o germe de trigo, a levedura de cerveja, o ácido sórbico, o ácido ascórbico, o Nipagin, o formol, a solução inibidora e a água em um liquidificador e liquidificou-se os ingredientes até se obter uma mistura homogênea (Tabela 1). Em seguida, aqueceu-se 27 g de agar, juntamente com a água (300mL) até dissolver completamente, adicionou-se a solução obtida da homogeneização dos ingredientes acima citados e deixou-se em ebulição, em fogo direto, por aproximadamente cinco minutos. Feito isso, o extrato etanólico seco, de folhas de mamona dissolvido em água foi adicionado à dieta, nas concentrações 0%, 0,06%, 0,12%, 0,25% e 0,5% e, novamente, colocados em liquidificador para misturá-lo com os demais ingredientes.

Após o preparo da dieta, esta foi colocada ainda quente em bandejas de plástico (6 cm x 6 cm x 2 cm de altura), onde foram mantidas até o seu resfriamento. A dieta foi cortada em pedaços de aproximadamente 6g e colocadas em copos descartáveis de café tampados com tampas de acrílico. Em cada copo com dieta foi colocada uma lagarta com 5 dias de idade. Os copos de café, contendo as dietas e as lagartas foram colocados em bandejas de isopor e acondicionadas em ambiente controlado com temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

TABELA 1. Composição da dieta artificial utilizada para a criação de *S. frugiperda*¹.

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

¹Extraído de Karsten-Junior et al. (1978)

*Solução Inibidora: Ácido propiônico (18,00 ml); Ácido fosfórico (43,00 ml); Água (540,00 ml).

3.9.2 Parâmetros biológicos

3.9.2.1 Utilização do alimento por lagartas de *S. frugiperda*, em dieta artificial, acrescida do pico etanólico da cromatografia de adsorção do extrato de folhas de mamona

O experimento foi conduzido no Laboratório de Seletividade do Departamento de Entomologia da UFLA. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições por tratamento e cada parcela constituída por 6 lagartas, mantidas individualizadas.

Cada unidade experimental foi constituída de um copo plástico (50 mL), contendo um pedaço de dieta previamente pesado, sendo o peso médio de 6 g, e uma lagarta de 5 dias, vedado com tampa de acrílico. O experimento foi mantido

em sala climatizada (temperatura de 25 ± 2 °C, umidade relativa de $70 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 12 horas).

Para a obtenção da curva de crescimento, as lagartas foram pesadas a cada 3 dias. O consumo alimentar foi medido, quando as lagartas puparam, bem como o peso das fezes. Neste momento também foi avaliado o peso das pupas, que foram mantidas individualizadas em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura) até emergência dos adultos, para avaliação da duração do período pupal. Os parâmetros avaliados foram: peso de lagartas, duração do período e porcentagem de sobrevivência larval, produção de fezes, consumo alimentar, peso e duração do período pupal.

3.10 Determinação de proteína nas fezes

A concentração de proteínas nas fezes das lagartas de *S. frugiperda* foi determinada com base na metodologia descrita por Bradford (1976), em que 45mg das fezes foram pesadas e a estas foram adicionados 200 µL de água destilada e 200 µL de ácido perclórico 1N, homogeneizados e esta mistura foi colocada em gelo por 10 minutos. Centrifugaram-se as amostras e desprezou-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão em 200 µL de NaOH 0,1N e a sua concentração protéica foi determinada espectrofotometricamente a 594 nm, tomando-se como base uma curva padrão de BSA (albumina de soro bovina) com massas de proteína, variando de 2 a 20 µg.

3.11 Análise estatística

Os dados referentes ao efeito da concentração do inibidor sobre o desenvolvimento da lagarta de *S. frugiperda* foram submetidos à análise de variância e as comparações das médias dos tratamentos foram realizadas por meio do teste de Scott e Knott a 5% de significância (Scott & Knott, 1974). Foi utilizado o programa estatístico Sisvar (Ferreira, 2000)

4 RESULTADOS

4.1 Inibição de tripsina de *S. frugiperda* por extratos aquoso e etanólico 1 de folhas de mamona

Utilizando os extratos aquoso e etanólico 1 de folhas de mamona, pôde-se observar a eficiência destes, para inibir a tripsina de *S. frugiperda* (Figura 1). O extrato etanólico foi mais eficiente, apresentando uma inibição em torno de $66 \pm 3,6\%$, em relação ao aquoso ($37 \pm 2,1\%$)

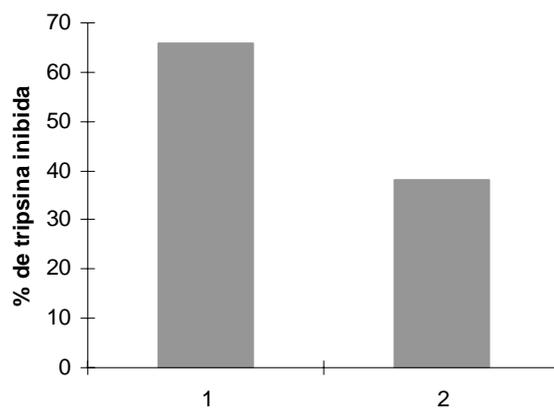


FIGURA 1. Inibição de tripsina de *S. frugiperda* por meio de extratos etanólico (1) e aquoso de mamona.

4.2 Rendimento do extrato etanólico 2 de folhas de mamona

100 g de folhas de mamona originaram 5,4859 g de extrato etanólico seco, que serão usados na purificação do inibidor e nos bioensaios.

4.3 Inibição de tripsina pelas frações obtidas na cromatografia de adsorção

Ao se realizar o teste de inibição de tripsina nas frações provenientes da cromatografia de adsorção dos solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila não se observou inibição da tripsina de *S. frugiperda*. Ao se realizar o teste de inibição com as frações, cujo eluente utilizado foi o etanol, houve inibição de tripsina em todas as frações (10, 11 e 12), o mesmo acontecendo com o eluente metanol (14, 15 e 16). Também foi possível verificar a inibição na última fração (18) do eluente ácido acético. (Figura 2). Também foi observado um pico de ativação na fração 7, que corresponde ao eluente clorofórmio/acetato de etila (Figura 2), sendo a proporção de cada eluente indeterminada, devido à sobreposição de um eluente sobre o outro.

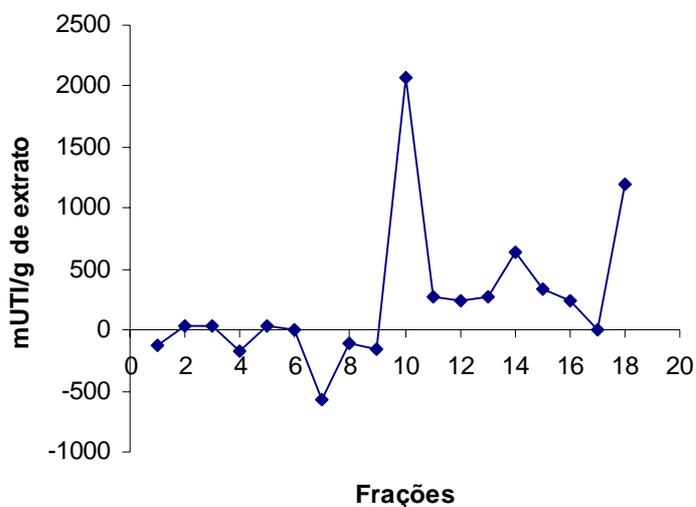


FIGURA 2. Atividade de tripsina inibida (mUTI) de *S. frugiperda* por g de extrato de folhas de mamona das frações obtidas pela coluna de adsorção em sílica. (Frações 1 – hexano; 3 a 6 – clorofórmio; 8 – acetato de etila; 10 e 11 – etanol; 13 a 15 – metanol; 17 e 18 – ác. Acético.

4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A fração que apresentou a maior inibição (etanol – fração 10) foi submetida à análise por CLAE (Figura 3). Foram obtidas 50 frações num tempo de 50 minutos (1mL min^{-1}), que correspondem ao tempo total da análise.

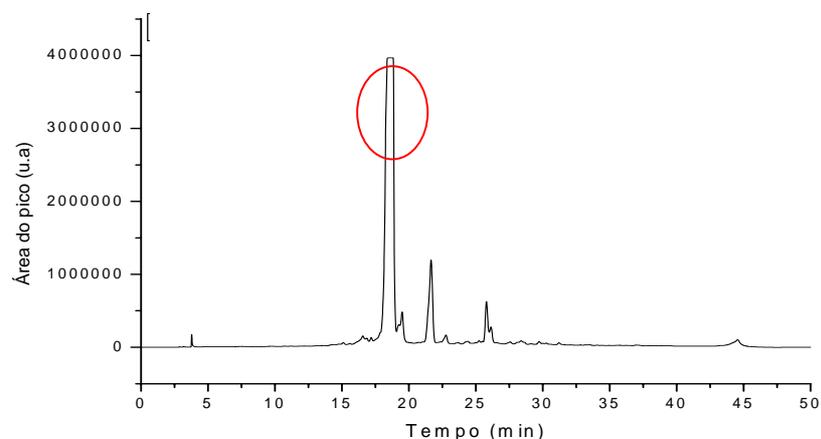


FIGURA 3. Cromatograma de CLAE (370 nm) da fração etanol. O pico circulado corresponde a fração que inibe a tripsina de *S. frugiperda*.

A análise de inibição da tripsina nas frações provenientes da CLAE (FIGURA 4), observou-se a inibição de tripsina de *S. frugiperda* nos tempos de retenção de 26 a 29 min., pela diminuição da absorbância. Foi feito um controle no qual foi injetado somente etanol, para controlar a influencia dos eluentes na análise de inibição de tripsina.

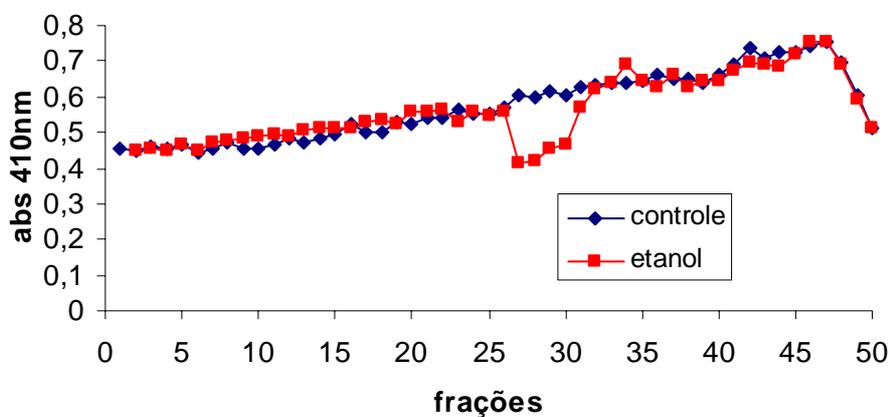


FIGURA 4. Atividade de tripsina de *S. frugiperda* no controle (◆) e nas frações obtidas do CLAE (■).

4.5 Espectrometria de massas

Os espectros de massa (Figura 5) foram obtidos a partir das frações passadas pelo CLAE (26 à 29 min.) e que inibiram a tripsina presente no trato digestivo dos lepidópteros.

Apenas com os espectros de massas não foi possível quantificar as massas dos compostos capazes de inibir a enzima tripsina, porém foi possível identificarem-se alguns picos que se repetiam em todos os espectros e que podem estar relacionados à inibição.

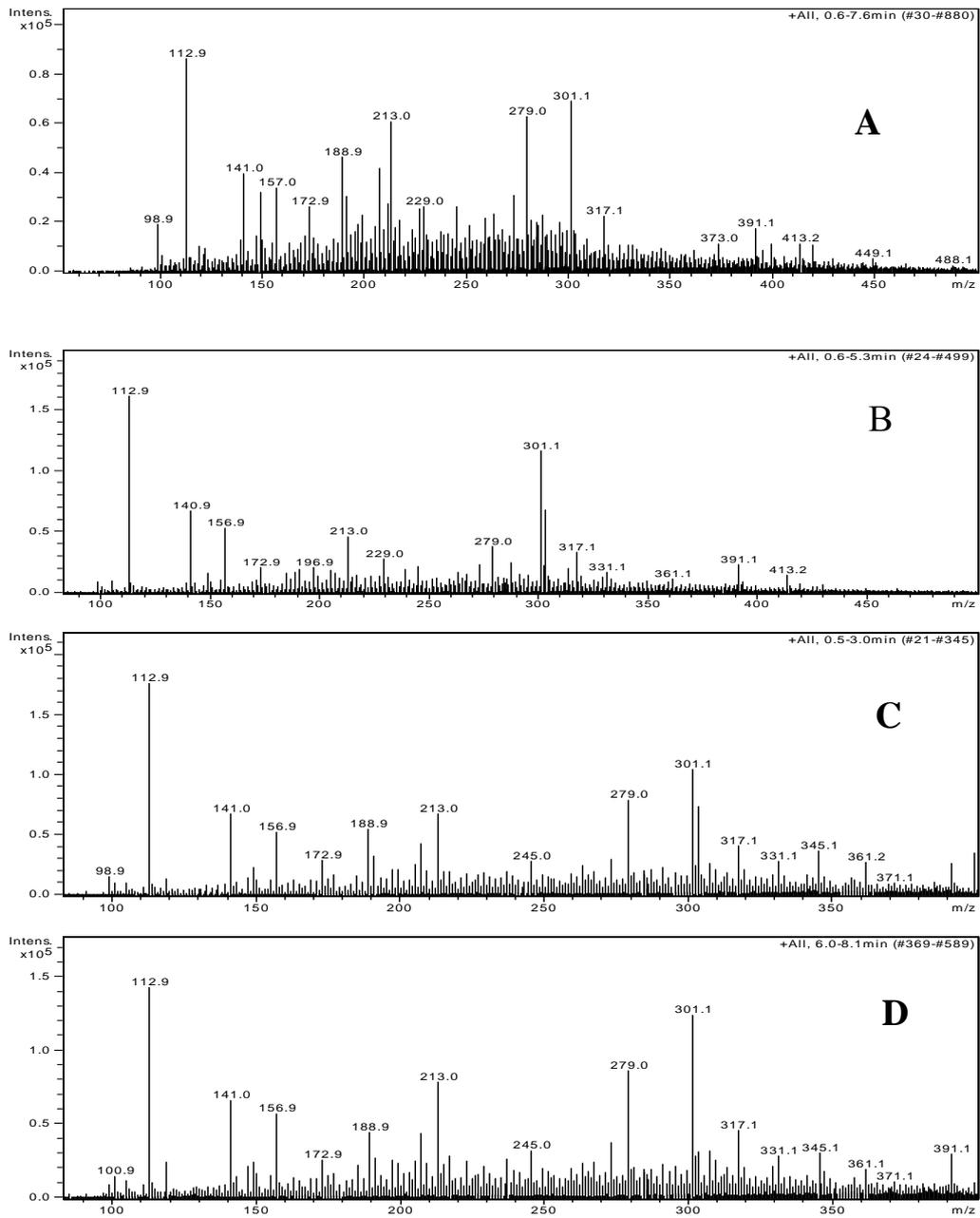


FIGURA 5. Espectros de massa das frações obtidas no HPLC (A – 27min.; B – 28min.; C – 29min.; D – 30 min.).

4.6 Bioensaios

4.6.1 Efeito das diferentes concentrações do inibidor de tripsina sobre a duração das fases de larva e pupa de *S. frugiperda*

Considerando-se as concentrações 0; 0,06%; 0,12%; 0,25% e 0,5%, nas quais parte das lagartas completou o desenvolvimento, verificou-se que somente na concentração de 0,5%, ocorreu efeito do extrato na duração da fase larval de *S. frugiperda* (Tabela 2; Tabela 1A do anexo). Nessa concentração, a média registrada para a duração dessa fase (32,3 dias) foi significativamente maior que aquelas obtidas nos demais tratamentos, os quais variaram entre 21,25 e 23,6 dias e não diferiram significativamente entre si.

No que se refere à duração da fase pupal, não ocorreu diferença significativa entre o período médio de desenvolvimento das pupas, em relação aos diferentes tratamentos a que foram submetidas às lagartas de *S. frugiperda* (Tabela 2; Tabela 2A do anexo).

TABELA 2. Duração do período larval e pupal (dias) de *S. frugiperda* provenientes de lagartas de primeiro instar, alimentadas em dieta acrescida de extrato de inibidor de tripsina. Temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, UR de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Concentração do inibidor (%)	Duração da fase larval* (dias)	Duração da fase pupal (dias)
0	21,25 \pm 0,49 a	12,0 \pm 1,57
0,06	22,43 \pm 0,96 a	13,5 \pm 0,26
0,12	21,82 \pm 0,99 a	14,4 \pm 0,68
0,25	23,6 \pm 0,64 a	14,25 \pm 0,37
0,5	32,3 \pm 1,78 b	14,25 \pm 0,86
CV (%)	11,76	9,39

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem, estatisticamente, entre si, pelo teste de Scott e Knott ($p\leq 0,05$).

4.6.2 Consumo alimentar e peso das fezes das lagartas alimentadas com diferentes concentrações do inibidor de tripsina

O inibidor de tripsina não influenciou o consumo da dieta pelas lagartas, não havendo variação significativa entre os tratamentos analisados (Tabela 3; Tabela 3A do anexo). Também não foi observado variação significativa para o peso das fezes produzidas pelas lagartas durante o período larval (Tabela 3; Tabela 4A do anexo).

TABELA 3. Consumo alimentar e peso das fezes (\pm EP) de *S. frugiperda* proveniente de lagartas alimentadas, desde a eclosão, com dieta artificial acrescida do extrato inibidor de tripsina. Temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Concentração do inibidor (%)	Consumo alimentar (g)	Peso das fezes (g)
0	$5,67\pm 0,14$	$1,04\pm 0,08$
0,06	$5,36\pm 0,19$	$0,95\pm 0,11$
0,12	$5,27\pm 0,29$	$1,01\pm 0,06$
0,25	$5,11\pm 0,38$	$1,29\pm 0,17$
0,5	$4,89\pm 0,74$	$1,27\pm 0,16$
CV (%)	6,13	11,9

4.6.3 Porcentagem de sobrevivência das lagartas, número e peso médio de pupas formadas

Quanto à porcentagem de sobrevivência das lagartas de *S. frugiperda* durante todo o bioensaio, não houve diferença significativa entre os tratamentos analisados (Tabela 4; Tabela 5A do anexo).

Em relação ao peso das pupas, as médias de 264 mg e 260 mg registrado nas concentrações de 0,25 e 0,5% de inibidor, respectivamente, diferiram daquelas obtidas em todos os outros tratamentos, cujos valores médios não apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 4; Tabela 6A do anexo).

TABELA 4. Peso médio das pupas (\pm EP) alimentadas com inibidor de tripsina em diferentes concentrações. Temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, UR de $70\pm 10\%$ e fotofase de 12 horas.

Concentração do inibidor (%)	% sobrevivência	Peso pupas*(mg)
0	$80,0 \pm 4,32$	$287 \pm 3,65$ a
0,06	$86,7 \pm 3,21$	$286 \pm 4,47$ a
0,12	$83,3 \pm 2,65$	$286 \pm 7,36$ a
0,25	$73,3 \pm 9,65$	$264 \pm 3,89$ b
0,5	$63,3 \pm 11,89$	$260 \pm 4,78$ b
CV (%)	24,36	5,58

*Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott e Knott ($p \leq 0,05$).

Observou-se, para o controle (0% de inibidor), que o período para a formação de pupas se restringiu do décimo quinto dia ao décimo oitavo dia. A porcentagem de pupas formadas nesse período foi de 80,02% (Tabela 5). Para os tratamentos 0,06; 0,12 e 0,25, o período para a pupação foi do décimo quinto dia ao vigésimo quarto dia após o início da alimentação (Tabela 5).

Também pode se perceber que a formação de pupas, para a concentração do inibidor 0,5% iniciou-se no décimo oitavo dia, três dias depois dos demais tratamentos e se estendeu até o trigésimo dia.

TABELA 5. Número de pupas formadas durante a fase.

Concentração do inibidor (%)	Dias após o início da alimentação						Total de pupas	Total de pupas (%)
	15	18	21	24	27	30		
0	18	6	-	-	-	-	24	80
0,06	17	4	2	3	-	-	26	86
0,12	14	6	2	3	-	-	25	83
0,25	9	11	1	1	-	-	22	73
0,5	-	4	3	4	5	3	19	63

4.6.4 Curva de crescimento

As lagartas tiveram seu peso monitorado de três em três dias durante 30 dias. Na Figura 6 é mostrada a curva de crescimento das lagartas em diferentes concentrações do extrato inibitório.

As lagartas alimentadas com a dieta controle (0% de inibidor) cresceram normalmente, atingindo seu peso máximo no vigésimo dia após a sua eclosão (Figura 6). Esse comportamento também foi observado para a concentração de 0,06 % de inibidor.

Os tratamentos 0,12% e 0,25% atingiram seu peso máximo no vigésimo terceiro dia, três dias após o controle (Figura 6), enquanto que, as lagartas alimentadas com a dieta acrescida de 0,5% de inibidor, não conseguiu o desenvolvimento adequado, mantendo pesos menores (Figura 6) e, prolongando a fase larval até o trigésimo segundo dia, sendo o mais longo entre todos os tratamentos.

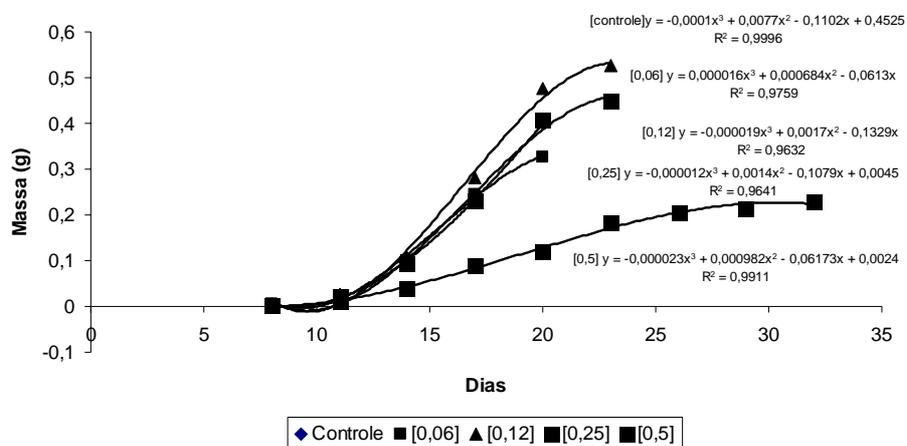


FIGURA 6. Curva de crescimento de lagartas de *S. frugiperda* utilizando dietas com diferentes concentrações do pico de inibição (eluído com etanol) obtido da coluna de adsorção juntamente com o controle – dieta sem o extrato inibitório.

4.7 Determinação de proteínas nas fezes

A quantidade de proteínas encontrada nas fezes variou em função da porcentagem de inibidor adicionada à dieta. As dietas contendo o inibidor de tripsina apresentaram maiores quantidades de proteínas nas fezes, devido à inibição de sua proteinase digestiva, confirmando o menor desenvolvimento das lagartas.

TABELA 6. Proteínas solúveis excretadas nas fezes de *S. frugiperda* (\pm EP)

% de inibidor na dieta	Proteínas μ g/45mg fezes*
0	1,4 \pm 0,06
0,25	6,2 \pm 0,3
0,5	11,0 \pm 0,95

* Média de três repetições.

5 DISCUSSÃO

5.1 Purificação e identificação de inibidores de proteinases

Inibidores de tripsina são extensivamente estudados sob os mais diversos aspectos, tais como a caracterização bioquímica, estrutura tridimensional, interação com as diversas classes de proteinases e efeito sobre praga e patógeno (Franco et al., 2002; Garcia et al., 2004; Jongsma & Bolter, 1997; Krauchenco et al., 2003; Oliveira et al., 2002; Ryan, 1990). Além disso, são excelentes candidatos aos programas de melhoramento de plantas via tecnologia do DNA recombinante, sendo utilizados na produção de plantas resistentes às pragas (Masoud et al., 1996; De Leo et al., 2001; Falco & Silva-Filho, 2003).

Os métodos utilizados para a extração e purificação de inibidores protéicos geralmente é feita de farinhas das determinadas partes do vegetal, usadas como fonte do inibidor, em alguns casos é necessário remover partes da planta, tais como o tegumento das sementes e as nervuras nas folhas para eliminar pigmentos ou outras substâncias como polifenóis e alcalóides que possam interferir nas etapas de purificação subseqüentes (Richardson, 1991).

Diferente dos inibidores protéicos descritos na literatura, o inibidor de tripsina encontrado em folhas de mamona foi extraído de maneira peculiar. Enquanto inibidores protéicos são extraídos através de soluções ácidas (Pando, 1999), soluções salinas (Lopes, 2006) e precipitação por acetona (Oliveira et al., 2002), o inibidor encontrado em folhas de mamona foi extraído com etanol. Neste ponto, convém ressaltar que inicialmente as análises eram feitas com o inibidor extraído com água, através do processo de maceração das folhas e posterior centrifugação, porém este método de extração trazia consigo inúmeras substâncias interferentes juntamente com o inibidor. Testes posteriores foram

feitos e julgou-se a extração por etanol a mais adequada, devido a uma maior inibição e, também, por conter um menor número de substâncias interferentes. Para se chegar a esses resultados foram feitos ensaios *in vitro*, comparando os dois meios extratores (Figura 1).

Os ensaios de inibição de tripsina *in vitro* são importantes, pois, permitem avaliar, ainda que com algumas restrições, o potencial dos inibidores. Consequentemente podem ser desenvolvidas novas estratégias de controle, visando reduzir os danos causados pelos insetos herbívoros (Christeller et al., 1998).

A maioria dos inibidores de tripsina descritos na literatura são protéicos, tratando-se de polipeptídeos, que possuem a capacidade de se ligar às proteinases, estando amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo particularmente abundantes em sementes e órgãos de reserva, fazendo parte de um mecanismo de defesa da planta contra o ataque de pragas (Ryan, 1990). O processo de purificação de inibidores de proteinases, a partir do extrato de várias espécies de plantas, geralmente consiste na utilização de duas técnicas amplamente utilizadas, a cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose e a cromatografia de troca iônica (Richardson, 1977).

A purificação dos cinco inibidores estudados por Batista (1997) foi realizada basicamente por cromatografia de afinidade Tripsina-Sepharose. Um inibidor de tripsina presente em sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) foi isolado através de extração salina, precipitação por acetona e, caracterizado por cromatografia de troca iônica e filtração em gel, apresentando massas moleculares de 19,5 e 10 KDa (Oliveira et al., 2002). Em raízes de *Eucalyptus urophylla*, outro inibidor de tripsina foi isolado através da técnica de cromatografia de exclusão molecular (Tremacoldi & Pascholati, 2004).

Trabalhos anteriores feito com o inibidor de tripsina de folhas de mamona (Rossi, 2007) sugeriram que este inibidor era uma molécula orgânica

não proteica. Precipitações com acetona e solução saturada de amônia, exposição a altas temperaturas e ensaios de inibição na presença de β -mercaptoetanol foram alguns dos testes feitos e o comportamento do inibidor foi atípico, em relação às proteínas. Estes resultados puderam comprovar a natureza orgânica, porém não proteica da molécula responsável pela inibição da tripsina de *S. frugiperda*, sugerindo, assim, uma forma diferente de extração e purificação.

Dois métodos cromatográficos foram utilizados no presente estudo para isolar o inibidor. A cromatografia de adsorção com sílica foi utilizada inicialmente para uma prévia separação dos compostos orgânicos presentes no extrato baseado na diferença de polaridade das moléculas. Feita esta separação prévia, as frações obtidas foram submetidas à análise de inibição *in vitro*. As frações que inibiram a enzima tripsina de *S. frugiperda* foram a etanol e metanol. Alguns traços de inibição também foram encontrados na última fração do eluente ácido acético. Isto pode ter acontecido devido ao fato do eluente em questão ser utilizado para limpar a coluna, podendo, assim, ter saído algum resíduo que havia ficado preso no topo da coluna na última passagem do eluente. Com base nesses resultados pode-se sugerir que há mais de um inibidor de tripsina presente em folhas de mamona, visto que foi observado mais de um pico de inibição (Figura 2). Um fato interessante observado foi a presença de uma molécula ativadora da enzima tripsina na fração clorofórmio/acetato de etila.

Foi escolhida apenas uma das frações (fração etanol - 10) que inibe a tripsina, para dar continuidade ao processo de isolamento e caracterização da molécula. A fração etanol foi escolhida pelo fato de apresentar a maior porcentagem de inibição, frente à enzima tripsina de *S. frugiperda*. A fração etanol obtida pela coluna de adsorção foi analisada por CLAE. Ensaios de inibição de tripsina demonstraram a presença do inibidor em 4 tempos de retenção (26 a 29 min.) (Figura 3). Nota-se na Figura 3 que os picos não estão

totalmente separados, sendo ainda necessário otimizar a análise, para o completo isolamento da molécula.

Mesmo sem a completa separação dos picos, as frações que demonstraram inibição foram submetidas à análise de espectrometria de massas. Em todos os espectros pode-se observar alguns picos que se repetiam, sugerindo que a molécula responsável pela inibição tenha uma estrutura principal comum a todos, podendo diferir apenas em algumas ramificações.

Após ser isolada a molécula que inibe a tripsina de *S. frugiperda*, o próximo passo será caracterizá-la. Para isso, será necessário acrescentar outras técnicas de identificação de moléculas tais como espectrometria de massas, IV e RMN para elucidar por completo a estrutura do inibidor.

5.2 Resistência de plantas devido à presença de inibidores

O uso de genes codificadores de inibidores de enzimas em transformação de plantas tem como intuito controlar o ataque de insetos, sendo necessário fazer uma seleção destes inibidores a partir de estudos detalhados, levando em consideração a fisiologia e a bioquímica de sua digestão pelo inseto.

Para tornar uma planta resistente à determinada praga, vários ensaios devem ser feitos. Atualmente, já se sabe que muitas pragas se tornam resistentes a esses inibidores com o tempo (Paulillo, 1999). Ensaios *in vivo* são extremamente necessários para verificar o comportamento da praga frente à ingestão sistêmica do inibidor.

Diversos trabalhos na literatura mostram os efeitos, *in vivo*, dos inibidores de proteinase do tipo Kunitz e Bowman-Birk sobre o desenvolvimento larval (Shade et al., 1986), peso de pupas (Duan et al., 1996), emergência de adultos (Thomas et al., 1995), fecundidade (Deloach & Spates, 1980), viabilidade total do ciclo dos insetos (Shade et al., 1986) e mecanismos de adaptação dos insetos (Nadalini, 2007; Paulillo, 1999) entre outros, quando

incorporados em dieta artificial ou expressos em plantas. Porém, nenhum trabalho analisando esses parâmetros foi encontrado na literatura para inibidores de tripsina não protéicos.

As atividades *in vitro* dos inibidores podem ser comprovadas, quando estes são incorporados a dietas artificiais e oferecidas aos insetos-alvos. Mesmo que os ensaios *in vitro* sejam testes iniciais para a indicação destas moléculas como bioinseticidas, diversos trabalhos mostraram a comprovação dos efeitos deletérios que os inibidores de proteinases exercem sobre o desenvolvimento de larvas de insetos-praga, através de testes *in vivo* (Broadway et al., 1986; Burguess et al., 1994; De Leo et al., 2001; Macedo et al., 2002; Oliveira et al., 2002).

No presente trabalho, a atividade *in vivo* do inibidor de tripsina de mamona (ITM) foi avaliada durante o desenvolvimento larval de uma importante praga do agronegócio brasileiro, *S. frugiperda* (lagarta-do-cartucho-do-milho). Para isso, ITM foi adicionado à dieta artificial em concentrações crescentes. De todos os parâmetros biológicos avaliados apenas dois apresentaram um resultado diferente, quando comparado com o controle. A duração da fase larval de *S. frugiperda* foi significativamente maior na concentração de 0,5%, em média cerca de onze dias em relação ao controle. Um aumento na fase larval demonstra o efeito deletério do inibidor sobre o desenvolvimento da lagarta, provavelmente isso foi causado devido a falta de aminoácidos essenciais para o seu desenvolvimento, atrasando a conclusão do ciclo.

Outro parâmetro avaliado que sofreu influência do inibidor nas concentrações de 0,25% e 0,5% foi o peso das pupas. Pupas menores sugerem uma reduzida ingestão de alimentos, que provavelmente foi ocasionada pela presença do inibidor nas dietas. Os demais parâmetros avaliados como duração

da fase pupal, consumo alimentar, peso das fezes e porcentagem de sobrevivência não se alteraram com a inclusão do inibidor na dieta.

Apesar do fato de que *in vitro* o ITM inibe 66% a enzima tripsina de *S. frugiperda* é compreensível que tenha ocorrido uma resposta das lagartas a dietas contendo o inibidor. Sabe-se que os insetos-praga têm a capacidade de adaptar-se aos inibidores que lhes são apresentados em ensaios *in vivo* e, também, quando expressos em plantas geneticamente transformadas (Boulter & Jongma, 1995; Ishimoto et al., 1996; Jongma & Boulter, 1997). Estudos com as plantas *Arabidopsis thaliana* L. (Brassicaceae) e *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae) transformadas com o inibidor de tripsina de mostarda mostraram que lagartas de *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) ganharam peso e se desenvolveram mais rapidamente, quando alimentadas com folhas que expressavam baixos níveis de inibidor (De Leo et al., 1998). Em estudos, avaliando-se o efeito do inibidor de tripsina presente em sementes de *Crotalaria pallida* (Fabaceae) sobre às moscas das frutas houve uma diminuição do peso das larvas em todos os tratamentos (Gomes, 2004).

Duas hipóteses podem ser levantadas para explicar a adaptabilidade das lagartas ao inibidor oferecido na dieta artificial: 1) expressam maior quantidade de enzimas digestivas; 2) expressam tipos diferentes de proteinases para superar o efeito destes inibidores de tripsina. Broadway & Duffey (1986) propuseram que a presença de inibidores de proteinases, em intestino de larvas de insetos, pode levar à superprodução de proteases em resposta à presença do inibidor.

Um fato interessante observado durante o monitoramento das lagartas foi que, principalmente nas maiores concentrações, alguns insetos morreram numa fase intermediária entre pré-pupa e pupa. Essas alterações morfológicas provavelmente tenham sido resultantes de efeitos de componentes químicos do extrato no sistema hormonal do inseto.

Em relação à curva de crescimento, pode-se observar que a concentração de 0,5% de inibidor foi capaz de causar uma deficiência evidente no padrão de desenvolvimento das lagartas, em relação aos outros tratamentos, apresentando um alongamento da fase larval em 12 dias em relação à testemunha. Também houve um atraso em relação ao início da formação de pupas de 3 dias em relação ao controle. As demais concentrações analisadas não diferiram do controle, mantendo um padrão de desenvolvimento normal, porém as concentrações de 0,12% e 0,25% apresentaram um alongamento da fase larval em 3 dias.

De acordo com Martinez & Endem (2001), a inibição de crescimento é função da reduzida ingestão de alimentos e pouca habilidade da conversão de nutrientes para o crescimento, enquanto o alongamento da duração da fase larval se verifica, em geral, pela reduzida ingestão de alimentos, em razão da existência de um inibidor ou vários inibidores no alimento ou uma inadequação nutricional do substrato alimentar.

Um fator que vem a corroborar com a idéia de que o inibidor de tripsina atrapalhou o desenvolvimento das lagartas foi o fato de que nas lagartas alimentadas com as maiores concentrações do inibidor (0,25% e 0,5%) houve uma maior excreção de proteínas nas fezes. Isso sugere que a presença do inibidor dificultou a hidrólise das proteínas, sendo que estas não foram absorvidas pelo inseto, sendo eliminadas nas fezes.

É importante considerar que este trabalho poderá contribuir para o desenvolvimento de um método de controle alternativo para Lepidópteros-pragas através da inibição específica da enzima destas lagartas pelo inibidor em estudo. A continuidade dos estudos com esse inibidor tornará possível caracterizar esta molécula, determinar a forma como esse inibidor interfere na catálise da enzima e realizar estudos de propriedades cinéticas do inibidor. Embora os estudos sobre as propriedades dos inibidores de enzimas proteolíticas sejam amplos, o presente trabalho vem mostrar que existem vários aspectos que

merecem ser abordados, principalmente, em se tratando de um inibidor orgânico não proteico, com potencial de aplicação em vários setores, gerando novas linhas de pesquisa.

6 CONCLUSÕES

Isolou-se uma molécula orgânica não proteica específica de tripsina (enzima digestiva) de lepidópteras extraída das folhas de mamona, apresentando forte inibição *in vitro* para a tripsina de *S. frugiperda*.

Em ensaios *in vivo* para *S. frugiperda*, o inibidor de tripsina na concentração de 0,5% provocou um aumento do período larval e uma diminuição do peso das pupas. A diminuição do peso das pupas também foi observado na concentração de 0,25%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM-NETO, M. da S.; ARAÚJO, A.E. de; BELTRÃO, N.E. de M. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 76p.
- APPLEBAUM, S.W. Biochemistry of digestion. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. (Ed.). **Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology**. New York: Pergamon, 1985. v.4, p.279-311.
- BALDWIN, I.T. Na ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. **Plant Physiology**, Washington, v.127, n.4, p.1449-1458, 2001.
- BATISTA, I.F.C. **Estrutura e especificidade de inibidores do tipo SBTI da família Kunitz das sementes de *Bauhinia unguulate*, *Bauhinia variegata*, *Enterolobium contortisiliquum*, *leucaena leucocephala* e *Swartzia pickellii***. 1997. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)-Escola Paulista de Medicina, São Paulo.
- BIRKETT, M.A.; CAMPBELL, C.A.M.; CHAMBERLAIN, K.; GUERRIERI, E.; HICK, A.J.; MARTIN, J.L.; MATTHES, M.; NAPIER, J.A.; PETERSSON, J.; PICKETT, J.A.; POPPY, G.M.; POW, E.M.; PYE, B.J.; SMART, L.E.; WADHAMS, G.H.; WADHAMS, L.J.; WOODCOCK, C.M. 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.
- BOLTER, C.J.; JONGSMA, M.A. Colorado potato beetles (*Leptinotarse decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. **Journal of Insect Physiology**, Oxford, v.41, n.12, p.1071-1078, 1995.
- 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**, London, v.29, p.278-290, 2004.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v.72, p.248-254, 1976.

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

BRITO, L.O.; LOPES, A.R.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.128B, p.365-375, 2001.

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

BROADWAY, R.M.; DUFFEY, S.S.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. Plant proteinase inhibitors: a defense against herbivorous insects? **Entomologia Experimentalis Applicata**, Dordrecht, 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**, Dordrecht, v.76, p.303-312, 1995.

BURGESS, E.P.J.; MAIN, C.A.; STEVENS, P.S.; CHRISTELLER, J.T.; GATEHOUSE, A.M.R.; LAING, W.A. Effects of protease inhibitor concentration and combinations on the survival, growth and gut enzyme activities of the black field cricket, *Teleogryllus commodus*. **Journal Insect Physiology**, Oxford, v.40, n.9, p.803-811, 1994.

CHRISTELLER, J.T.; FARLEY, P.C.; RAMSAY, R.J.; SULLIVAN, P.A.; LAING, W.A. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.254, n.1, p.160-167, 1998.

CRUZ, I. **A lagarta-do-cartucho na cultura do milho.** Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS, 1995. 45p. (Circular técnica, 21).

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.L.C. **Estudos preliminares do parasitóide *Telenomus* sp. Nixon sobre ovos de *Spodoptera frugiperda*.** Sete Lagoas: CNPMS, 1994. 105p. (Relatório técnico anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e sorgo 1992-1993, 6).

CRUZ, I.; FIGUEIREDO, M.L.C.; OLIVEIRA, A.C.; VASCONCELOS, C.A. Damage of *Spodoptera frugiperda* (Smith) in different maize genotypes cultivated in soil under three levels of aluminium saturation. **International Journal of Pest Management**, London, v.45, p.293-296, 1999.

DELOACH, J.R.; SPATES, G.E. Effect of soybean trypsin inhibitor-loaded erythrocytes on fecundity and midgut protease and hemolysis activity of stable flies. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.73, p.590-594, 1980.

DUAN, X.; LI, X.; XUE, Q.; ABO-EL-SAAD, M.; XU, D.; WU, R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. **Nature Biotechnology**, New York, v.14, p.494-498, 1996.

EDMONDS, H.S.; GATEHOUSE, L.N.; HILDER, V.A.; GATEHOUSE, J.A. The inhibitory effects of the cysteine protease inhibitor, oryzacystatin, on digestive proteases on larval survival and development of the southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*). **Entomologia Experimentalis Applicata**, Dordrecht, v.78, p.83-94, 1996.

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

FALCO, M.C.; MARBACH, P.A.S.; POMPERMAYER, P.; LOPES, F.C.C.; SILVA-FILHO, M.C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.24, n.1/4, p.113-122, 2001.

FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean proteinase inhibitor in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v.41, p.761-766, 2003.

FERREIRA, D.F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos, SP. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p.255-258.

FONSECA, N.R.; MYCZKOWSKI, M.P.; SÁ, R.O.; NAKAGAWA, J.; CAVARIANI, C.; ZANOTTO, M.D. **Testes de avaliação da viabilidade e do vigor em sementes de amona**. Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/plantas/mamona/estudos-mamona-sementes.htm>>. Acesso em: 12 dez. 2005.

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**, Oxford, v.70, n.6, p.997-1005, 2001.

FRANCO, O.L.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; SALES, M.P.; MELLO, L.V.; OLIVEIRA, A.S.; DIGDEN, D.J. Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*. **Proteins**, New York, v.49, n.3, p.335-341, 2002.

GARCIA, V.A.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Trypsin inhibitor from *Pocilanthe parviflora* seeds: purification, characterization and activity against pest proteases. **The Protein Journal**, v.23, n.5, p.343-350, 2004.

GATEHOUSE, A.M.R.; BOULTER, D.; HILDER, V.A. **Plant genetic manipulation for crop protection**. New York: CAB International, 1992. 181p. (Biotechnology in agriculture, 7).

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

GIRARD, C.; MÉTAYER, M.L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM-DELÉGUE, M.H.; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.28, n.4, p.229-237, 1998.

GOMES, C.E.M. **Purificação, caracterização e atividade bioinseticida de um inibidor de tripsina de sementes de *Crotalaria pallida***. 2004. 74p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal.

HARUTA, M.; MAJOR, I.T.; CHRISTOPHER, M.E.; PATTON, J.J.; CONSTABEL, C.P. A 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.

HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, London, v.330, p.161-163, 1987.

ISHIMOTO, M.; KITAMURA, K. Growth inhibitory effects of an α -amilase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v.24, p.281-286, 1989.

ISHIMOTO, M.; SATO, T.; CHRISPERS, M.J.; KITAMURA, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α -amilase inhibitor of common bean. **Entomology Experimentalis Applicata**, Dordrecht, v.79, p.309-315, 1996.

JOHNSON, H.A.; ORBELIES, N.H.; ALALI, F.Q.; McLAUGHLIN, J.L. Thwarting resistance: annonaceous acetogenins as new pesticidal and antitumor agents. In: CUTLER, S.J.; CUTLER, H.G. (Ed.). **Biologically active natural products: pharmaceuticals**. Boca Raton: CRC, 2000. p.173-184.

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

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

KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; PUSKI, G. Determination of trypsin inhibitor activity of soy bean products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v.51, p.376-382, 1974.

KASTEN JUNIOR, P.; PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.P.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.1/2, p.68-78, 1978.

KLIEBENSTEIN, D.J.; KROYMANN, J.; BROWN, P.; FIGUTH, A.; PEDERSEN, D.; GERSHENZON, J.; MITCHELL-OLDS, T. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. **Plant Physiology**, Washington, v.126, n.2, p.8811-8825, 2001.

KOIWA, H.; SHADE, R.E.; ZHU-SALZMAN, K.; SUBRAMANIAN, L.; MURDOCK, L.L.; NIELSEN, S.S.; BRESAN, R.A.; HASEGAWA, P.M. Phase display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatine. **The Plant Journal**, Oxford, v.14, p.371-379, 1998.

KRAUCHENCO, S.; PANDO, S.C.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Crystal structure of the kunitz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.312, p.1303-1308, 2003.

LANCHER, W. **Ecofisiologia vegetal**. São Carlos: Rima, 2000. 519p.

LARA, P.; ORTEGO, F.; GONZALEZ-HIDALGO, E.; CASTAÑERA, P.; CARBONERO, P.; DIAZ, I. Adaptation of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) to barley trypsin inhibitor BTI-CMe expressed in transgenic tobacco. **Transgenic Research**, Amsterdam, v.9, p.169-178, 2000.

LEO, F. de; BONADÉ-BOTTINO, M.A.; CECI, L.R.; GALLERANI, R.; JOUANIN, L. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plant. **Plant Physiology**, Washington, v.118, p.997-1004, 1998.

LEO, F. de; BONADÉ-BOTINO, M.; CECI, R.L.; GALERANI, R.; JOUANIN, L. Effects of mustard trypsin inhibitors expressed in different plants on three different lepidopteran pests. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.31, p.593-602, 2001.

LOPES, J.L.S. **Purificação e investigação das propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos de sementes de *Acacia plumose* Lowe**. 2006. 107p. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada-Física Biomolecular)-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

LUGINBILL, P. **The fall army worm**. Washington, DC: United States Department of Agriculture, 1928. 90p. (Technical bulletin, 34).

LUZ, P.H. de C.; VITTI, G.C.; QUINTINO, T.A.; OLIVEIRA, D.B. de. **Utilização de adubação verde na cultura da cana-de-acúcar**. Piracicaba: ESALQ-USP/GAPE/Usina São Manoel, 2005. 53p.

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

MARKWICK, N.P.; REID, S.J.; LAING, W.A.; CHRISTELLER, J.T. Effects of dietary protein and protease inhibitors on codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.88, n.1, p.33-39, 1995.

MARTINEZ, S.S.; EMDEN, H.F. van. Redução do crescimento, deformidades e mortalidade *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) causadas por Azadiractina. **Neotropical Entomology**, Piracicaba, v.30, n.1, p.113-125, mar. 2001.

MASOUD, S.A.; DING, X.; JOHNSON, L.B.; WHITE, F.F.; REECK, G.R. Expression of a corn bifunctional inhibitor of serine proteinases and insect α -amylases in transgenic tobacco plants. **Plant Science**, n.115, p.59-69, 1996.

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**, Oxford, v.31, n.6/7, p.645-657, 2001a.

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**, Oxford, v.31, n.6/7, p.633-644, 2001b.

MEDEIROS, A.R.M. Alelopatia: importancia e suas aplicações. **Hortisul**, v.1, n.3, p.27-32, 1990.

MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.14, n.2, p.71-81, May/Aug. 2002.

MICHAULD, D.; CANTIN, L.; VRAIT, T.C. Carboxy-terminal truncation of oryzacystatin II by oryzacystatin-insensitive insect digestive proteinases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.322, n.2, p.469-474, Oct. 1995.

MOON, J.; SALZMAN, R.A.; AHN, J.E.; KOIWA, H.; ZHU-SALZMAN, K. Transcriptional regulation in cowpea bruchid guts during adaptation to a plant defense protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**, Oxford, v.13, n.3, p.283-97, June 2004.

MORTON, R.L.; SCHROEDER, H.E.; BATEMAN, K.S.; CHRISPEELS, M.J.; ARMSTRONG, E.; HIGGINS, T.J.V. Bean alpha-amylase inhibitor I in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v.97, n.8, p.3820-3825, 2000.

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.

MURÚA, G.; VIRLA, E. Population parameters of *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lep.: Noctuidae) fed on corn and two predominant grasses in Tucuman (Argentina). **Acta Zoológica Mexicana**, México, v.20, n.1, p.199-210, 2004.

NADALINE, L.C.D. **Caracterização do mecanismo adaptativo de *Spodoptera frugiperda* aos inibidores de proteinases de plantas**. 2007. 58p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba.

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

OLIVEIRA, L.G.; GOZZO, A.J.; NUNES, V.A.; SILVA, I.C.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M.; ARAÚJO, M.S. Inibidores de proteases encontrados em sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil): isolamento e caracterização do inibidor de tripsina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.12, p.72-74, 2002. Suplemento.

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

PANDO, L.A.; DI CICERO, L.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; WEDER, J.K.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of a new tripsin inhibitor from *Crotalaria paulina* seeds. **IUBMB Life**, v.48, n.5, p.519-523, 1999.

PATANKAR, A.G.; GIRI, A.P.; HARSULKAR, A.M.; SAINANI, M.N.; DESHPANDE, V.V.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.31, n.4/5, p.453-464, 2001.

PAULILLO, L.C.M.S. **Efeito de inibidores de proteinase de soja sobre a ação, crescimento e metabolismo de proteinases intestinais de lagartas de *Spodoptera frugiperda***. 1999. 72f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba.

PAULILLO, L.C.M.S.; LOPES, A.R.; CRISTOFOLETTI, P.T.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Changes in midgut endopeptidase activity for *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, College Park, v.93, n.3, p.892-896, 2000.

POMPERMAYER, P.; FALCO, M.C.; PARRA, J.R.P.; SILVA-FILHO, M.C. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz type soybean proteinase inhibitors effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.109, p.217-224, 2003.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A.R.; TERRA, W.R.; PARRA, J.R.P.; FALCO, M.C.; SILVA-FILHO, M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Dordrecht, v.99, n.1, p.79-85, 2001.

QUEIROZ, J.A.; OLIVEIRA, A.B.; MENESES, C.H.S.G.; CARTAXO, W.V.; SUASSUNA, N.D. **Efeito da remoção da carúncula, tratamento químico e tempo de armazenamento na germinação de sementes de mamona (*Ricinnus comunis*L.)**. Disponível em: <http://www.biodieselbr.com/plantas/mamona/estudos-mamona_sementes.htm>. Acesso em: 10 dez. 2005.

RAKWAL, R.; AGRAWAL, G.K.; JWA, N.S. 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**, v.263, n.1/2, p.189-198, 2001.

RICHARDSON, M.J. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. **Phytochemistry**, Oxford, v.16, p.159-169, 1977.

RICHARDSON, M.J. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J.B. (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. London: Academic, 1991. p.259-305.

ROSSI, G.D. **Bicho-mineiro do cafeeiro**: análise da digestão e inibição de tripsina por extratos de folhas de mamona. Lavras: UFLA, 2007. 74p.

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

RYAN, C.A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants. **Annual Reviews Plant Physiology**, Palo Alto, v.24, p.173-96, 1973.

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

SARMENTO, R.A.; AGUIAR, R.W.S.; AGUIAR, R.A.S.S.; VIEIRA, S.M.J.; OLIVEIRA, H.G.; HOLTZ, A.M. Biology review, occurrence and control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidóptera, Noctuidae) in corn in Brazil. **Bioscience Journal**, Washington, v.18, n.2, p.41-48, Dec. 2002.

SAVY FILHO, A. **Mamona tecnologia agrícola**. Campinas: EMOPI, 2005. 105p.

SCOTT, A.J.; KNOTT, M.A. A cluster analyses method for grouping means in the analyses of variance. **Biometrics**, Raleigh, v.30, p.502-512, 1974.

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

SHADE, R.E.; MURDOCK, L.L.; FOARD, D.E.; POMEROY, M.A. Artificial seed system for bioassay of *Cowpea weevil* (Coleoptera: Bruchidae) growth and development. **Environmental Entomology**, College Park, v.15, p.1286-1291, 1986.

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

SILVA, S.D.A. e; ANDRES, A.; UENO, B.; FLORES, C.A.; GOMES, C.B.; PILLON, C.N.; ANTHONISEN, D.; MACHADO, E.B.; THEISEN, G.; MAGNANI, M.; WREGE, M.S.; AIRES, R.F. **A cultura da mamona na região de clima temperado**: informações preliminares. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. 56p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 149).

SIVAKUMAR, S.; MOHAN, M.; THAYUMANAVAN, B. Characterization of insect proteinases and their inhibition by finger and little millet inhibitors. **Journal of plant Biochemistry Biotechnology**, Amsterdam, v.14, p.167-71, 2005.

SNOW, J.W.; COPELAND, W.W. Fall armyworm: use of virgin female traps to detect males and determine seasonal distribution. **USDA Production Research Rep.**, v.110, p.1-9, 1969.

SOUZA, A.P. de. **Atividade inseticida e modo de ação de extratos de meliáceas sobre Bemisia tabaci (Genn.; 1889) biótipo B**. 2004. 101f. Tese (Doutorado em Entomologia)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.

THOMAS, J.C.; ADAMS, D.G.; KEPPENE, V.D.; WASMANN, C.C.; BROWN, J.K.; KANOST, M.R.; BOHNERT, H.J. protease inhibitors of *Manduca sexta* expressed in transgenic cotton. **Plant Cell Reports**, Berlin, v.14, p.758-762, 1995.

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

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

TREMACOLDI, C.R.; PASCHOLATI, S.F. Inibidor de tripsina em raízes de *Eucalyptus urophylla*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.135-140, 2004.

VASCONCELOS, G.J.N.; GODIN JUNIOR, M.G.C.; BARROS, R. Extratos aquosos de *Leucaena leucocephala* e *Sterculia foetida* no controle de *Bemisia tabaci* biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.5, p.1353-1359, 2006.

VOLPICELLA, M.; LUIGI, R.C.; CORDEWENER, J.; AMERICA, T.;
GALLERANI, R.; BODE, W.; JONGSMA, M.A.; BEEKWILDER, J. Properties
of purified WAQUIL, J.M.; VILELLA, F.M.F. Gene bom. **Revista Cultivar**,
São Paulo, v.49, p.22-26, 2003.

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

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

ANEXOS

	Página
TABELA 1A. Resumo da análise de variância da duração da fase larval....	58
TABELA 2A. Resumo da análise de variância da duração da fase pupal ...	58
TABELA 3A. Resumo da análise de variância do consumo alimentar	58
TABELA 4A. Resumo da análise de variância do peso das fezes	59
TABELA 5A. Resumo da análise de variância da porcentagem de sobrevivência	59
TABELA 6A. . Resumo da análise de variância do peso das pupas	59

TABELA 1A. Resumo da análise de variância da duração da fase larval.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio
Concentração de inibidor	4	99.000000**
Erro	20	8.100000
Coeficiente de variação (%)	11,76	

** Teste de F significativo a 1% de probabilidade

TABELA 2A. Resumo da análise de variância da duração da fase pupal

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio
Concentração de inibidor	5	0.841580 NS
Erro	19	1.693395
Coeficiente de variação (%)	9,39	

NS: não significativo

TABELA 3A. Resumo da análise de variância do consumo alimentar

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio
Concentração de inibidor	5	0.178931 NS
Erro	18	0.100375
Coeficiente de variação (%)	6,13	

NS: não significativo

TABELA 4A. Resumo da análise de variância do peso das fezes

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio
Concentração de inibidor	5	0,021233 NS
Erro	19	0,016658
Coeficiente de variação (%)	11,90	

NS: não significativo

TABELA 5A. Resumo da análise de variância da porcentagem de sobrevivência

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio
Concentração de inibidor	4	427.822600
Erro	20	354.912000
Coeficiente de variação (%)	24.36	

* Teste de F significativo a 5% de probabilidade

TABELA 6A. Resumo da análise de variância do peso das pupas

Fonte de variação	Grau de liberdade	Quadrado médio
Concentração de inibidor	5	0.000168*
Erro	18	0.000235
Coeficiente de variação (%)	5,47	

* Teste de F significativo a 5% de probabilidade