



**VINICIUS DE OLIVEIRA RAMOS**

**ISOLAMENTO DE INIBIDORES DE TRIPISINA  
DE SEMENTES DE MAMONA E SUA AÇÃO  
SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE  
*Spodopterafrugiperda*(SMITH, 1797)**

**Lavras-MG  
2012**

**VINICIUS DE OLIVEIRA RAMOS**

**ISOLAMENTO DE INIBIDORES DE TRIPISINA DE SEMENTES DE  
MAMONA E SUA AÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE  
*Spodopterafrugiperda*(SMITH, 1797)**

Orientador

Prof. Dr. Custódio Donizete dos Santos

Co-orientador

Prof. Dr. Geraldo Andrade Carvalho

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Agroquímica para a obtenção do título de Mestre.

**LAVRAS-MG  
2012**

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

Ramos, Vinicius de Oliveira.

Isolamento de inibidores de tripsina de sementes de mamona e sua ação sobre o desenvolvimento de *Spodopterafrugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) / Vinicius de Oliveira Ramos. – Lavras : UFLA, 2012.

59 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: Custódio Donizete dos Santos.

Bibliografia.

1. *Ricinuscommunis*. 2. Inibidor de tripsina. 3. Controle biológico. 4. Insetos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.758

**VINICIUS DE OLIVEIRA RAMOS**

**ISOLAMENTO DE INIBIDORES DE TRIPISINA DE SEMENTES DE  
MAMONA E SUA AÇÃO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE  
*Spodopterafrugiperda*(SMITH, 1797**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Lavras, como parte das  
exigências do programa de pós-  
graduação em Agroquímica para a  
obtenção do título de Mestre.

**APROVADA EM 16 DE FEVEREIRO DE 2012**

Dra. Silvana Marcussi UFLA

Dr. Rogério Antônio Silva EPAMIG

Dr. Custódio Donizete dos Santos  
Orientador

Dr. Geraldo Andrade Carvalho  
Co-orientador

**LAVRAS-MG  
2012**

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

## AGRADECIMENTOS

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

Agradeço à UFLA, ao Departamento de Química pela oportunidade de cursar o mestrado, ao Departamento de Entomologia por permitir a utilização de seus laboratórios, assim como ao CNPq pela bolsa concedida.

Sem o apoio da minha família com certeza essa caminhada seria impossível, por isso agradeço José, meu pai, Patrícia, Alúzio e Walquíria, meus irmãos, minha tia Vitoria pelo apoio moral e força pra me manter no rumo mesmo quando tudo estava obscuro e minha avó Maria Nazaré.

Agradeço ainda aos velhos amigos que sempre estiveram dispostos a escutar as lamúrias desses tempos de muito estudo, principalmente Mariana e Daiane, por me lançarem nessa empreitada quase contra a minha vontade.

Assim como as pedras no caminho nos calejam para viagens mais longas, as belas paisagens nos ajudam a suportá-las, por isso agradeço aos novos amigos que aprenderam a suportar minhas manias e defeitos e também me ajudaram a concluir essa etapa: Lívia, Estela, Ana Paula, Anderson, Mayara, Natália, Samira, Tamara, Xulita, Dejane, Luciana, João, Valquíria, Jovane, Marcelo, Mariana, Rafaela, Lucas e tantos outros que me ajudaram.

Não tenho palavras para agradecer ao Professor Custódio Donizete dos Santos, que sempre teve uma palavra amiga, um conselho e um puxão de orelha para cada ocasião necessária.

Agradeço por fim ao Professor Geraldo Andrade Carvalho pelos ensinamentos e imprescindível orientação para a conclusão deste trabalho.

## RESUMO

Foram estudados os fatores que influenciam a extração e isolamento do inibidor da tripsina de *Spodopterafrugiperda* (Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) encontrado em sementes de mamona, além de avaliar o efeito do extrato aquoso de torta no desenvolvimento de *S. frugiperda*. Para isso os parâmetros: solvente, proporção (p/v), período de extração e teor de óleo foram avaliados, sendo que a água demonstrou maior capacidade na extração na proporção 1:40 durante 30 minutos utilizando torta de mamona com teor de óleo de 20%. No isolamento por cromatografia flash foi possível detectar picos com até 8906,12 mUTI/g<sub>fração</sub>, assim como inferir que o melhor eluente é uma mistura de acetato de etila com pequena porcentagem de etanol (<30%), porém estes picos apresentaram baixa resolução devido à formação de cauda. O extrato aquoso de torta de mamona com teor de óleo de 20% foi incorporado à dieta das larvas de *S. frugiperdana* concentração de 4000 ppme os parâmetros biológicos duração do período larval, peso da pupa, duração do período pupal, longevidade dos adultos, período de pré-oviposição, período de oviposição, quantidade de ovos produzidos por casal e concentração de proteínas nas fezes foram avaliados, sendo que houve redução no período de oviposição e aumento da concentração de proteínas nas fezes, com 20,55±3,73 dias e 177,70±16,90µmol de proteínas por grama de fezes para os insetos tratados com dieta testemunha e 15,67±4,82 dias e 215,61±24,82µmol de proteínas por grama de fezes para os insetos tratados com a dieta contendo o extrato aquoso de torta de mamona. O aumento na excreção de proteínas é um indicativo que o inibidor foi capaz de reduzir a absorção de resíduos de aminoácidos essenciais pelo inseto, porém não alterou significativamente o desenvolvimento de *S. frugiperda*.

Palavras-chave: *Ricinuscommunis*. *Spodopterafrugiperda*. Inibidor de tripsina. Controle biológico.

## ABSTRACT

The factors that influence the extraction and isolation of the trypsin inhibitor from *Spodoptera frugiperda* (Smith 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), found in castor beans, were studied, as well as the effect of the aqueous extract of the castor meal on the development of *S. frugiperda*. The following parameters were evaluated: solvent, proportion (w/v), extraction period and oil content, and the water showed a greater ability to extract in the proportion of 1:40 during 30 minutes, utilizing castor meal with an oil content of 20%. In the flash chromatography isolation, it was possible to detect peaks up to 8906,12 mUTI/g<sub>fraction</sub> of inhibition, as well as inferring that the best eluent is a mixture of ethyl acetate with a small percentage of ethanol (<30%). However these peaks had low resolution due to the formation of the tail. The aqueous extract of the castor meal with a 20% oil content was incorporated to the diet *S. frugiperda* larvae in a concentration of 4000 ppm and the biological parameters duration of larval period, larval mortality, weight of pupae, duration of pupal period, adult longevity, pre-oviposition period, oviposition period, number of eggs produced per couple, protein concentration in the feces were evaluated. There was a reduction in the oviposition period and an increase in the protein concentration in the feces, with 20,55±3,73 days and 177,70±16,90 µmol of protein per gram of feces for the insects fed control diet and 15,67±4,82 days and 215,61±24,82 µmol of protein per gram of feces for the insects fed the diet containing the aqueous extract of the castor meal. The increase in the excretion of proteins is an indicative that the inhibitor was able to reduce the absorption of essential amino acid residues by the insect. However, it did not significantly alter the development of *S. frugiperda*.

Keywords *Ricinus communis*. *Spodoptera frugiperda*. Trypsin inhibitor.  
Biological control.



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da dieta utilizada na criação de <i>S frugiperda</i>	34
Tabela 2 – Comparação da % de inibição e mUTI causadas por diferentes extratos	36
Tabela3– Parâmetros biológicos avaliados durante os estágios larval e pupal de <i>S. frugiperda</i> alimentada com dieta contendo extrato aquoso de torta de mamona	41
Tabela 4 – Parâmetros biológicos avaliados durante a fase adulta de <i>S. frugiperda</i> cuja larva foi alimentada com dieta contendo extrato aquoso de torta de mamona	42
Tabela 5 – Tabela de análise de variância para Meio extrator	57
Tabela 6 – Tabela de análise de variância para proporção do meio extrator	57
Tabela 7 – Tabela de análise de variância para período de extração	57
Tabela 8 – Tabela de análise de variância para teor de óleo	57
Tabela 9 – Tabela de análise de variância para duração do período larval	57
Tabela 10 – Tabela de análise de variância para concentração de proteínas nas fezes	58
Tabela 11 – Tabela de análise de variância para duração do período pupal	58
Tabela 12 – Tabela de análise de variância para peso pupal	58
Tabela 13 – Tabela de análise de variância para período de pré-oviposição	58
Tabela 14 – Tabela de análise de variância para longevidade da fêmea	58
Tabela 15 – Tabela de análise de variância para longevidade do macho	58
Tabela 16 – Tabela de análise de variância para período de oviposição	58
Tabela 17 – Tabela de análise de variância para número de ovos por casal	59

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fluxograma do preparo dos extratos aquosos, etanólicos, metanólico e de acetato de etila de semente e tortas com diferentes teores de óleo	30
Equação 1 – Equação para o cálculo da atividade inibitória de tripsina	32
Gráfico 1 – Análise de regressão do efeito da proporção de água utilizada na extração do inibidor da torta de mamona na inibição da atividade da tripsina de <i>S. frugiperda</i>	37
Gráfico 2 – Análise de regressão do efeito do período de extração do inibidor da torta de mamona na atividade inibitória de tripsina de <i>S. frugiperda</i>	38
Gráfico 3– Análise de regressão da inibição causada por extratos de tortas com diferentes teores de óleo <i>in vitro</i> .	38
Gráfico 4 – Cromatograma1. Detecção do inibidor via ensaio enzimático de inibição da tripsina de <i>S. frugiperda</i> . Amostra: 0,06 g/mL água destilada. Frações: 1-16 Acetato de etila; 17 Interfase; 18-25 Etanol; 26 Interfase; 27-35 Metanol	39
Gráfico 5 – Cromatograma2. Detecção do inibidor via ensaio enzimático de inibição de tripsina. Amostra: 0,01 g/mL água destilada. Frações:1-8 Acetato de etila;8 Interfase; 10-37 Etanol; 38 Interfase; 39-62 Metanol	40
Gráfico 6 – Cromatograma3. Detecção do inibidor via ensaio de inibição de tripsina. Amostra: 0,5 g/mL água destilada Frações: 1-6 Acetato de etila; 7 Interfase; 8-11 Ac. Etila/Etanol 70:30; 12 Interfase; 13-21 Ac. Etila/Etanol 30:70; 22 Interfase; 23-30 Etanol	41

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Ac0%</b>	Extrato acetato de etila de torta com 0% de óleo
<b>Et0%</b>	Extrato etanólico de torta com 0% de óleo
<b>Me %</b>	Extrato metanólico de torta com 0% de óleo
<b>Et<sub>sem</sub></b>	Extrato etanólico de sementes de mamona
<b>Aq<sub>sem</sub></b>	Extrato aquoso de sementes de mamona
<b>Aq20%</b>	Extrato aquoso de torta de mamona com 20% de óleo
<b>Aq26%</b>	Extrato aquoso de torta de mamona com 20% de óleo
<b>Aq30%</b>	Extrato aquoso de torta de mamona com 20% de óleo
<b>Aq34%</b>	Extrato aquoso de torta de mamona com 20% de óleo
<b>Aq41%</b>	Extrato aquoso de torta de mamona com 20% de óleo
<b>Aq45%</b>	Extrato aquoso de torta de mamona com 20% de óleo
<b>Aq48%</b>	Extrato aquoso de torta de mamona com 20% de óleo
<b>BApNA</b>	Cloridrato de N $\alpha$ -benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
<b>BSA</b>	Albumina de soro bovino
<b>Gli</b>	Glicina
<b>mUTI</b>	Mili unidades de tripsina inibida
<b>LVC50</b>	Concentração letal para 50% das larvas de <i>S. frugiperda</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>16</b>
2.1 Aspectos biológicos da lagarta-do-cartucho do milho, <i>S. frugiperda</i> .....	16
2.2 Interação inseto x planta.....	17
2.3 Produtos naturais no manejo de <i>S. frugiperda</i> .....	18
2.4 Inibidores de tripsina.....	20
2.5 Características gerais da mamona.....	22
2.6 Técnicas de extração.....	23
2.7 Técnicas cromatográficas.....	25
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
3.1 Preparo da amostra.....	27
3.2 Desengorduramento das sementes e preparo dos extratos de semente e tortas de mamona.....	27
.....	27
3.3 Ensaio enzimático cinético de inibição de tripsina.....	31

3.4 Fracionamento do extrato Aq20% por cromatografia flash de adsorção.....	32
3.5 Efeitos da adição do extrato Aq20% na alimentação de <i>S. frugiperda</i> sobre as diferentes fases de desenvolvimento do inseto.....	33
3.6 Análise estatística dos dados obtidos.....	35
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
4.1 Avaliação do efeito do solvente, proporção solvente/amostra, tempo e teor de óleo na extração do inibidor de tripsina de sementes de mamona.....	36
4.2 Fracionamento do extrato Aq20% por cromatografia flash de adsorção.....	39
4.3 Efeitos da adição do extrato Aq20% na alimentação de <i>S. frugiperda</i> sobre as diferentes fases de desenvolvimento do inseto.....	41
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
5.1 Avaliação do efeito do solvente, proporção solvente/amostra, tempo e teor de óleo na extração do inibidor de tripsina de sementes de mamona e fracionamento do extrato Aq20% por cromatografia flash de adsorção.....	43
5.2 Efeitos da adição do extrato Aq20% na alimentação de <i>S. frugiperda</i> sobre as diferentes fases de desenvolvimento do inseto.....	45
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>48</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>49</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>

**APÊNDICE A.....57**

## 1INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, os produtores de milho têm enfrentado dificuldades em combater uma das pragas que mais causa prejuízos a esta cultura, *Spodopterafrugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta-do-cartucho. Na Nicarágua, os danos causados pela lagarta de *S. frugiperda* variaram entre 15-73%, dependendo da quantidade de plantas infestadas e do estágio de desenvolvimento em que se encontravam (HRUSKAe GOULD, 1997). No Brasil as perdas podem chegar a 47,27% da produção de matéria seca e 54,49% no rendimento de grãos. O manejo adequado da praga na lavoura é crucial para redução desses danos (FIGUEIREDO et al., 2006; MENDEZ et al., 2002).

O controle da *S. frugiperda* tem sido frequentemente realizado por meio da aplicação de inseticidas, que geralmente causam desequilíbrios biológicos, intoxicação dos aplicadores e contaminação ambiental.

O uso de extratos vegetais visando o controle da lagarta-do-cartucho é considerado promissor, visto que as plantas se defendem do ataque de insetos e de outros organismos através de inúmeros mecanismos, dentre os quais se destacam a síntese e o acúmulo de proteínas de defesa tais como os inibidores de proteinases. Desde a descoberta dos inibidores de proteinases como agentes de defesa vegetal, inúmeras tentativas têm sido feitas para a sua utilização no melhoramento vegetal. (MOSOLOVe VALUEVA, 2008)

O efeito mais pronunciado destes inibidores é a formação de um complexo estável com as enzimas digestivas, limitando a hidrólise de aminoácidos e tornando-a extremamente lenta (JONGSMAe BEEKWILDER, 2011). Esse mecanismo interfere no desenvolvimento em função da deficiência de resíduos de aminoácidos essenciais disponíveis. O uso de inibidores de

proteases como meio de controle de *S. frugiperda* tem sido foco de diversos estudos, como os desenvolvidos por Brioschiet al(2007) e Paulillo et al (2000)

Os inibidores de tripsina descritos na literatura normalmente são de origem protéica, diferentemente do inibidor encontrado em folhas de mamona, uma molécula orgânica de certa polaridade com estrutura molecular ainda desconhecida. Os mecanismos de inibição para alguns inibidores protéicos já foram descritos, porém, ainda não se sabe ao certo como um inibidor não-protéico influencia na hidrólise enzimática. Entender como este mecanismo funciona pode ajudar no controle de diversas pragas de importância econômica(BENCHABANEet al., 2010; ROSSIet al, 2010).

Os prejuízos causados pela praga chave da cultura do milho, *S. frugiperda*, devido a sua adaptação aos inseticidas justifica a busca por novos métodos de controle, ainda mais se estes causarem menor impacto ao meio ambiente, por isso os objetivos neste trabalho foram isolar o inibidor de tripsina encontrado em sementes de mamona, utilizando para isto técnicas de extração e cromatografia flash e avaliar o efeito do extrato aquoso no desenvolvimento de *S. frugiperda*.



## **2REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Aspectos biológicos da lagarta-do-cartucho do milho, *S.frugiperda***

A lagarta-do-cartucho pode se alimentar de mais de 50 espécies vegetais distribuídas em 20 famílias. Mas possui preferência por certas plantas como sorgo, trigo, arroz e milho, sendo considerada praga chaveda cultura do milho (CRUZ, 2008)

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

As lagartas maiores, especialmente a partir do segundo instar, começam a migrar para outras plantas, por meio de um fio de teia que tecem e ou pela ação do vento. Geralmente, é encontrada apenas uma lagarta por cartucho, uma vez que esta espécie possui hábito canibal. Ao fim do período larval, com duração de 12 a 30 dias, as lagartas penetram no solo, onde se transformam em pupas de coloração avermelhada, medindo cerca de 15 mm de comprimento. O período pupal varia de 8 dias no verão a 25 dias no inverno (GALLO et al., 2002).

O adulto possui coloração geral acinzentada e aproximadamente 25 mm de envergadura. Após o acasalamento, a fêmea pode colocar até dois mil ovos agrupados em camadas com em média 100 ovos e a longevidade dos adultos é de aproximadamente 12 dias (GALLO et al., 2002; CRUZ, 2008).

## 2.2 Interação inseto x planta

Cerca de 70% das espécies animais pertencem à classe Insecta, sendo grande parte constituída de herbívoros. Desta forma, a sobrevivência das plantas frente a estes organismos depende diretamente da eficácia de seus mecanismos de defesa. As defesas físicas como espinhos e tricomas são evidentes, mas é a defesa química que representa o papel mais importante, através de um sistema complexo de ativação e produção de compostos tóxicos e repelentes que defendem a planta contra a herbivoria de insetos. Quando os insetos causam injúrias em uma parte específica da planta isto pode induzir a produção de inibidores de endopeptidases em várias partes do vegetal, os quais agem no sistema digestivo do inseto. Esse mecanismo é ativado pela sistemina, um fitohormônio que age sobre os genes produtores de inibidores de proteinases (LOPESet al., 2004).

Apesar das plantas apresentarem defesas químicas, os insetos conseguiram superá-las, devido à sua grande capacidade de adaptação. Por exemplo, a linamarina produzida pela mandioca, um glicosídeo cianogênico que quando é hidrolisado em meio ácido produz uma molécula de ácido cianídrico, que é letal mesmo em concentrações muito baixas, mas a lagarta de *Erinnysello* (praga da cultura da mandioca) não é afetada, pois seu intestino possui pH alcalino. Nestas condições ocorre a hidrólise da linamarina, porém há a formação do íon cianeto que é excretado pela lagarta (PAULILLO et al., 2000; SANTOS, FERREIRA e TERRA, 1983).

Um estudo abrangente avaliou a resistência de 12 genótipos de café ao bicho-mineiro-do-cafeeiro (*Leucoptera coffeella* Guérin-Méneville & Perrottet (Lepidoptera: Lyonetiidae), correlacionando-a com o conteúdo de alcalóides e compostos fenólicos da folha do café que, provavelmente, desempenham algum papel na interação entre o café e o bicho-mineiro. Alguns genótipos de café

(*Coffeacanephora* L. e *Coffea racemosa* Lour. e seus híbridos com *Coffea arabica* L.) causaram 100% de mortalidade ao bicho-mineiro, indicando a resistência do tipo antibiose, que é caracterizada pelo efeito antagonístico de interação entre inseto-planta, como o ocorrido neste caso. A infestação por *L. coffeella* leva a um declínio de quase quatro vezes nos níveis foliares de ácido clorogênico, que não afeta esta espécie de praga, mas pode afetar outras espécies generalistas, como é o caso da cochonilha verde *Coccus viridis* (Green) (Hemiptera: Coccidae). O ácido clorogênico pulverizado em folhas de café estimulou sua atividade locomotora, minimizando assim a sua alimentação, em contraste com a ausência deste polifenol. Portanto, a redução dos níveis de ácido clorogênico em folhas de café, devido à infestação de bicho-mineiro parece também favorecer a infestação por insetos generalistas (MAGALHÃES et al., 2010).

HARDKE et al. (2011) avaliaram a resistência de variedades de milho híbrido Bt expressando as proteínas inseticidas Cry1Ab e Cry1F. Para isso essas duas variedades mais uma variedade de milho comercial convencional foram infestadas com larvas de segundo instar de *S. frugiperda* e 14 dias após a infestação os danos causados pelos insetos foram avaliados. O desenvolvimento e sobrevivência de lagartas de terceiro instar foram comparados por ensaios de laboratório sem chance de escolha. Os resultados permitiram concluir que as variedades de milho Bt reduziram o crescimento, desenvolvimento e a sobrevivência do inseto, sendo que a variedade expressando Cry1F foi mais eficaz no controle de *S. frugiperda*.

### **2.3 Produtos naturais no manejo de *S. frugiperda***

O aumento da resistência de populações de lagarta-do-cartucho do milho aos inseticidas tem incentivado a procura por outros métodos de controle

eficientes e que possam ser utilizados em programas de manejo de pragas. As pesquisas a respeito do uso de produtos extraídos de plantas são promissoras, pois muitas vezes as substâncias tóxicas aos insetos alvos, podem se mostrar seletivas a organismos benéficos, o que aumenta a eficácia do controle.

Neste contexto, Tavares et al. (2009) avaliaram o efeito dos extratos de 12 espécies da família Asteraceae sobre ovos e lagartas de *S. frugiperda*. Os extratos de *Lychnophoraericoides* Mart e *Trichogoniavillosa* Sch. Bip. Former Baker reduziram a viabilidade em 97,7 % dos ovos. Três espécies, *Chromolaenachaseae* (B.L. Rob.) R.M. King & H. Rob, *Lychnophoraramosissima* Gardner e *Vernoniaholosericea* Mart apresentaram maior efeito no controle das lagartas. Das 12 asteráceas utilizadas no estudo, os autores sugeriram o uso preferencial de *V. holosericea* visto que seu extrato teve maior eficiência no controle de ovos e lagartas de *S. frugiperda*.

Santiago et al. (2008) verificaram os efeitos dos extratos aquosos de folhas e ramos de arruda (*Rutagraveolens* L.), folhas e ramos de melão-são-caetano (*Momordicacharantia* L.), folhas do alecrim-pimenta (*Lippiasidoideis* Cham.) e frutos verdes de mamona (*Ricinuscommunis* L.) na biologia da lagarta-do-cartucho do milho mantida em dieta artificial. Concluíram que o extrato aquoso do fruto verde de mamona provocou aumento na duração das fases larval e pupal e diminuiu o peso de pupa, o extrato aquoso de arruda reduziu o peso de pupas e a dieta contendo extrato de folhas e ramos de melão-são-caetano diminuiu a viabilidade larval e o peso de pupa. O extrato aquoso de alecrim-pimenta não afetou negativamente as fases larval e pupal, mas reduziu a postura e a viabilidade de ovos e aumentou a longevidade de adultos de *S. frugiperda*.

## 2.4 Inibidores de tripsina

Os inibidores de proteases são produzidos em várias espécies de plantas. Estes compostos atuam na regulação da proteólise, estoque de aminoácidos e defesa contra patógenos e pragas. Os inibidores das serino proteinases são os de maior abundância e variedade na natureza, sendo divididos em oito famílias: inibidores tipo Kunitz, inibidores tipo Bowman-Birk, inibidores da família da Batata I e II, inibidores de tripsina encontrados na família da abóbora (Cucurbitaceae), inibidores de tripsina e  $\alpha$ -amilase dos cereais, inibidores de tripsina encontrados em mostarda e a família das Serpinas (do inglês, Serpins: Serine Protease Inhibitors), enquanto há apenas uma família de inibidores para cisteino proteinases, que são as fitocistatinas (MOSOLOV e VALUEVA, 2005).

Os dois tipos de inibidores mais estudados são os pertencentes às famílias do tipo Kunitz e Bowman-Birk, ambos encontrados na soja. Os inibidores tipo Kunitz são caracterizados por possuir de 160 a 200 resíduos de aminoácidos, peso molecular em torno de 20 kDa e duas ligações dissulfeto. Já os inibidores tipo Bowman-Birk possuem aproximadamente 71 resíduos de aminoácidos, peso molecular em torno de 8kDa e sete ligações dissulfeto. Os inibidores de tripsina, quando presentes no intestino dos insetos, podem reduzir o seu desenvolvimento, e até mesmo levá-lo à morte. Isso se deve à redução da absorção dos aminoácidos ingeridos, ou ainda por dois mecanismos: 1) a superprodução da enzima digestiva inibida, buscando compensar a baixa atividade frente ao inibidor e 2) síntese de várias isoenzimas com o objetivo de que algumas sejam imunes ao inibidor. Ambos causam a redução de aminoácidos essenciais disponíveis ao desenvolvimento do inseto (PAULILLO et al., 2000).

Pesquisas realizadas com extratos de soja (*Glycinemax*) e feijão-alado (*Psophocarpustetragonolobus*) desproteínados com ácido tricloroacético a 16% (p/v) tiveram sua inibição de tripsina constatada, confirmando a presença de

inibidores não protéicos. A inibição correspondeu a 27-55% da atividade total de inibição de tripsina causada por soja e 5-14% da atividade total de inibição de tripsina causada por feijão-alado (HAFEZ e MOHAMED, 1983).

Algumas das moléculas com atividade inibitória de tripsina são compostos orgânicos sintéticos como, por exemplo, o fluoreto de 4-amidinofenilmetanosulfonila. Os inibidores não protéicos de tripsina encontrados em plantas são mais raros. Rossi et al. (2010) comprovaram que o inibidor de tripsina encontrado em folhas de *R. communis* é uma molécula não protéica (ESPIN e TUDELA, 1994). A caracterização do inibidor da tripsina de *S. frugiperda* encontrado em folhas de mamona como sendo não protéico foi confirmada com os seguintes testes. Os extratos foram fervidos por cinco minutos para avaliar a estabilidade do inibidor frente ao calor, contudo foi detectada a inibição de tripsina de *S. frugiperda*. Como os inibidores protéicos com alta porcentagem de ligações dissulfeto (tipo Bowman-Birk) são termo-resistentes os extratos foram fervidos por cinco minutos na presença de  $\beta$ -mercaptoetanol 0,2% para que houvesse a quebra destas ligações e mesmo assim a inibição da tripsina de *S. frugiperda* foi confirmada por Rossi (2007)

Seguindo esta mesma linha de pesquisa Carvalho (2009) realizou análises cromatográficas de extratos etanólicos de folhas de mamona visando purificar o inibidor de tripsina da lagarta-do-cartucho do milho, e também avaliar os seus efeitos quando aplicado à dieta das lagartas da espécie *S. frugiperda*. Os ensaios *in vivo* na concentração de 0,5% causaram aumento no período larval e diminuição no peso das pupas. Concluiu-se que o inibidor de tripsina possui grande polaridade, pois foi carregado pelos eluentes mais polares.

Brioschi et al. (2007) buscaram caracterizar a adaptação da lagarta-do-cartucho aos inibidores proteolíticos presentes em batata e soja. O uso dos inibidores induziu a expressão de uma grande variedade de isoenzimas, sendo algumas resistentes aos inibidores. Este mecanismo de defesa causa déficit no

desenvolvimento do inseto, pois reduz a quantidade de aminoácidos disponíveis para o seu crescimento, desviando-os para a produção de enzimas proteolíticas.

## **2.5 Características gerais da mamona**

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

A mamoneira é largamente difundida por todo o Brasil, apresentando grande adaptabilidade quanto a clima e solo. O óleo de mamona, também chamado de óleo de rícino pode ser extraído pela prensagem das sementes e contém até 90% de ácido graxo ricinoléico, o que confere ao óleo excelentes propriedades sintéticas devido a sua solubilidade em alcoóis, possibilitando ampla gama de utilização industrial. O principal emprego deste óleo é na lubrificação de motores de alta rotação, como os motores de aviões. No Brasil já é utilizado como matéria prima para produção de biodiesel. O óleo de rícino é usado, ainda, em diversas aplicações industriais como na fabricação de tintas, vernizes e plásticos, já a torta, subproduto da extração do óleo, é utilizada como adubo (RAMOS e WILHELM, 2005).

As sementes, em geral, apresentam uma composição química variável, dependendo de vários fatores, entre os quais, a espécie vegetal e a idade da planta. O processo mais utilizado para extração do óleo é a prensagem a frio, com rendimento entre 45 e 55% em massa. A produção nacional na safra 2011 foi de 128.430 toneladas de sementes, produzindo cerca de 65 mil toneladas de torta, utilizadas como adubo orgânico ou simplesmente descartadas, já que a sua

aplicação em rações é limitada pela presença de compostos tóxicos e alergênicos (IBGE, 2011; MELO et al., 2008a; MELO et al., 2008b; PUTTARAJ et al., 1994)

Os principais componentes tóxicos são: a ricina com massa molecular de 60 kDa (RCA 60), apontada como a proteína vegetal mais letal (principalmente para mamíferos) já encontrada; o alcalóidericinina, com efeitos tóxicos parecidos com os da ricina, porém em menor intensidade e finalmente o complexo alergênico, composto por polissacarídeos e proteínas de baixo peso molecular e é tóxico apenas para seres humanos, o que já chegou a inviabilizar pesquisas devido à sensibilização de quem as conduzia (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002; LEITE et al., 2005; MELO et al., 2008a; MACHADO et al., 2003)

A aglutinina de *R. communis* (RCA 120), é uma proteína com massa molecular de 120 kDa encontrada nas sementes. Seu uso foi testado na produção de colunas de cromatografia de afinidade como adsorvente para análise de oligossacarídeos, glicoproteínas e glicolipídeos. As colunas obtidas demonstraram durabilidade, reprodutibilidade e estabilidade à exposição térmica prolongada, tanto em sistemas de baixa pressão quanto em cromatografia líquida de alta eficiência (CARTELLIERI, HELMHOLZ e NIEMEYER, 2001).

## **2.6 Técnicas de extração**

Uma das metodologias utilizadas para extração de substâncias consiste em realizar a imersão da amostra do vegetal em solventes à temperatura ambiente por um período relativamente longo, começando com o solvente menos polar ao mais polar, realizando assim a extração estática e com isso os metabólitos são separados por ordem de polaridade. Apesar de simples esta técnica é extremamente eficaz, pois além de extrair, ainda agrupa diferentes compostos segundo sua afinidade pelo solvente. A hidrodestilação e a extração por arraste de vapor são recomendadas em extrações mais rápidas de compostos



com ponto de ebulição próximo à temperatura de decomposição. O princípio da destilação a vapor baseia-se no fato de que a pressão total de vapor de uma mistura de líquidos imiscíveis é igual à soma da pressão de vapor dos componentes puros individuais, também conhecida como Lei de Dalton. A pressão total de vapor da mistura torna-se igual à pressão atmosférica, e assim a mistura ferve numa temperatura menor que o ponto de ebulição de qualquer um dos componentes. Geralmente estes dois últimos métodos descritos são utilizados na extração de óleos essenciais (ONG, 2004).

A extração por prensagem a frio é utilizada para obtenção de produtos com ótima qualidade, geralmente com intuito de serem utilizados na fabricação de alimentos e medicamentos. Sua aplicação na extração de óleos essenciais da casca de frutos cítricos (KIRBAŞLAR, BOZ e KIRBAŞLAR, 2006), assim como no processo de extração de óleos fixos de diversos vegetais como o azeite de oliva, óleo de soja, óleo de rícino entre outros é bastante explorada (RAMOS e WILHELM, 2005).

Outros métodos incluem a extração exaustiva utilizando Soxhlet, método clássico e usado como referência na comparação com outros, mas muito demorado e dispendioso; a extração sônica, onde não há a necessidade de aquecimento da amostra; a extração por micro-ondas, que possui a vantagem de reduzir o tempo necessário e utilizar menor quantidade de solvente orgânico; a extração por fluido supercrítico, que utiliza CO<sub>2</sub> como meio extrator e é muito eficaz, porém tem custo elevado, e por fim, as extrações sob pressão, que podem ser estática, sob agitação e assistida por surfactante (ONG, 2004).

A extração de proteínas normalmente é feita utilizando meio aquoso com adição de tampões ou soluções salinas. Na extração de inibidores protéicos esta é a metodologia mais utilizada, como por exemplo o trabalho realizado por Klomklao et al. (2011) que buscou encontrar as condições ótimas de extração e purificação do inibidor de tripsina encontrado em sementes de

*Vignaradiata* (L) R. Wilczek, sendo que as melhores condições foram submeter a farinha desengordurada à extração com água destilada por duas horas. As condições de purificação utilizadas foram ferver o extrato por 10 minutos a 90°C seguido por precipitação com sulfato de amônio com saturação variando de 30 a 65% e por fim este foi filtrado em Sephadex G-50. Houve um rendimento de 30,25% com purificação de 13,51 vezes, o inibidor encontrado possui massa de 14 kDa e é termo resistente, mas não apresentou atividade inibitória após tratamento com o agente redutor  $\beta$ -mercaptoetanol.

Rossi et al. (2010) extraíram os inibidores de tripsina encontrados em folhas de mamona macerando-as e extraíndo com água destilada na proporção de 1:3 (p/v) a 4°C sob agitação por 30 minutos, o extrato foi então centrifugado e o sobrenadante utilizado nos ensaios de inibição. Carvalho (2009) extraiu os inibidores encontrados em folhas de mamona utilizando etanol em proporção 1:7 (p/v), sendo que o etanol permaneceu em contato com as folhas por 20 dias para então ser filtrado.

## **2.7 Técnicas cromatográficas**

Geralmente, num extrato vegetal há a presença de inúmeros compostos, os quais invariavelmente possuem características físico-químicas distintas (temperatura de ebulição e fusão, volatilidade, polaridade, hidrofobicidade, tamanho, entre outras) que permitem separá-los desde que utilizadas as técnicas adequadas.

As técnicas cromatográficas são as mais utilizadas para separação e em alguns casos na identificação de substâncias. Foram primeiramente utilizadas pelo botânico russo Mikhail Tswett para separar os pigmentos de plantas. Independentemente dos equipamentos utilizados, o princípio básico da cromatografia é a diferença da mobilidade dos componentes de uma mistura que

passam através de uma fase estacionária arrastados por uma fase móvel (HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009).

A cromatografia de adsorção em coluna com eluição pela força da gravidade é utilizada nas etapas preparatórias ou iniciais da purificação de um composto. Neste tipo de análise a coluna é preenchida com sílica como fase estacionária e os compostos presentes são separados pela sua polaridade relativa, sendo que os menos polares são eluídos primeiro e os mais polares por último (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006; HOLLER, SKOOG e CROUCH, 2009).

A cromatografia de adsorção foi utilizada por Rossi (2007) para purificar o inibidor de tripsina encontrado no extrato aquoso de folhas de mamona. Foi possível identificar dois picos com atividade inibitória de tripsina, um eluído por acetato de etila e o outro por etanol. Carvalho (2009) também utilizou esta metodologia buscando purificar o inibidor de tripsina, porém com extrato etanólico de folhas, sendo que apenas um pico de inibição foi detectado na fração eluída por etanol.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

Os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Bioquímica do Departamento de Química e de Manejo Integrado de Pragas do Departamento de Entomologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). As sementes de mamona foram fornecidas por técnicos do Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Lavras.

#### **3.1 Preparo da amostra**

As sementes foram limpas com água destilada e secas com papel toalha, além de sofrerem inspeção visual para remoção de eventuais contaminantes. Em seguida, as sementes foram colocadas em sacos de papel e estes foram armazenados em condições ambientes ( $19,8 \pm 2,64^\circ \text{C}$  e  $76,2 \pm 6,8\%$  de umidade relativa) até sua utilização nos experimentos.

#### **3.2 Desengorduramento das sementes e preparo dos extratos de semente e tortas de mamona**

As sementes foram trituradas em almofariz com auxílio de pistilo. Sete gramas deste material foram acondicionados em cartucho de papel, que foi posteriormente desengordurado com éter etílico trocado a cada hora para evitar sua saturação com o óleo, em Soxhlet modelo Tecnal TE 044. Foram produzidas tortas com teores de óleo de 0, 20, 26, 30, 34, 41, 45 e 48% em massa, para avaliação do seu efeito sobre a inibição de tripsina causada pelos extratos.

Os extratos foram obtidos usando duas metodologias sendo que a primeira consistiu na percolação por solvente estática por sete dias da torta com 0% de óleo na proporção 1:20 (p/v) utilizando acetato de etila. Após este período,

o extrato (Ac0%) foi filtrado e a torta remanescente sofreu nova extração em etanol (Et0%), todo o processo foi repetido com metanol (Me0%), gerando assim um gradiente de polaridade crescente na extração foram produzidos os extratos Ac0%, Et0% e Me0%. Os extratos obtidos tiveram seu solvente removido em roto-evaporador e o resíduo foi dissolvido em água para posterior análise da inibição de tripsina (Figura 1) (CARVALHO, 2009).

A segunda metodologia envolveu apenas a agitação da torta na presença do solvente, onde foram testados água destilada e etanol como meios de extração. Após a agitação a amostra foi centrifugada a 10.000x g e filtrada em papel filtro qualitativo (Figura 1).

O extrato etanólico de sementes (Et<sub>sem</sub>) foi obtido através de agitação orbital por 60 minutos na proporção de 1:80 (p/v) e esta mistura foi centrifugada e o sobrenadante filtrado com papel filtro; em seguida, foi concentrado em roto-evaporador e o resíduo obtido foi dissolvido em éter etílico na mesma proporção. Em funil de decantação foi realizada uma partição líquido/líquido sendo que o éter foi lavado com água destilada no dobro do volume utilizado na dissolução e a fração etérea foi descartada. Em seguida, a fração aquosa foi concentrada em roto-evaporador e o resíduo sólido foi dissolvido em 10 mL de etanol, sendo que este extrato foi utilizado nos testes *in vitro* de inibição de tripsina. O extrato aquoso de sementes (Aq<sub>sem</sub>) foi obtido agitando-se as sementes trituradas com água na proporção 1:40 (p/v) e esta mistura foi centrifugada e o sobrenadante filtrado com papel filtro (Figura 1).

Os extratos aquosos de tortas com 20, 26, 30, 34, 41, 45 e 48% de teor de óleo (extratos Aq20%, Aq26%, Aq30%, Aq34%, Aq41%, Aq45% e Aq48% respectivamente) tiveram seu potencial inibitório avaliado em ensaios *in vitro* de inibição da tripsina de *S. frugiperda* logo após serem obtidos. O extrato aquoso de torta com 20% de óleo (Aq20%) foi destinado aos ensaios biológicos e à purificação, foi seco em estufa à 45°C e o resíduo sólido teve sua atividade

inibitória de tripsina *in vitro* avaliada após dissolução de 2,5 mg/mL de água destilada. A escolha da utilização do extrato Aq20% baseou-se na confiabilidade das leituras de absorvância em experimentos preliminares, além de tornar possível o cálculo da concentração em massa/volume tanto para o preparo da dieta que foi fornecida às lagartas, quanto nas análises cromatográficas (Figura 1).

O extrato aquoso sofreu otimização no período de agitação e na proporção de solvente, sendo testados quatro períodos (30; 60; 90 e 120 minutos) e quatro proporções (1:10; 1:20; 1:30 e 1:40 p/v).

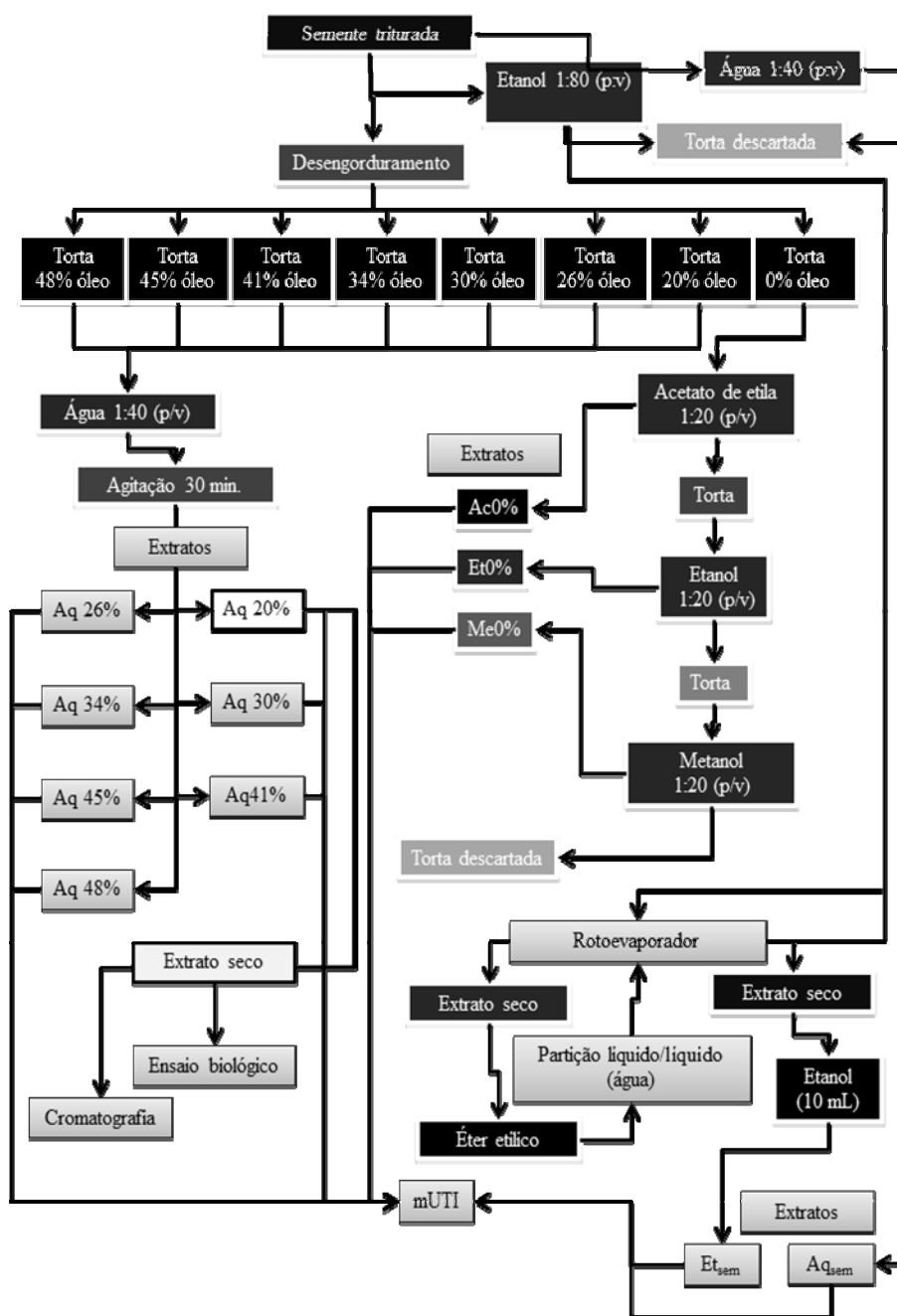


Figura 1 – Fluxograma do preparo dos extratos aquosos, etanólicos, metanólicos e de acetato de etila de semente e tortas com diferentes teores de óleo

### 3.3 Ensaio enzimático cinético de inibição de tripsina

Inicialmente, foi obtido um homogeneizado do tubo digestivo de *S. frugiperda* como fonte de tripsina. As lagartas de sexto instar fornecidas pelo Laboratório de Estudos de Seletividade foram imobilizadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos e seus tubos digestivos foram removidos com auxílio de pinça e tesoura, sendo macerado em homogeneizador tipo Potter na proporção de 1 tubo digestivo para 4 mL de água destilada a  $4^{\circ}\text{C}$ . O extrato bruto foi então filtrado em malha de nylon de  $100\ \mu\text{m}$  e centrifugado a  $10000\times g$  a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. O sobrenadante, considerado o extrato enzimático, foi então armazenado em freezer à  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização (ROSSI et al., 2010; CARVALHO, 2009).

O substrato utilizado nos ensaios de inibição de tripsina foi o cloridrato de  $N\alpha$ -Benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida (BAPNA) 1,25 mmol/L em tampão Gli-NaOH 0,1 M, pH 9,7. Para o preparo da solução, 54,5 mg de BAPNA foram solubilizados em 1,25 mL de dimetilsulfóxido e então completou-se até 100 mL com o tampão.

O ensaio foi realizado de forma cinética, com quatro períodos de reação: 30, 60, 90 e 120 minutos. Para cada ensaio de inibição, foram adicionados à mistura reacional 200  $\mu\text{l}$  dos diferentes extratos de semente e torta de mamona, 200  $\mu\text{l}$  da enzima convenientemente diluída (extrato enzimático) e 800  $\mu\text{l}$  da solução substrato, iniciando assim a reação. O ensaio controle foi feito sem o inibidor para que a reação ocorresse em velocidade máxima. A reação foi paralisada com 200  $\mu\text{l}$  de ácido acético 30% e a leitura da absorbância foi feita a 410 nm (ERLANGER et al., 1961).



O cálculo da UTI (Unidades de Tripsina Inibida) foi realizado utilizando a equação 1

$$UTI = \frac{I_c - I_i}{I_E} \quad (1)$$

Onde:

$I_c$  = Inclinação da reta do gráfico de absorbância x tempo (min.) do ensaio controle

$I_i$  = Inclinação da reta do gráfico de absorbância x tempo (min.) do ensaio de inibição

$I_E$  = Inclinação da reta obtida com o padrão de p-nitroanilida por Erlanger et al.(1961).

Salienta-se que 1 UTI corresponde a 1  $\mu$ mol de p-nitroanilida que deixa de ser produzido devido à presença do inibidor, sendo que os resultados neste trabalho foram expressos em mUTI por grama de semente nos procedimentos de extração e mUTI por grama de fração e por 200  $\mu$ l nos procedimentos cromatográficos de purificação.

### **3.4 Fracionamento do extrato Aq20% por cromatografia flash de adsorção**

Uma coluna de vidro com 50 cm de comprimento por 3 cm de diâmetro foi preenchida com sílica gel 60 Merck<sup>®</sup> misturada com clorofórmio. Foi calculado o volume útil de 247,4 cm<sup>3</sup> a contar da base da coluna, e a partir desse volume a massa de sílica calculada foi de 113,80 g, ao qual foi adicionado clorofórmio suficiente para que a mistura se tornasse fluida, sendo então vertida dentro da coluna, formando assim a fase estacionária.

O extrato Aq20% foi o utilizado para a purificação cromatográfica devido à confiabilidade de seus resultados preliminares. Como o detector foi o ensaio enzimático, foram necessárias três cromatografias buscando determinar a melhor concentração e melhores eluentes. O extrato foi diluído em água destilada e

submetido à cromatografia nas concentrações de 0,06; 0,01 e 0,5 g/mL de água destilada, sendo injetado 1 mL destas diluições.

As frações foram coletadas em frascos com capacidade para 100 mL, sendo concentradas em roto-evaporador e transferidas para frascos com capacidade de 15 mL. O solvente remanescente foi evaporado em estufa à 45°C. O resíduo foi dissolvido em 2 mL de água destilada em agitador orbital por uma hora. A detecção foi realizada por um ensaio enzimático de inibição em todas as frações obtidas nas três cromatografias realizadas.

As duas primeiras cromatografias em apresentaram o pico de inibição de tripsina na mesma interfase acetato de etila/etanol mesmo com concentrações de amostra e volume de eluente diferentes, indicando que a faixa de melhor eluição, seria uma mistura de acetato de etila/etanol. Na terceira cromatografia foi realizada uma corrida com a amostra na concentração de 0,5 g/mL e eluída com a seguinte série eluotrópica: acetato de etila; solução de acetato de etila/etanol na proporção de 70:30; solução de acetato de etila/etanol na proporção de 30:70, e por fim etanol puro.

### **3.5 Efeitos da adição do extrato Aq20% na alimentação de *S. frugiperda* sobre as diferentes fases de desenvolvimento do inseto**

Lagartas de segundo instar de *S. frugiperda* provenientes de criação de laboratório foram transferidas para tubos de vidro (10 cm de altura x 3 cm de diâmetro) na proporção de uma lagarta por recipiente, contendo a dieta alimentar preparada conforme metodologia de Kasten-Junior et al. (1978) (Tabela 1). O bioensaio foi constituído por um tratamento testemunha contendo água destilada e um tratamento contendo o extrato aquoso de torta de mamona na concentração de 4000 ppm.

Tabela 1 – Composição da dieta utilizada na criação de *S frugiperda*

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

<sup>1</sup>Extraído de Karsten-Junior et al. (1978)

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

Este valor foi utilizado por estar entre 1600 e 9600ppm do extrato metanólico de sementes utilizado por Ramos-Lopez et al. (2010), sendo que a 9600 ppm todas as larvas morreram.

No tratamento testemunha 270 mL da dieta foram acrescidos de 30 mL de água e no tratamento com o extrato de torta de mamona foram adicionados 30 mL do extrato Aq20%, cuja concentração final na dieta foi de 4000 ppm.

A concentração de proteínas nas fezes das lagartas de *S. frugiperda* foi determinada com base na metodologia desenvolvida por Bradford (1976), em que 45mg das fezes coletadas após o término do período larval foram pesadas e a estas foram adicionados 200 µL de água destilada e 200 µL de ácido perclórico 1M. Essa mistura foi homogeneizada e colocada em banho de gelo por 10 minutos. Centrifugaram-se as amostras e desprezou-se o sobrenadante. O precipitado foi ressuspensão em 200 µL de NaOH 0,1M 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.

O delineamento foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos de 72 repetições (cada repetição constituída de 1 lagarta). Avaliou-se a duração do período larval, peso da pupa, duração do período pupal, concentração de proteínas nas fezes, longevidade dos adultos, período de pré-oviposição, período de oviposição e quantidade de ovos produzidos por casal.

### **3.6 Análise estatística dos dados obtidos**

Foi realizada análise de variância dos dados obtidos na escolha do solvente para extração do inibidor de tripsina encontrado em mamona, duração do período larval, concentração de proteínas nas fezes, duração do período pupal, peso pupal, período de pré-oviposição, longevidade da fêmea, longevidade do macho, período de oviposição e quantidade de ovos por casal e suas médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância (ANEXO A). Os dados relativos à escolha da proporção de água, tempo de extração e teor de óleo na extração do inibidor de tripsina encontrado em mamona passaram por análise de variância e suas médias sofreram análise de regressão (ANEXO A). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software R (TEAM, 2011).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliação do efeito do solvente, proporção solvente/amostra, tempo e teor de óleo na extração do inibidor de tripsina de sementes de mamona

Observou-se inibição de tripsina de *S. frugiperda* causada pelos extratos Aq20% e Et<sub>sem</sub>, sendo que a maior inibição obtida foi pelo extrato Aq20% (Tabela 2).

Tabela 2 – Comparação da % de inibição e mUTI causadas por diferentes extratos

Extratos	% de inibição de tripsina	mUTI <sup>1</sup>
Ac0%	10,53 ± 2,40a	
Et0%	6,31 ± 0,90 a	
Me0%	8,77 ± 0,88a	
Aq20%	40,44 ± 3,94b	21,23 ± 2,07A
Aq <sub>sem</sub>	-	
Et <sub>sem</sub>	65,76 ± 6,97c	6,90 ± 0,73B
F = 61,63; p ≤ 5,22 x 10 <sup>-7</sup>		F = 27,63; p ≤ 0,01

Médias mais ou menos desvio padrão seguidas de mesma letra em cada coluna não diferem estatisticamente entre si a 5% de significância segundo o teste de Scott-Knott.

<sup>1</sup>Expresso em mUTI/g de sementes

Ac0% – extrato acetato de etila de torta 0% de óleo. Et0% – extrato etanólico de torta 0% de óleo. Me0% – extrato metanólico de torta 0% de óleo. Aq20% – extrato aquoso de torta 20% de óleo. Aq<sub>sem</sub> – extrato aquoso de sementes trituradas. Et<sub>sem</sub> – extrato etanólico de sementes trituradas.

Em se tratando de ensaios enzimáticos, a faixa aceitável de porcentagem para o cálculo da UTI deve variar entre 80 e 40%. Valores acima podem estar sendo mascarados, ou seja, a inibição é maior do que a observada; e valores menores podem ser devido a erros durante o ensaio e por isso, apenas para Aq20% e Et<sub>sem</sub> foi realizado o cálculo para encontrar a UTI.

Os extratos Ac0%, Et0%, Me0% não apresentaram inibição de tripsina de forma significativa, entretanto, o extrato Et<sub>sem</sub> foi capaz de inibir a tripsina da lagarta do cartucho. Não foi possível avaliar se o extrato Aq<sub>sem</sub> causou algum tipo

de inibição, pois a mistura reacional se tornou turva devido à presença do óleo impedindo a leitura em espectrofotômetro.

Das proporções avaliadas (resultados não apresentados), apenas 1:10, 1:20, 1:30 e 1:40 causaram inibição significativa, sendo constatado um aumento linear na inibição de tripsina de *S. frugiperda* até a proporção 1:40 (p/v) (Gráfico 1).

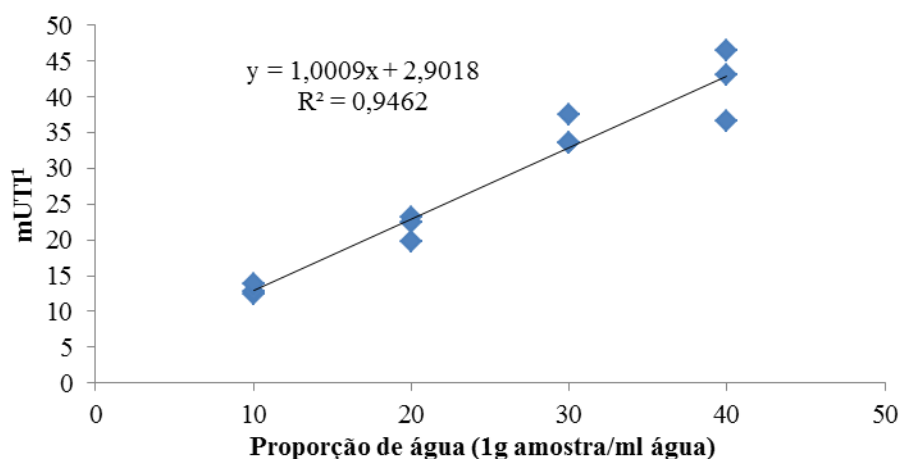


Gráfico 1 – Análise de regressão do efeito da proporção de água utilizada na extração do inibidor da torta de mamona na inibida atividade da tripsina de *S. frugiperda*.  $F = 175,87$ ;  $p \leq 1,135 \times 10^{-7}$ .

<sup>1</sup>Expresso em mUTI/g de sementes

Referente ao período de extração do inibidor não foi observada linearidade nos resultados (Gráfico 2). Entre os períodos de extração testados não houve aumento ou diminuição da inibição de tripsina causada pelos extratos de torta de mamona.

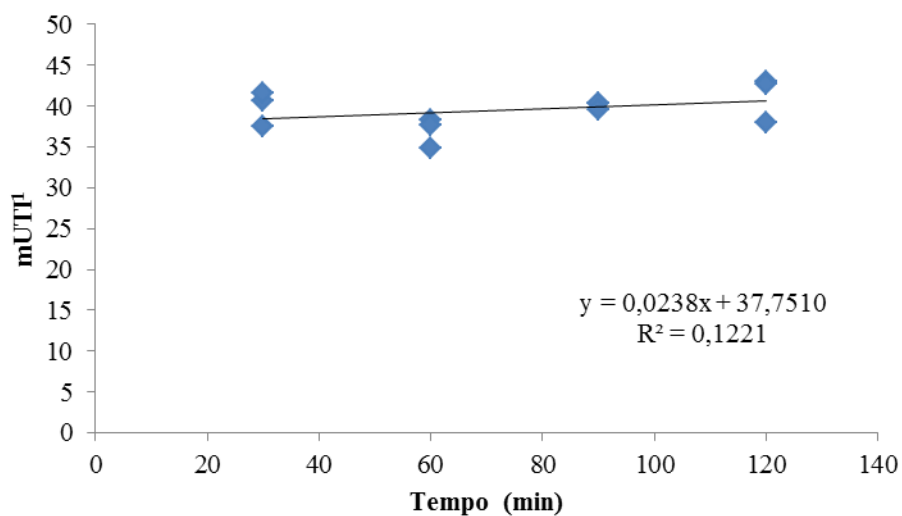


Gráfico 2 –Análise de regressão do efeito do período de extração do inibidor da torta de mamona na atividade inibitória de tripsina de *S. frugiperda*.  $F = 1.5425$ ;  $p \leq 0.2426$   
<sup>1</sup>Expresso em mUTI/g de sementes

Observou-se que o teor de óleo na tortacausou aumento na inibição proporcionalmente ao seu aumento (Gráfico 3).

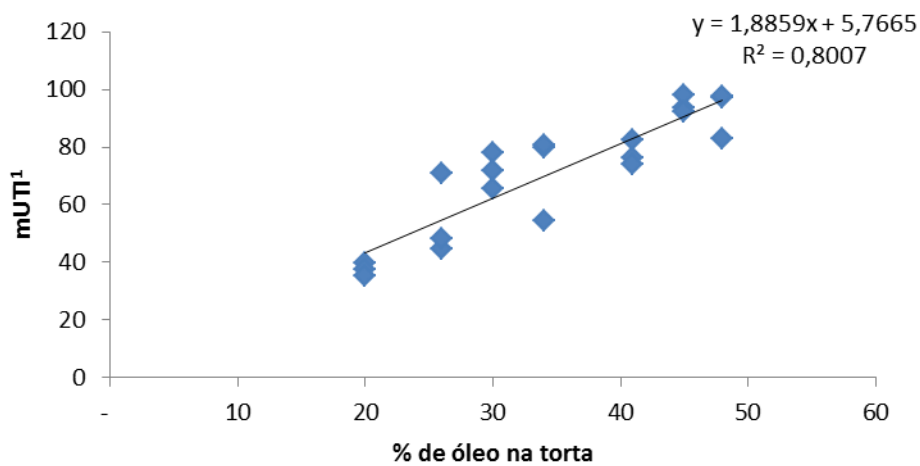


Gráfico 3–Análise de regressão da inibição causada pelos extratos Aq20%, Aq26%, Aq30%, Aq34%, Aq41%, Aq45% e Aq48% *in vitro*.  $F = 76,33$ ;  $p \leq 4,42 \times 10^{-8}$

<sup>1</sup>Expresso em mUTI/g de sementes

#### 4.2 Fracionamento do extrato Aq20% por cromatografia flash de adsorção

O extrato Aq20% antes de ser submetido à cromatografia apresentou 795,20mUTI/g<sub>extrato</sub>. Os eluentes utilizados foram: acetato de etila, etanol e metanol em ordem crescente de polaridade. O extrato foi solubilizado em água destilada na concentração de 0,06g/mL para a primeira cromatografia.

Através do ensaio enzimático realizado nas frações, foi possível observar que o inibidor começou a ser eluído a partir da fração 17, correspondente à interfase acetato de etila/etanol. A atividade inibitória para este pico foi de 66,80mUTI/g<sub>fração</sub> (Gráfico 4).

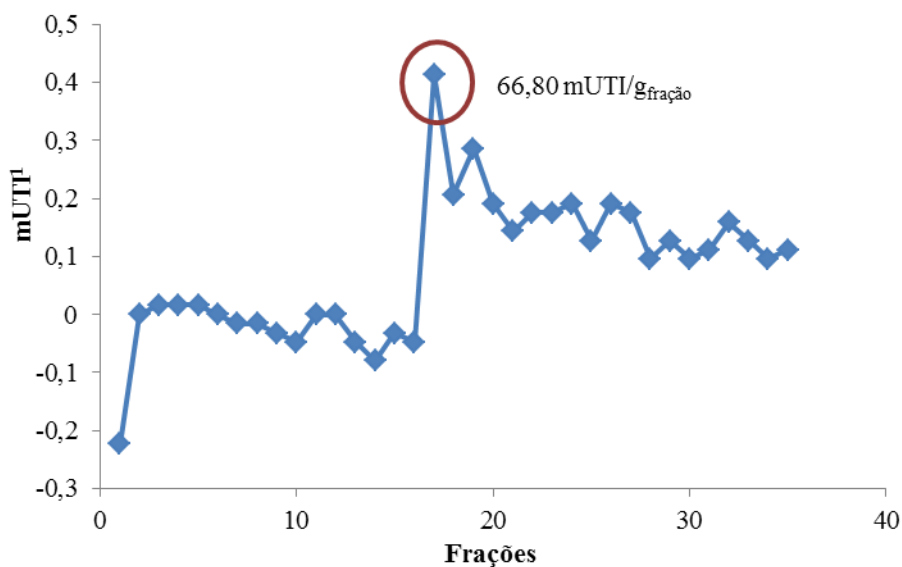


Gráfico 4 –Cromatograma 1. Detecção do inibidor via ensaio enzimático de inibição da tripsina de *S. frugiperda*. Amostra: 0,06 g/mL água destilada. Frações: 1-16 Acetato de etila; 17 Interfase; 18-25Etanol; 26 Interfase; 27-35Metanol.

<sup>1</sup> Expresso em mUTI/200µL de fração ressuspensa conforme sub-item3.5



Observou-se a formação de cauda na curva cromatográfica, indicando possibilidade da amostra estar muito concentrada, e por isto foi então realizada uma nova cromatografia na concentração 0,01g/mL de extrato (Gráfico 5).

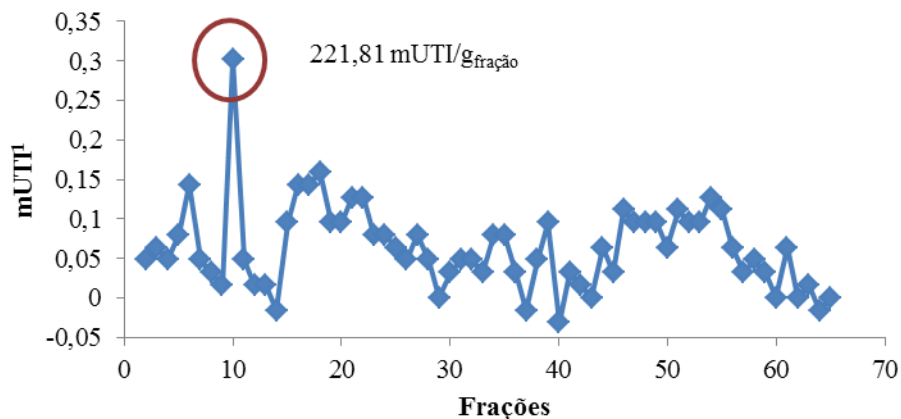


Gráfico 5 –Cromatograma 2. Detecção do inibidor via ensaio enzimático de inibição de tripsina. Amostra: 0,01 g/mL água destilada. Frações:1-8Acetato de etila;8 Interfase; 10-37Etanol; 38 Interfase; 39-62Metanol.

<sup>1</sup> Expresso em mUTI/200 $\mu$ L de fração ressuspensa conforme sub-item 3.5

A cromatografia realizada nas condições descritas na figura 6 apresentou variação na linha base, sendo possível observar um pico na fração 10 com atividade inibitória de tripsina de 221,81mUTI/g<sub>fração</sub>, correspondente à interfase acetato de etila/etanol.

As frações 5-11 correspondem ao pico de maior atividade inibitória de tripsinana terceira cromatografia com 8906,12 mUTI/g<sub>fração</sub>. O extrato foi aplicado à coluna na concentração de 0,5 g/mL de água, sendo que o inibidor foi eluído pela interfase formada entre acetato de etila e a solução acetato de etila/etanol na proporção 70:30 (Gráfico 6).

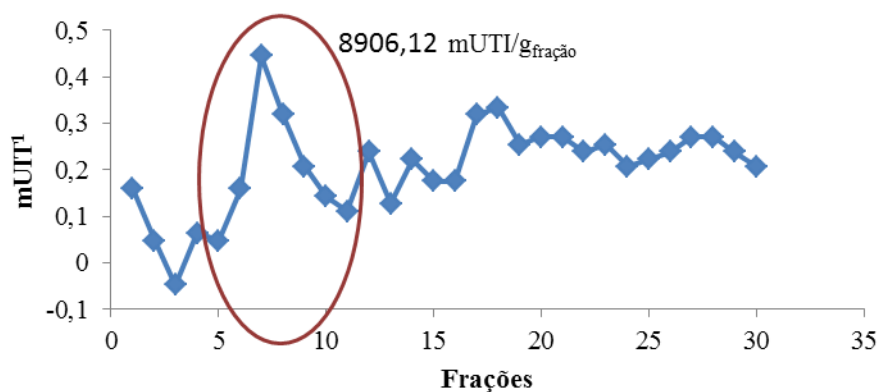


Gráfico 6 –Cromatograma3. Detecção do inibidor via ensaio de inibição de tripsina. Amostra: 0,5 g/mL água destilada Frações: 1-6 Acetato de etila; 7 Interfase; 8-11 Ac. Etila/Etanol 70:30; 12 Interfase; 13-21 Ac. Etila/Etanol 30:70; 22 Interfase; 23-30 Etanol.  
<sup>1</sup> Expresso em mUTI/200 $\mu$ L de fração ressuspensa conforme sub-item 3.5

#### 4.3 Efeitos da adição do extrato Aq20% na alimentação de *S. frugiperda* sobre as diferentes fases de desenvolvimento do inseto

Constatou-se que as lagartas que foram alimentadas com dieta contendo o inibidor de tripsina excretaram maior quantidade de proteínas, com média de  $215,61 \pm 24,82$  micromol por grama de fezes ( $F = 7,9729$ ;  $p = 0,0224$ ). Nos demais parâmetros biológicos não ocorreu influência negativa do inibidor de tripsina (Tabela3).

Tabela 3– Parâmetros biológicos avaliados durante os estágios larval e pupal de *S. frugiperda* alimentada com dieta contendo extrato aquoso de torta de mamona.

Tratamento	Duração período larval (dias)	[ ] Proteínas Fezes ( $\mu$ mol/g)	Duração período pupal (dias)	Peso pupal (g)
Controle	$21,44 \pm 6,35^a$	$177,70 \pm 16,90^b$	$12,73 \pm 2,43^a$	$0,2782 \pm 0,03^a$
4000ppm	$21,25 \pm 4,08^a$	$215,61 \pm 24,82^a$	$12,66 \pm 2,38^a$	$0,2813 \pm 0,03^a$
F	0,05	7,97	0,03	0,29
p $\leq$	0,83	0,02	0,87	0,59

Médias seguidas da mesma letra na coluna não apresentam diferença estatística a 5% de significância segundo o teste de Scott-Knott

Os insetos adultos advindos de larvas que foram alimentadas com dieta contendo o inibidor tiveram o período de oviposição reduzido. Entretanto, o período de pré-oviposição, longevidade e fecundidade não foram afetados negativamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros biológicos avaliados durante a fase adulta de *S. frugiperda* cuja larva foi alimentada com dieta contendo extrato aquoso de torta de mamona.

Tratamento	Período de pré-oviposição (dias)	Longevidade fêmea (dias)	Longevidade macho (dias)	Período de oviposição (dias)	Quantidade de ovos (média/casal)
Controle	4,64±2,29a	20,27±4,22a	18,27±4,29a	20,55±3,73a	1890,00±665,12a
4000ppm	5,00±2,55a	18,33±5,66a	15,78±6,10a	15,67±4,82b	1691,11±721,27a
F	0,11	0,88	1,15	6,53	0,41
p	0,74	0,36	0,30	0,02	0,53

Médias seguidas da mesma letra na coluna não apresentam diferença estatística a 5% de confiança segundo o teste de Scott-Knott

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação do efeito do solvente, proporção solvente/amostra, tempo e teor de óleo na extração do inibidor de tripsina de sementes de mamona e fracionamento do extrato Aq20% por cromatografia flash de adsorção

A maior parte dos inibidores de tripsina descritos na literatura são protéicos e sua extração é realizada por meio do uso de soluções salinas ou tampões devido a sua eficácia na solubilização de proteínas. A purificação destes inibidores protéicos da mesma forma é efetuada por técnicas como centrifugação, precipitação por sulfato de amônio, precipitação por acetona -20° C e cromatografia de afinidade, que são as mais comuns para este tipo de molécula (BENJAKUL, et al., 2000; TSYBINA, et al., 2001; CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002; BRIOSCHI, et al., 2007; ZOU, et al., 2008).

Em trabalhos de identificação de compostos é comum a extração por solventes com polaridade crescente, visando o agrupamento de substâncias com características semelhantes para facilitar a futura identificação dos compostos, por isso utilizou-se inicialmente este método de extração na torta de mamona com 0% de óleo no presente estudo, Carvalho (2009) conseguiu obter o inibidor de folhas utilizando esta metodologia com modificações. Não foi detectada nenhuma inibição de tripsina significativa nos extratos Ac0%, Et0% e Me0% avaliados neste trabalho. A presença do inibidor de tripsina em sementes e torta de mamona foi confirmada no extrato aquoso de torta contendo 20% de óleo e no extrato etanólico de sementes cujo óleo foi removido por partição com éter etílico.

O teor de óleo na torta de mamona teve influência na extração do inibidor de tripsina, sendo que quanto maior o teor, maior a atividade inibitória de tripsina. Os extratos utilizados neste experimento foram todos aquosos,

portanto o óleo não pode ser o responsável pela inibição devido a sua insolubilidade em água, tendo em vista isso, a relação linear entre teor de óleo/inibição de tripsina pode ser explicada pelo tempo de desengorduramento necessário para a produção das tortas de mamona, pois quanto maior o tempo de extração do óleo (portanto menor teor de óleo), menor a inibição. Este fato sugere que esta molécula capaz de inibir a tripsina de *S. frugiperda* pode ser uma molécula orgânica, pois mesmo com sua afinidade por solventes polares em sua extração, também possui certa afinidade com solventes apolares necessários ao desengorduramento, além de explicar a ausência de inibição nos extratos Ac0%, Et0% e Me0% devido ao uso da torta com nenhum óleo na extração do inibidor de tripsina.

Mesmo com todas estas evidências, a possibilidade de que essa molécula possa ser uma lipoproteína existe, contudo, o fato da atividade inibitória permanecer inalterada quando Rossi (2007) tratou o extrato com  $\beta$ -mercaptoetanol indica que essa molécula não é uma protéica.

Quando submetida a diferentes condições de extração, a atividade inibitória de tripsina da torta com 20% de óleo apresentou correlação positiva com o aumento da proporção de água na extração até a 1:40 (p/v). O aumento na inibição de tripsina pode ser explicado pela maior disponibilidade de água durante a extração, já em proporções maiores o efeito de diluição foi predominante e não causou inibição significativa de tripsina (resultados não apresentados)

Carvalho (2009) realizou uma análise cromatográfica no extrato etanólico de folhas de mamona e a fração com maior atividade inibitória recuperada foi eluída pela fase móvel etanólica, com 2100 mUTI/g<sub>extrato</sub>. Neste trabalho, a atividade do extrato Aq20% antes de ser purificado foi de 795,2 mUTI/g<sub>extrato</sub>, e a maior atividade inibitória foi obtida no pico correspondente às frações 5-11 da cromatografia 3 (Figura 7) com 8906,1200 mUTI/g<sub>fração</sub>. Esta

atividade inibitória recuperada provavelmente se deve à otimização da fase móvel com menor concentração de etanol que pode ter eluído o inibidor de tripsina de forma mais eficaz.

Contudo, não foi possível converter este valor para  $mUTI/g_{\text{extrato}}$ , pois uma parte da amostra aplicada foi adsorvida irreversivelmente pela coluna e por isso a comparação com o trabalho realizado por Carvalho (2009) não pode ser feita. Em todas as corridas efetuadas foi possível observar a presença de picos de inibição, porém nos parâmetros utilizados para as corridas cromatográficas não foi possível obter um pico de inibição definido. Observou-se que o inibidor é eluído por pequena porcentagem de etanol em acetato de etila.

## **5.2 Efeitos da adição do extrato Aq20% na alimentação de *S. frugiperda* sobre as diferentes fases de desenvolvimento do inseto**

Sabe-se que os insetos têm mecanismos de defesa contra os metabólitos secundários produzidos pelas plantas. Em se tratando de inibidores da digestão, dois mecanismos são os mais comuns, o primeiro envolve a super-expressão da protease inibida, buscando aumentar sua atividade frente ao inibidor; já no segundo várias isoenzimas são sintetizadas com o objetivo de que algumas não sejam inibidas. Ambos desviam os aminoácidos essenciais ao crescimento para a síntese das enzimas digestivas, causando assim um déficit no desenvolvimento. Por isso é necessário ensaio *in vivo* além da detecção de inibição de tripsina *in vitro*, visto que a interação planta-inseto é de natureza muito mais complexa que as condições de laboratório (PAULILLO et al., 2000; BRIOSCHI et al., 2007).

Os resultados obtidos por Ramos-Lopez et al. (2010) apresentaram diferenças na duração larval, viabilidade larval e pupal e peso pupal dos insetos tratados com o extrato metanólico de sementes de mamona quando comparados com os insetos tratados sem o extrato. Houve aumento na duração larval

(conhecido como inibição no crescimento), assim como redução do peso pupal (também chamado de inibição de alimentação) e da viabilidade larval e pupal na concentração de 1600 ppm, sendo que na concentração de 9600 ppm nenhum inseto sobreviveu.

Ramos-Lopez et al. (2010) concluíram que a redução no desenvolvimento da lagarta do cartucho foi provocada por dois compostos presentes em mamona: a ricinina, um alcalóide tóxico e o óleo de rícino. Comparando a  $LVC_{50}$  (concentração letal para 50% das larvas de *S. frugiperda*) dos extratos hexânico, metanólico, acetato de etila de folhas e sementes e a ricinina e o óleo de rícino purificados. O efeito tóxico foi atribuído principalmente à ricinina com  $LVC_{50}$  de 380 ppm. Este composto é encontrado em maior quantidade nas sementes e possui características polares. Os extratos apresentaram um padrão de redução da  $LVC_{50}$ , quanto maior a polaridade do solvente, menor a  $LVC_{50}$ , sendo que os menores valores foram obtidos nos extratos de sementes quando comparados com os de folhas (RAMOS-LOPEZ et al., 2010).

Como no presente trabalho a semente foi desengordurada antes de se extrair o inibidor com água, a ricinina pode ter sido extraída também, implicando que mesmo na concentração de 4000 ppm foram causadas pequenas alterações no desenvolvimento dos insetos tratados.

O efeito subletal do extrato Aq20% somado ao aumento da concentração de proteínas solúveis nas fezes poderia ser um indicativo que o inibidor seja a ricinina se os demais parâmetros de desenvolvimento avaliados tivessem sido alterados. Sabe-se que a ricinina é um alcalóide polar e que geralmente não é extraído juntamente com óleo de rícino (FERRAZ et al., 1999), contudo, é provável que a ricinina não esteja presente no extrato Aq20% obtido neste estudo, pois não causou efeitos negativos ao desenvolvimento da lagarta-do-cartucho. Isto indica que a ricinina não é o composto responsável pela inibição de tripsina de *S. frugiperda*.

A falta de alterações no desenvolvimento da lagarta-do-cartucho causados pela redução da absorção de aminoácidos provavelmente se deve ao uso do extrato Aq20%, onde o inibidor se encontra em baixa concentração, o que não aconteceu com os insetos tratados com dieta contendo a fração purificada a partir do extrato etanólico de folhas de mamona utilizado por Carvalho (2009), cujo desenvolvimento dos insetos foi afetado de forma significativa.



## CONCLUSÕES

Foi confirmada a presença de atividade inibitória da tripsina de *S. frugiperda* nas sementes de mamona.

A torta de mamona desengordurada com 20% de óleo se mostrou a fonte mais confiável para a detecção do inibidor de tripsina.

As melhores condições de extração para este inibidor de tripsina foram o meio extrator aquoso na proporção 1:40 (p/v) por 30 minutos.

Foi possível detectar a presença de picos de inibição de tripsina nas cromatografias realizadas, assim como determinar que o inibidor de tripsina é eluído por uma fase composta de acetato de etila/etanol com proporção menor que 30% para este último eluente portanto este é um método de purificação viável para as etapas iniciais de identificação deste composto.

A dieta acrescida com o estrato Aq20% causou aumento na excreção de proteínas por larvas de *S. frugiperda*, mas na concentração de 4000 ppm não foi capaz de alterar seu desenvolvimento.

A ricinina não é o composto responsável por causar a inibição da tripsina da lagarta-do-cartucho.

## **7 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Tendo em vista que o inibidor de tripsina encontrado em mamona também pode ser extraído das folhas, o uso de sementes ou de torta ainda não é viável devido à dificuldade de extração observada para essa fonte. O desenvolvimento de outras metodologias de extração que consigam remover o óleo, que causa interferência na detecção e na purificação, sem que haja perda nem degradação do inibidor de tripsina como a utilização de torta de mamona oriunda de unidades de produção de óleo ou a saponificação são alguns dos caminhos, pois há grande disponibilidade de torta e essa fonte de um potencial composto inseticida não pode ser descartada sem maiores estudos.

## REFERÊNCIAS

BENCHABANE, M. et al. Plant cystatins. **Biochimie**, [S. l.: s. n.], v. 92, n. 11, p. 1657-1666, 2010.

BENJAKUL, S.; VISESSANGUAN, W.; THUMMARATWASIK, P. Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some Thai legume seeds. **Journal of Food Biochemistry**, [S. l.: s. n.], v. 24, n. 2, p. 107-127, 2000.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S. l.: s. n.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976

BRIOSCHI, D. et al. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.: s. n.], v. 37, n. 12, p. 1283-1290, 2007.

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

CARTELLIERI, S.; HELMHOLZ, H.; NIEMEYER, B. Preparation and evaluation of *Ricinus communis* agglutinin affinity adsorbents using polymeric supports. **Analytical Biochemistry**, [S. l.: s. n.], v. 295, n. 1, p. 66-75, 2001.

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

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas: UNICAMP, 2006.

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

FIGUEIREDO, M. D. L. C.; MARTINS-DIAS, A. M. P.; CRUZ, I. Relationship between fall armyworm and their natural biological control agents in the maize crop. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, [S. l.: s. n.], v. 41, n. 12, p. 1693-1698, 2006.

CRUZ, I. **Manual de identificação de pragas do milho e seus principais agentes de controle biológico.** Brasília: Embrapa, 2008.

ERLANGER, B. F.; COHEN, W.; KOKOWSKY, N. Preparation and properties of 2 new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.: s. n.], v. 95, n. 2, 1961.

ESPIN, J. C.; TUDELA, J. Experimental approach to the kinetic-study of unstable site-directed irreversible inhibitors - kinetic origin of the apparent positive cooperativity arising from inactivation of trypsin by p-amidinophenylmethanesulphonyl fluoride. **Biochemical Journal**, [S. l.: s. n.], v. 299, n. 1, p. 29-35, 1994.

GALLO, D. et al. **Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002.

HAFEZ, Y. S.; MOHAMED, A. I. Presence of non-protein trypsin-inhibitor in soy and winged beans. **Journal of Food Science**, [S. l.: s. n.], v. 48, n. 1, p. 75-76, 1983.

HARDKE, J. T. et al. Damage and survivorship of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) on transgenic field corn expressing *Bacillus thuringiensis* Cry proteins. **Crop Protection**, [S. l.: s. n.], v. 30, n. 2, p. 168-172, 2011.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. Trad. Célio Pasquini. Porto Alegre, Bookman. 2009.

HRUSKA, A. J.; GOULD, F. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae): Impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua. **Journal of Economic Entomology**, [S. l.: s. n.], v. 90, n. 2, p. 611-622, 1997.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.  
**Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Rio de Janeiro. v. 24, n. 12, p 1-82, 2011.

JONGSMA, M. A.; BEEKWILDER, J. Co-Evolution of Insect Proteases and Plant Protease Inhibitors. **Current Protein & Peptide Science**, [S. l.: s. n.], v. 12, n. 5, p. 437-447, 2011.

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.

KIRBAŞLAR, S. I.; BOZ, I.; KIRBAŞLAR, F. G. Composition of Turkish lemon and grapefruit peel oils. **Journal of Essential Oil Research**, [S. l.: s. n.], v. 18, n. 5, p. 525-543, 2006.

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

LEITE, A. C. et al. Isolation of the alkaloid ricinine from the leaves of *Ricinus communis* (Euphorbiaceae) through counter-current chromatography. **Quimica Nova**, [S. l.: s. n.], v. 28, n. 6, p. 983-985, 2005.

LOPES, A. R. et al. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [S. l.: s. n.], v. 55, n. 3, p. 140-152, 2004.

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

MAGALHÃES, S. T. V. et al. Leaf Alkaloids, Phenolics, and Coffee Resistance to the Leaf Miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Journal of Economic Entomology**, [S. l.: s. n.], v. 103, n. 4, p. 1438-1443, 2010.

MELO, W. C. et al. Ethanol production from castor bean cake (*Ricinus communis* L.) and evaluation of the lethality of the cake for mice. **Quimica Nova**, [S. l.: s. n.], v. 31, n. 5, p. 1104-1106, 2008a.

\_\_\_\_\_. Acid and enzymatic hydrolysis of the residue from Castor Bean (*Ricinus communis* L.) oil extraction for ethanol production: Detoxification and biodiesel process integration. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, [S. l.: s. n.], v. 19, n. 3, p. 418-425, 2008b.

MENDEZ, W. A. et al. Spinosad and nucleopolyhedrovirus mixtures for control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera : Noctuidae) in maize. **Biological Control**, [S. l.: s. n.], v. 25, n. 2, p. 195-206, 2002.

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

\_\_\_\_\_. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, [S. l.: s. n.], v. 44, n. 3, p. 233-240, 2008.

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

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

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

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

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

ROSSI, G. D. **Bicho-mineiro do cafeeiro: Análise da digestão e inibição de tripsina por extratos de folhas de mamona**. Lavras: UFLA, 2007. Dissertação (Mestrado em Agroquímica), Universidade Federal de Lavras, 2007.

ROSSI, G. D. et al. Coffee leaf miner trypsin inhibition with castor bean leaf extracts mediated by a non-protein agent. **Ciencia E Agrotecnologia**, [S. l.: s. n.], v. 34, n. 2, p. 361-366, 2010.

SANTIAGO, G. P. et al. Effects of plant extracts on the biology of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera : Noctuidae) maintained under artificial diet. **Ciência E Agrotecnologia**, [S. l.: s. n.], v. 32, n. 3, p. 792-796, 2008.

SANTOS, C. D.; FERREIRA, C.; TERRA, W. R. Consumption of food and spatial-organization of digestion in the cassava hornworm, *Erinnyis ello*. **Journal of Insect Physiology**, [S. l.: s. n.], v. 29, n. 9, p. 707-714, 1983.



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

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing 2011.

TSYBINA, T. A. et al. Cationic Inhibitors of Serine Proteinases from Buckwheat Sedds. **Biochemistry**, Moscow: [s. n.], v. 66, n. 9, p. 6, 2001.

ZOU, J.-Y. et al. Identification of a Kunitz inhibitor from *Albizia kalkora* and its inhibitory effect against pest midgut proteases. **Biotechnology Letters**, [S. l.: s. n.], v. 30, n. 8, 2008, p. 4, 2008.

## APÊNDICE A

GL – Graus de liberdade

SQ – Soma dos quadrados

SQM – Soma dos quadrados médios

F – F calculado

p≤ – FTabelado

Tabela 5 – Tabela de análise de variância para Meio extrator.

	GL	SQ	SQM	F	p≤
Tratamento	1	2,4637 x 10 <sup>10</sup>	2,4637 x 10 <sup>10</sup>	27,628	0,0134
Resíduos	3	2,6752 x 10 <sup>9</sup>	8,9175 x 10 <sup>8</sup>		

Tabela 6 – Tabela de análise de variância para proporção do meio extrator.

	GL	SQ	SQM	F	p≤
Tratamento	1	1502,96	1502,96	175,87	1,135 x 10 <sup>-7</sup>
Resíduos	10	85,46	8,55		

Tabela 7 – Tabela de análise de variância para período de extração.

	GL	SQ	SQM	F	p≤
Tratamento	1	30,732	30,732	1,5425	0,2426
Resíduos	10	199,230	19,923		

Tabela 8 – Tabela de análise de variância para teor de óleo.

	GL	SQ	SQM	F	p≤
Tratamento	6	6667,5	1111,25	9,1021	0,000358
Resíduos	14	1709,2	122,09		

Tabela 9 – Tabela de análise de variância para duração do período larval

	GL	SQ	SQM	F	p≤
Tratamento	1	1,3	1,3201	0,0466	0,8294
Resíduos	140	3966,8	28,3341		

Tabela 10 – Tabela de análise de variância para concentração de proteínas nas fezes.

	GL	SQ	SQM	F	p≤
Tratamento	1	3593,8	3593,8	7,9729	0,02237
Resíduos	8	3606,0	450,8		

Tabela 11 – Tabela de análise de variância para duração do período pupal.

	GL	SQ	SQM	F	p≤
Tratamento	1	0,16	0,1645	0,0284	0,8664
Resíduos	124	735,43	5,7908		

Tabela 12 – Tabela de análise de variância para peso pupal.

	GL	SQ	SQM	F	p≤
Tratamento	1	0,000316	0,00031642	0,2912	0,5904
Resíduos	129	0,140172	0,0010866		

Tabela 13 – Tabela de análise de variância para período de pré-oviposição.

	GL	SQ	SQM	F	p≤
Tratamento	1	0,655	,6545	0,1127	0,741
Resíduos	18	104,545	5,8081		

Tabela 14 – Tabela de análise de variância para longevidade da fêmea.

	GL	SQ	SQM	F	p≤
Tratamento	1	20,61	20,608	0,8765	0,3615
Resíduos	18	423,19	23,511		

Tabela 15 – Tabela de análise de variância para longevidade do macho

	GL	SQ	SQM	F	p≤
Tratamento	1	25,34	25,341	1,1465	0,2984
Resíduos	18	397,86	22,103		

Tabela 16 – Tabela de análise de variância para período de oviposição

	GL	SQ	SQM	F	p≤
Tratamento	1	117,82	117,82	6,531	0,01987
Resíduos	18	324,73	18,04		

Tabela 17 – Tabela de análise de variância para número de ovos por casal

	GL	SQ	SQM	F	p≤
Tratamento	1	195806	195806	0,4105	0,5298
Resíduos	18	8585791	476988		