

LÍLIAN FERNANDES MOREIRA

**EFEITO DO INIBIDOR DE SERINO-PROTEASES, BERENIL,
SOBRE A EFICIÊNCIA ALIMENTAR, ATIVIDADE
PROTEOLÍTICA E DESENVOLVIMENTO PÓS-
EMBRIONÁRIO DE *Anticarsia gemmatalis*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Entomologia, para a
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2007**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

M838e
2008

Moreira, Lílian Fernandes, 1979-

Efeito do inibidor de serino-proteases, berenil, sobre a eficiência alimentar, atividade proteolítica e desenvolvimento pós-embrionário de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) / Lílian Fernandes Moreira. – Viçosa, MG, 2008.
xvi, 104f.: il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui anexos.

Orientador: Maria Goreti de Almeida Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Enzimas proteolíticas. 2. Serina proteinases.
3. Lagarta do feijão veludo - Desenvolvimento. 4. Relação inseto-planta. 5. *Anticarsia gemmatalis*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 572.76

LÍLIAN FERNANDES MOREIRA

**EFEITO DO INIBIDOR DE SERINO-PROTEASES, BERENIL,
SOBRE A EFICIÊNCIA ALIMENTAR, ATIVIDADE
PROTEOLÍTICA E DESENVOLVIMENTO PÓS-
EMBRIONÁRIO DE *Anticarsia gemmatalis*
(LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE)**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Entomologia, para a
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 28 de julho de 2007.

**Prof. Wellington Garcia Campos
(Co-orientador)**

Pesq. Milton Hércules Guerra de Andrade

**Prof. Joel Antônio de Oliveira
(Co-orientador)**

Pesq. Thiago Rennó dos Mares Guia

**Prof^ª. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)**

*Aos meus pais,
Adair e Asterak,
Minha origem e finalidade,
Dedico.*

"... A gente precisa expandir nossos limites, tanto como pessoas, como os limites da comunidade, os limites do Estado. Nossa função, enquanto estamos aqui na Terra é expandir esses limites para que a próxima geração expanda os dela e a humanidade evolua espiritualmente. Nós somos apenas um elo nessa cadeia de evolução. Estar aqui e deixar que os limites se cristalizem é fazer pouco. Precisamos expandir esses talentos que estão sufocados".

Denise Stoklos

Agradecimentos

À Deus, mistério que desperta a nossa fé em querer sempre buscar explicações fora de nós mesmos: sou grata pela vida;

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo indispensável apoio financeiro durante o período do meu treinamento;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Entomologia com os quais pude, realmente, aprender;

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira pela confiança, paciência, orientação, exemplo e por me iniciar no caminho da bioquímica de insetos. A você devo tudo, especialmente a compreensão, o zelo e estímulo durante os melhores e piores momentos da minha vida pessoal: Obrigada!!! Faltam-me palavras para demonstrar o quanto lhe sou grata e a admiro;

Ao Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes, pela disponibilidade, conselhos e orientação;

Aos meus pais, por me ensinarem o que eu jamais aprenderia sozinha, por nunca me abandonarem, mesmo quando eu acreditava que já poderia caminhar com meus próprios pés e por me darem o apoio que eu só encontro neles quando mais preciso;

Ao meu pai em particular, pelo constante exemplo de honestidade, dignidade, respeito, trabalho e esforço. Obrigada pela confiança e pela oportunidade de eu chegar até aqui e por me ensinar a fazer as escolhas certas!!!

À minha mãe em particular, pela dedicação sem fim a mim e aos meus irmãos, pelo exemplo de determinação, paciência, cuidado e pelos muitos sacrifícios feitos para que nunca nos faltasse nada;

Aos meus irmãos, Liliane e Lesley, pelas brincadeiras, conversas, pelo amor e companheirismo, e até mesmo pelas “briguinhas” que nos fizeram crescer e hoje nos permitem dar boas risadas das nossas “artes”... Obrigada por me lembrarem, diariamente e, mesmo inconscientemente, que posso sempre contar com vocês;

Ao amigo e prof. Wellington Garcia Campos pela OPORTUNIDADE, pelo apoio, presença constante, incentivo, torcida, paciência, amizade, conselhos e puxões de orelha, e por todo o esforço para que eu chegasse até aqui. Muito obrigada por acreditar em mim! Quando eu crescer, quero ser igualzinha a você!!!;

Aos meus mestres e amigos da UFSJ: obrigada a todos por se fazerem sempre presentes, cada um da sua forma. Agradeço por “cuidarem” de mim com suas palavras, torcida e carinho: nenhum detalhe ou momento será esquecido:

Ao Marco Antônio SCHIAVON, por me mostrar que nunca devemos nos contentar com “pouco”: é bom querer sempre mais e ser desafiado a conseguir!;

À Patrícia Martelli, minha amiga, irmã, que me deu o presente da convivência e de crescer com a Manú: você foi e é muito importante na minha vida;

Ao Valdir Mano pela forma realista e, nem por isso, menos sofisticada de “encarar” a vida e realizar os sonhos. Jamais me esquecerei de suas palavras, sempre gentis;

À Liliam Midori, pela amizade;

Ao Prof. José Mauro por me mostrar que sou capaz de me superar diariamente: basta que eu deseje...

À amiga Isabel Schiavon, aos meus “sobrinhos” Manuela Martelli e Enzo Schiavon, por se fazerem lembrados;

À amiga Fernanda Silva (Nanda), por se fazer presente em muitos momentos importantes dessa conquista;

À Maria Alice, grande amiga e segunda mãe, de coração. Obrigada por permitir que, de coração, eu faça parte de sua família. Que os nossos laços de amizade e admiração jamais sejam desfeitos!;

Aos meus primo(a)s e tio(a)s, “a família Adams” por sempre se preocuparem comigo e por compreenderem a minha ausência em suas vidas: obrigada pela torcida e pelas demonstrações de carinho, respeito e amizade;

Ao Prof. João Batista Rodrigues e ao Dr. José Eugênio por me mostrarem o que eu queria ver e me fazerem acreditar que tudo pode ser melhor...

Aos funcionários da UFV, especialmente: D. Paula pela dedicação e paciência; Miriam, pela confiança e amizade; Sr. José Fausto, pela convivência diária e disponibilidade e também pelas muitas balas, chocolates, quitandas e pelos muitos “Só Jesus” e “Tá ligado?” que tornaram a rotina do laboratório menos cansativa; ao Sr. Manoel pela consideração sincera, ao Eduardo (Bioquímica) pela disponibilidade em ajudar-me sempre que eu precisei;

Aos colegas dos bons tempos de iniciação científica na UFSJ que me acompanham até hoje, de perto ou de longe: Wendel, Ludmila, Michelle e Gabriel. Obrigada pela companhia, confiança, apoio, e constante presença;

Aos estagiários, Natália, Maíra e Vinícius pelo auxílio na condução dos experimentos e por serem zelosos babás das lagartinhas;

Aos colegas do laboratório: Eduardo, Liliane, Camila, Fabrícia, Ana Paula, Sandra, Angélica, Fabrício, Fernanda, Anderson Pilon, Anderson Fazollo, Franciny,

Ronnie, Jeanne, Rita de Cássia, Kênia, Patrícia, Guilherme, Mateus, Zaira, Isabella e Denise, pela convivência, ajuda e pelas boas risadas seja na hora da faxina, do trabalho ou do café...valeu!

À minha amiga Vanessa Giarola, minha irmã por escolha, sempre presente em todos os momentos da minha vida;

À Jaqueline (Jaque) pelos bons e maus momentos (como sofremos hein amiga??? rs!) divididos durante esses dois anos convividos diariamente em Viçosa e pela amizade sincera que construímos juntas;

À Teresa, colega de curso, amiga e companheira no “projeto delícia” rs!

À Aline Sales, meu primeiro contato em Viçosa, pela amizade e constante presença: saudades de você, amiga!

Aos colegas de curso e companheiros de Viçosa, sou grata pela convivência, pelos exemplos positivos, pela descontração nas salas de aula ou fora delas: tudo foi válido!

Ao amigo Marco Antônio Oliveira (Marquinho) pelo zelo e apoio incondicional: conte comigo sempre. À você minha eterna gratidão!!!;

À amiga “Sandrinha”, pelos momentos divididos e pelo companheirismo;

Ao Adalberto pela paciência e pelas dicas no decorrer dos experimentos e da redação da Dissertação;

Às pessoas que fizeram de tudo para se tornarem empecilhos nessa caminhada, obrigada por me desafiarem a ser melhor a cada dia!!!!

Aos membros da banca, Profs. Joel Antônio de Oliveira, Milton Hércules Guerra de Andrade, Wellington Garcia Campos e Dr. Thiago Rennó dos Mares Guia, por terem prontamente aceito o convite para participarem da defesa desta Dissertação.

Biografia

Lílian Fernandes Moreira, filha de José Asterak Moreira e Adair da Costa Fernandes Moreira, nasceu em São João del-Rei – MG, em 29 de Junho de 1979. Em março de 2000, iniciou o curso de Licenciatura em Química pela Universidade Federal de São João del-Rei – UFSJ, tendo atuado como monitora em Zoologia dos Invertebrados I e II e em Química Orgânica. Foi bolsista de iniciação científica pela FAPEMIG, realizando trabalhos na área de ecologia da interação inseto-planta. Em agosto de 2005 ingressou no mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Entomologia pela Universidade Federal de Viçosa – UFV, sob a orientação da Prof^ª. Maria Goreti de Almeida Oliveira, submetendo-se à defesa da Dissertação em 28 de Julho de 2007, já tendo sido selecionada para o Doutorado no Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola da UFV.

Índice

Lista de figuras.....	xi
Lista de abreviaturas.....	xii
Resumo.....	xiii
Abstract.....	xv
Introdução Geral	01
Revisão da Literatura.....	06
2.1. A cultura da soja.....	06
2.2. <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae).....	07
2.3. Enzimas digestivas dos insetos.....	11
2.4. Proteases de insetos.....	14
2.5. Inibidores de proteases.....	17
2.6. Inibidores de serino-proteases (EC 3.4.21).....	21
2.7. Ação dos inibidores de proteases em insetos.....	23
2.8. Benzamidinas.....	27
Referências Bibliográficas.....	30
Capítulo 1 – Resposta alimentar e desenvolvimento de <i>A. gemmatalis</i> (Hübner) ao inibidor de proteases berenil.....	38
Resumo.....	38
1. Introdução.....	40
2. Material e Métodos.....	42
2.1. Criação da lagarta da soja <i>A. gemmatalis</i>	42
2.2. Preparo da dieta artificial.....	43
2.3. Determinação das concentrações de berenil utilizadas nos bioensaios.....	44
2.4. Desenvolvimento pós-embriônico de <i>A. gemmatalis</i>	46
2.5. Consumo e eficiência de <i>A. gemmatalis</i> na assimilação do alimento.....	47

2.6. Obtenção das medidas de consumo de <i>A. gemmatalis</i>	48
2.7. Determinação da quantidade de fezes produzidas por <i>A. gemmatalis</i>	49
2.8. Determinação da biomassa incorporadas por <i>A. gemmatalis</i>	49
2.9. Análises estatísticas.....	50
3. Resultados e discussão.....	50
4. Referências Bibliográficas.....	70
Capítulo 2 - Digestibilidade protéica e atividade das proteases digestivas da lagarta da soja em função da concentração de berenil na dieta.....	76
Resumo.....	76
1. Introdução.....	78
2. Material e Métodos.....	81
2.1. Criação da lagarta da soja <i>A. gemmatalis</i>	81
2.2. Preparo da dieta artificial.....	82
2.3. Determinação das concentrações de berenil utilizadas nos bioensaios.....	82
2.4. Digestibilidade protéica.....	83
2.5. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio da lagarta.....	85
2.6. Concentração de proteína.....	85
2.7. Atividade proteásica.....	85
2.8. Atividade amidásica.....	86
2.9. Atividade esterásica.....	88
2.10. Análises estatísticas.....	88
3. Resultados e discussão.....	89
3.1. Consumo alimentar.....	89
3.2. Digestibilidade protéica e atividade enzimática.....	91
4. Referências Bibliográficas.....	96
Conclusões gerais.....	100
Anexos.....	101

Lista de figuras

Revisão da literatura

1. Esquema geral do intestino médio de um inseto.....	13
2. Esquema do complexo enzima-inibidor no intestino de um inseto.....	24
3. (a) Estrutura da benzamidina e (b) berenil.....	29
4. Rota da degradação do berenil por catálise ácida	29

Capítulo 1

1.(a) e (b) Ingestão de dieta	52
2.(a) Digestibilidade aproximada e b) Fezes excretadas.....	53
3. (a) Balanço entre ingestão e eliminação das fezes e (b) Taxa de consumo relativa.....	55
4. (a) Taxa de consumo relativa e (b) taxa relativa de crescimento.....	56
5. Lagartas de <i>A. gemmatalis</i> alimentadas em dietas contendo inibidor – teste preliminar	57
6. (a) e (b) Duração da fase larval.....	58
7. Longevidade dos adultos.....	59
8. (a) e (b) Tempo médio de sobrevivência.....	60
9. (a) e (b) Sobrevivência acumulada.....	62
10. (a) e (b) Eficiência na conversão do alimento ingerido.....	63
11. (a) Eficiência na conversão do alimento digerido e (b) Biomassa incorporada.....	64
12. (a) Peso das pupas e (b) Peso dos adultos.....	65
13. (a) Tamanho dos adultos e (b) Comprimento da asa anterior direita	66
14. Comprimento da asa posterior direita.....	67

Capítulo 2

1.(a) Consumo alimentar e (b) duração da fase larval.....	90
2.(a) Digestibilidade protéica total e (b) atividade proteolítica específica.....	93
3.(a) Atividade específica da hidrólise de L-BAPNA e (b) L-TAME.....	95

BBI = inibidor Bowman-Birk da soja

Abreviaturas

KTI = inibidor Kunitz de tripsina da soja
SBTI = inibidor de tripsina da soja
L-BA_pNA = N-benzoil-L-arginil *p*-nitroanilida
L-TAME = N- α -Tosil-L-arginil metil éster
BSA = albumina de soro bovino
Nipagin® = metilparabeno
S₁ = sub-sítio S₁
S₂ = sub-sítio S₂
K_i = constante de inibição
kDa = kilodalton
K_M = constante de Michaelis-Menten
K_{cat} = constante catalítica
HR = resposta hipersensitiva
SAR = resistência sistêmica adquirida
TLCK = N- α -tosil-L-lisina clorometil cetona
IR = resistência induzida
ARG = arginina
LYS = lisina
E-64 = [[(L-trans-epoxisuccinil)-leucilamino]-(4-guanidinobutano)]
Tris = Tris (hidroximetil) amino metano
AD = digestibilidade aproximada
ECI = eficiência na conversão do alimento ingerido
ECD = eficiência na conversão da comida digerida
RGR = taxa relativa de crescimento
RCR = taxa de consumo relativa
Bt = *Bacillus thuringiensis*
TCA = ácido tricloroacético

RESUMO

MOREIRA, Lílian Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2007.

Efeito do inibidor de serino-proteases, berenil, sobre a eficiência alimentar, atividade proteolítica e desenvolvimento pós-embrionário de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-orientadores: Joel Antônio de Oliveira, Raul Narciso Carvalho Guedes e Wellington Garcia Campos.

Inibidores de proteases podem reduzir a eficiência digestiva, retardar o desenvolvimento e diminuir a atividade proteolítica do inseto, resultando em aumento da mortalidade pela deficiência de aminoácidos livres para a manutenção das funções vitais. Este trabalho teve por objetivos avaliar se concentrações crescentes do inibidor sintético de serino-proteases, berenil, presente na dieta de *A. gemmatalis* afeta negativamente a performance do inseto, reduz o consumo alimentar, a digestibilidade e a eficiência na assimilação do alimento ingerido e digerido, reduz a atividade proteolítica e trípica do inseto e reduz sua digestibilidade protéica. Para testar essa hipótese foram realizados bioensaios com lagartas individualizadas e alimentadas diariamente em dietas contendo 0; 0,00095; 0,0019; 0,0038; 0,0076; 0,0152; 0,0304; 0,0608; 0,0912; 0,125 e 0,25% (p/p) de berenil durante toda a fase larval. Foram determinados os índices digestórios, a duração do ciclo de vida e da fase larval, a sobrevivência acumulada e o tempo médio de vida, o peso das pupas e dos adultos, o tamanho corporal e das asas das mariposas adultas. Adicionalmente, foram avaliadas a digestibilidade protéica e a atividade enzimática de extratos do intestino médio de *A. gemmatalis* submetidas ao berenil na dieta, nas

concentrações determinadas acima. Todos os parâmetros avaliados da história de vida do inseto foram afetados negativamente com o aumento da concentração do inibidor na dieta. Foi verificado aumento na duração da fase larval e do ciclo de vida, diminuição no peso das pupas, adultos, tamanho dos adultos e comprimento das asas. Houve redução na biomassa incorporada e na taxa relativa de crescimento. Por outro lado, houve aumento na ingestão, digestibilidade aproximada, na taxa de consumo relativa da dieta e no balanço entre ingestão e excreção das fezes. O consumo individual total da dieta aumentou até a concentração de 0,0076% do inibidor na dieta, decrescendo com o aumento da concentração de inibidor. A digestibilidade protéica foi diretamente proporcional à concentração de berenil enquanto as atividades proteolítica, amidásica e esterásica diminuíram com o aumento da concentração do inibidor. Desse modo, embora a presença de berenil em concentrações crescentes na dieta interfira negativamente em todos os parâmetros da história de vida do inseto, as lagartas respondem aumentando a ingestão da dieta. Contudo, mesmo que a digestibilidade total e a digestibilidade protéica aumentem em concentrações maiores de inibidor, o inseto apresenta menor atividade enzimática e, conseqüentemente, baixa eficiência na assimilação do alimento ingerido e digerido, indicando que o inseto não demonstra mecanismos adaptativos para impedir a inibição das enzimas tripsina-like presentes em seu sistema digestivo. Nesse sentido, o berenil surge como estratégia promissora para novos estudos visando a síntese de peptídeos miméticos para aplicação no campo como forma de controle de *A. gemmatalis* nos cultivos de soja.

ABSTRACT

MOREIRA, Lilian Fernandes, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2007.

Effect of serine-proteases inhibitor, berenil, on the feeding efficiency, proteolytic activity and post-embryonic development of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Advisers: Joel Antônio de Oliveira, Raul Narciso Carvalho Guedes and Wellington Garcia Campos.

Protease inhibitors can reduce the digestive efficiency, to delay the development and to diminish the insect proteolytic activity resulting in increase of mortality through deficiency of free amino acids for maintenance of vital functions. The subject of this work were to evaluate if *A. gemmatalis* larvae feeding in artificial diets containing increasing concentrations of synthetic trypsin inhibitor bis-benzamidine affects negatively the insect performance, reduce the alimentary consumption, the digestibility, the assimilation efficiency of the food ingested and digested, the insect proteolytic activity and protein digestibility. To test these hypotheses were realized bioassays with individualized caterpillars and supplied daily with diets containing 0; 0,00095; 0,0019; 0,0038; 0,0076; 0,0152; 0,0304; 0,0608; 0,0912; 0,125 e 0,25% (w/w) of berenil during the entire larval phase. The digestion indices, the duration of larval phase and life cycle, the accumulated survival and the average of time survival, the pupae and adults weight, the body and wings of the adults moths were determined. Additionally, were evaluated the protein digestibility and the enzymatic activity of midgut extracts of *A. gemmatalis* exposed to berenil in diet, in the same concentrations above. All parameters assessed of life

history were negatively affected with the increase of inhibitors in diet. Were verified an increase in the larval phase and life cycle duration, reduction in the pupae weight and body and wings length. There was reduction in the incorporated biomass and the relative growth rate. Otherwise, there were increases in ingestion, approximated digestion, and relative diet consumption rate and in the ingestion and excretion balance. The diet individual consumption increased until the 0.0076% of berenil, diminished with the increase of inhibitor concentration. The protein digestibility was directly proportional to berenil concentration while the proteolytic, amidolytic and esterolytic activities diminished with the increasing of inhibitor concentration. Therefore, albeit the berenil mixed in increasing concentrations in diet affects negatively in all life history parameters of insect, the caterpillars improve the diet intake. However, even so the total digestibility and the protein digestibility increase in higher inhibitor concentrations, the insect show lower enzymatic activity and, consequently, reduction in the efficiency in assimilation of ingested and digested food, indicating that the insect did not show adaptative mechanisms to prevent the inhibition of tripsina-*like* enzymes existents in your digestive tract. Thus, the berenil is a promising strategy to new studies with the subject of to synthesis mimicry peptides to apply in the field to control *A. gemmatalis* caterpillars in the soybean crops.

.....*Introdução geral*

A interação entre patógenos, insetos e plantas é um sistema dinâmico sujeito a contínuas variações e mudanças. O ataque herbívoro promove alterações na composição química, morfologia e fisiologia da planta hospedeira (Karban e Baldwin, 1997; Baldwin e Preston, 1999) às quais o inseto responde, resultando em co-evolução e especiação no decorrer do tempo evolutivo (Ehrlich e Raven, 1964).

Para escapar do ataque de organismos fitopatogênicos e herbívoros, as plantas desenvolveram variados e eficientes mecanismos de resistência, explorando as diferenças fisiológicas e bioquímicas existentes entre elas e seus herbívoros. Qualquer característica capaz de afetar a performance dos insetos, aumentando o *fitness* da planta em ambientes com herbívoros, pode ser considerada uma defesa. Em geral, tais defesas são constitutivas, de ocorrência independente de qualquer injúria e com sua intensidade variando no decorrer do processo de maturação e envelhecimento fisiológico dos tecidos vegetais. Entre elas estão incluídas proteínas com propriedades entomotóxicas, como as α -amilases, inibidores de proteases, globulinas, lecitinas e quitinases (Mello e Silva-Filho, 2002; Pilon *et al.*, 2006), que normalmente estão presentes em sementes e órgãos vegetativos de leguminosas (Sales *et al.*, 2001; Franco *et al.*, 2002).

Por outro lado, mesmo que a adoção de traços defensivos amplie a aptidão darwiniana da planta, nem sempre eles participam da sua constituição (Kessler e Baldwin, 2002). Devido à grande plasticidade fenotípica dos tecidos vegetais, alguns fenótipos podem ser expressos a fim de produzir respostas defensivas específicas

(Karban *et al.*, 1999), inibindo a herbivoria futura (Karban e Baldwin 1997, Karban, *et al.*, 1999), como é o caso dos “metabólitos secundários” (Rhoades e Cates, 1976, Baldwin, 2001). No reino vegetal, há uma enorme variedade de compostos químicos que não estão envolvidos nas funções primárias das plantas. Esses compostos podem ser produtos resultantes da síntese dos compostos primários que não são excretados pela plantas, sendo estocados em locais em algum lugar conveniente dentro da estrutura da própria planta. Outras plantas, em especial, produzem compostos químicos particulares e outras não, sugerindo que tais metabólitos não são essenciais ao metabolismo da planta, sendo um critério muito comum utilizado pela taxonomia química de plantas (Price, 1997). Esses compostos são originados de vias biossintéticas especializadas ou paralelas às envolvidas no metabolismo primário das plantas. Contudo, as substâncias secundárias não estariam relacionadas às funções vitais das plantas. Historicamente, no início do século XX vários biólogos já teriam reconhecido a importância das substâncias do metabolismo secundário nos mecanismos de escolha da planta hospedeira pelos insetos associados (Bernays, 1984).

Entre as centenas de milhares de fenóis, alcalóides, terpenóides, iridóides, flavonóides, esteróides e outros compostos químicos de plantas que têm sido alvo de estudo (Rosenthal e Berenbaum, 1991), muitos parecem não demonstrar nenhum efeito em insetos herbívoros sugerindo que esse tipo de estratégia é favorecida pela seleção somente quando a probabilidade de herbivoria é alta. Nesse caso, o melhor fenótipo para essas condições é selecionado e fixado. Dos compostos envolvidos no metabolismo secundário de plantas contra insetos herbívoros, muitos são tóxicos ou

atuam como deterrentes, chegando a evitar o consumo da planta que os contém (Bernays, 1984).

A resistência induzida difere em ação e em composição bioquímica no que diz respeito ao alvo para o qual ela estaria destinada. Pragas e patógenos demandam mecanismos de ação diferentes, com rotas bioquímicas distintas e incompatíveis porque a codificação responsável pelas respostas está localizada em genes diferentes (Karban e Baldwin, 1997). Quando uma planta sofre o ataque de organismos fitopatogênicos, como bactérias e fungos, há o desencadeamento de uma resposta hipersensitiva (HR) que promove a morte celular localizada e impede o espalhamento da infecção para outras partes da planta. Quando a resposta é estendida para todos os tecidos vegetais de uma planta ela passa a ser considerada uma resistência sistêmica adquirida (SAR). Se a injúria à planta é promovida por herbívoros, uma resposta plástica é desencadeada, divergindo recursos como carbono e nitrogênio do crescimento e reprodução para fornecer uma resistência sistêmica, a resistência induzida (IR), que depende de diversas cascatas sinalizadoras que podem se cruzar e sinergizar/antagonizar as respostas (Walling, 2001).

Embora os agroquímicos tenham se firmado como um método promissor no controle de herbívoros-praga e outros organismos, o fato de promoverem danos ao ambiente e a organismos não-alvo, como o homem, tem motivado a busca de novas formas de proteção dos cultivos agrícolas. Uma alternativa está na exploração dos mecanismos fisiológicos de defesa das plantas e das respostas adaptativas produzidas pelos insetos face às barreiras impostas pelas plantas para “escapar” do ataque herbívoro.

Inibidores de proteases têm efeito na proteção de plantas contra danos causados por vários tipos de organismos (Haq *et al.*, 2004) podendo reduzir significativamente a atividade proteolítica de proteases presentes no intestino dos insetos (Hilder *et al.*, 1987, Ryan 1990). Por ser específica a determinadas famílias de enzimas, esse tipo de defesa deveria ser efetiva uma vez que cada inibidor atua sobre determinadas enzimas digestivas de herbívoros, especialmente em insetos. Dessa forma, a identificação da eficácia do efeito antinutricional dos inibidores no desenvolvimento de insetos-praga pode levar à identificação dos genes responsáveis pela expressão dessas moléculas. Via produção de plantas geneticamente modificadas, a introdução de genes que codificam os inibidores de enzimas digestivas pode resultar em plantas mais resistentes e/ou menos susceptíveis a seus herbívoros associados. Uma outra possibilidade estaria na produção de pequenos peptídeos miméticos, que poderiam ser utilizados como bioinseticidas sem causar danos ao homem (Oliveira *et al.*, 2005)

Cultivada no mundo todo, a soja destaca-se como um dos principais produtos agrícolas exportados pelo Brasil. A expansão dos cultivos de soja tem aumentado sua vulnerabilidade a insetos-praga (Kogan e Turnipseed, 1987), dentre as quais a lagarta da soja é o desfolhador mais importante (Turnipseed e Kogan, 1976). A soja responde ao ataque herbívoro com a produção de compostos orgânicos que atuam em locais específicos do organismo invasor. Pela via das lipoxigenases, uma via bioquímica de defesa da soja a insetos e patógenos, ocorre a produção e liberação de ácido jasmônico, o qual ativa genes de defesa da planta que codificam a produção de inibidores de proteases (Fortunato, *et al.*, 2004, 2007). Essas moléculas inibem a atividade proteolítica de proteases específicas presentes no intestino dos insetos, causando a diminuição do consumo alimentar e/ou assimilação do alimento ingerido.

Nesse sentido, o objetivo desse trabalho é avaliar se a concentração do inibidor sintético de serino-proteases, berenil, presente na dieta de *A. gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): (i) afeta negativamente a performance do inseto; (ii) diminui o consumo, a digestibilidade e a eficiência na assimilação do alimento ingerido; (iii) reduz as atividades proteolítica e trípica do inseto e (iv) reduz a digestibilidade protéica da lagarta-da-soja.

2.1. A cultura da soja

A soja *Glycine max (L.) Merrill* é originária de clima temperado, tendo se adaptado bem aos climas subtropicais e tropicais. No Brasil, ocupa extensas áreas nas regiões sul e centro-oeste tendo posição de destaque no país como fonte de proteína e de óleo vegetal, para consumo interno ou para exportação, gerando divisas. Os países maiores produtores de soja são também os maiores exportadores, sendo o principal os Estados Unidos, seguidos pelo Brasil e Argentina. No âmbito nacional a soja ocupa o segundo lugar entre os principais produtos agrícolas, ocupando essa posição há vários anos (EMBRAPA-CNPSO, 2006). Dada a importância econômica da soja, os problemas ocasionados pelo ataque de pragas são consideráveis face aos prejuízos à produção e à qualidade dos grãos ou sementes (Magrini *et al.*, 1999).

A cultura da soja encontra-se sujeita ao ataque de insetos e patógenos durante praticamente todo o seu ciclo, apresentando quatro pragas principais, *A. gemmatilis* (lagarta) e três espécies de percevejos, seis pragas secundárias (brocas) e outros gêneros de percevejos e coleópteros, além de doenças causadas por várias espécies de fungos, bactérias, vírus e nematóides (EMBRAPA-CNPSO, 1995). Logo após a emergência, insetos como a lagarta rosca *Agrotis ipsilon* (Hüfnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), os percevejos castanhos *Scaptocoris castanea* (Perty) (Hemiptera: Cydnidae) e *Atarsocoris brachiariae* (Becker) (Hemiptera: Cydnidae), os córos e a broca-do-colo *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) podem atacar as plântulas. Posteriormente, a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta falsa-medideira *Chrysodeixis (Pseudoplusia)*

inclusens (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae) e a broca-das-axilas *Epinotia aporema* (Walsingham) (Lepidoptera: Tortricidae) atacam as plantas durante a fase vegetativa e, em alguns casos, até durante a floração. No início da fase reprodutiva, é comum o ataque de percevejos *Nezara viridula* (Linnaeus) (Hemiptera: Pentatomidae), *Piezodorus guildinii* (Westwood) (Lepidoptera: Pentatomidae) e *Euschistus heros* (Fabricius) (Hemiptera: Pentatomidae), que causam danos desde a formação das vagens até o desenvolvimento final das sementes. Além destas, a soja pode ser atacada por outras espécies de insetos, em geral menos importantes do que as referidas anteriormente (EMBRAPA-CNPSO, 2006). Nesse sentido, o uso de cultivares resistentes às pragas é uma das soluções mais viáveis para tentar diminuir o impacto de herbívoros.

2.2. *Anticarsia gemmatalis* (Hübner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae)

A. gemmatalis, vulgarmente conhecida por lagarta da soja, é um inseto cosmopolita, nativo das áreas tropicais e subtropicais do hemisfério ocidental sendo permanentemente encontrado nas Américas, desde o Canadá até a Argentina (Ford *et al.*, 1975). No Brasil, o inseto ocorre desde o sul de Goiás e Mato Grosso até o Rio Grande do Sul (Panizzi *et al.*, 1977), atacando as lavouras de soja a partir de novembro nas regiões setentrionais, e a partir de janeiro, no extremo sul do país (EMBRAPA-CNPSO, 1995). A larva desta espécie é vulgarmente denominada nos EUA de “velvetbean caterpillar” devido aos vários desfolhamentos causados a *Stilozobium deeriugianum* Bort, conhecida como “velvetbean” (feijão veludo). No México ela é conhecida por “gusano terciopelo”, no Brasil é chamada de “lagarta-da-soja” e na Argentina é denominada “oruga das leguminosas” (Ford *et al.*, 1975).

Embora a soja esteja no topo da hierarquia de preferência alimentar de *A. gemmatalis*, a fase imatura do inseto é generalista e pode se alimentar de outras espécies de vegetais incluindo amendoim, kudzu (*Pueraria thunbergiana*), feijão de cavalo (*Cannavalia* sp), algodão (Hinds e Osterberge, 1931), ervilha, erva daninha do café, folhas de trevo, arroz, (Tarragó *et al.*, 1977) e pastagens (Wille, 1943) dentre outras (Waters & Barfield, 1989).

A lagarta da soja é um inseto desfolhador que começa a se alimentar da epiderme inferior e do mesófilo da folha. A partir do segundo ínstar, a lagarta já consegue se alimentar da folha inteira, chegando a promover a completa desfolhação da planta. Nos últimos instares, um indivíduo pode consumir até 100 cm² de folhas por dia (EMBRAPA-CNPSO, 1995). O ciclo de vida da lagarta da soja se completa em cerca de quatro semanas durante o verão, tendo sua duração aumentada no outono. Os ovos são brancos, ligeiramente ovais, achatados na superfície inferior, com tamanho variando entre 1 e 2 mm de diâmetro. Os ovos apresentam suportes proeminentes para fixação ao substrato e são de cor branca no intervalo de tempo que precede a eclosão, quando se tornam rosados (Watson, 1916). Pouco antes da eclosão podem apresentar coloração marrom-avermelhada (Elisor, 1942). Os ovos colocados nos meses de temperaturas mais altas eclodem em cerca de três dias (Elisor, 1942). Watson (1916) relata que os ovos colocados no mês de novembro (época mais fria no Hemisfério Norte) têm um período de incubação de uma semana ou mais, o que pode torná-los inviáveis. Reid (1975) observou que os ovos que foram mantidos a 24 ± 2 °C eclodem em dois ou três dias. Moscardi *et al.* (1981) verificaram o efeito da temperatura sobre a oviposição, eclosão de lagartas e a longevidade de *A. gemmatalis*. A fecundidade média variou de 310 ovos por fêmea a 32,2 °C a 842,16 ovos por fêmea a 26,7 °C. Em temperaturas extremas, a fecundidade foi reduzida,

sendo que as fêmeas mantidas a 21,1 °C apresentaram uma maior capacidade de postura do que as de 32,2 °C. A porcentagem média de eclosão variou de 68,6% a 21,1 °C para 85,71% em temperaturas não controladas. Os valores obtidos a 21,1 °C foram significativamente baixos em relação às outras temperaturas. Watson (1916) observou que *A. gemmatalis* faz postura isolada no lado abaxial das folhas de feijão veludo, sendo menos freqüente nas hastes e nos pecíolos, exceto quando a densidade de ovos é alta. Grenne *et al.* (1973) verificaram que a postura é realizada durante a noite, sendo que o pico de oviposição ocorre entre 21 e 23 horas e que a postura é maior com o decréscimo da temperatura e o aumento da umidade, diminuindo à medida que o orvalho acumula-se na planta. Após a eclosão, as larvas recém-eclodidas se alimentam da casca dos ovos das quais eclodem (Watson, 1916).

Em geral, o estágio larval de *A. gemmatalis* consiste de seis instares podendo variar de cinco a oito conforme a temperatura, idade da folha e hospedeiro nas quais o inseto se desenvolve (Watson, 1916; Reid, 1975; Nickle, 1977). As lagartas criadas em temperaturas acima de 18,3 °C apresentaram de cinco a seis instares enquanto as que foram criadas em temperaturas inferiores apresentaram de seis a sete instares (Reid, 1975).

As lagartas se diferem não só pelo seu tamanho como também por grandes diferenças morfológicas. As larvas de *A. gemmatalis* apresentam variado padrão de manchas e coloração durante todo o ciclo de desenvolvimento. A maioria das lagartas possui uma linha negra longitudinal e um grande número de linhas estreitas brancas, amarelas ou róseas. O primeiro instar tem duração de dois dias e a larva cresce de 2,5 mm a 6 ou 7 mm antes da muda. A cabeça é marrom clara, arredondada e bilobada. O corpo da lagarta é verde claro sem nenhuma mancha ou faixa longitudinal e os prolegos do segmento abdominal 3 e 4 são menores do que os dos

segmentos 5 e 6. No segundo instar, surge uma linha negra lateral e o primeiro e o segundo par de prolegos abdominais estão cerca de 25 e 50% maiores que o terceiro par, respectivamente. A duração do segundo instar varia de 3 a 4 dias e a larva pode alcançar 9 mm de comprimento. O terceiro instar tem duração de dois dias e a lagarta pode ter 16 mm de comprimento. O quarto e o quinto instares duram entre 3 ou 4 dias e as lagartas alcançam 25 mm de comprimento. No sexto instar a lagarta chega a quase duplicar de tamanho, podendo medir 48 mm. O sexto instar dura cinco dias, completando 25 dias de ciclo larval. No estágio pré-pupal a larva tem seu tamanho reduzido para 25 mm de comprimento, apresentando coloração marrom com poucas linhas longitudinais, com duração de um dia (Watson, 1916; Guyton, 1940).

No primeiro dia, a pupa da *A. gemmatalis* apresenta coloração verde clara tornando-se marrom brilhante num período de 24 horas. A pupa é obtecta, apresenta textura lisa e mede de 18 a 20 mm de comprimento e de 4 a 6 mm de largura. No campo, as lagartas de *A. gemmatalis* empupam em uma profundidade de cerca de 2 cm da superfície do solo. A duração da fase de pupa varia de sete a 10 dias dependendo da estação do ano (Watson, 1916). A mariposa adulta apresenta envergadura de 30 a 38 mm e possui asas com distribuição de cores variando de em padrões de cinza, marrom amarelado claro a marrom avermelhado escuro. Uma linha escura estende-se nas duas asas dianteiras e ficam evidentes quando as asas são estendidas. As pontas das asas têm coloração marrom clara com uma linha de pontos claros próxima às margens (Watson, 1916).

As diferenças morfológicas entre os sexos foram descritas por Greene (1974) baseando-se no comprimento e na forma das escamas das pernas do macho e da fêmea. Greene *et al.* (1973) estudaram o acasalamento em condições de campo,

comprovando a liberação do feromônio sexual pela fêmea como precursor da cópula. O pico de acasalamento ocorreu duas horas após o pôr-do-sol, diminuindo gradativamente dentro de 12 horas. Leppla (1976) estudou o acasalamento de *A. gemmatalis* em condições de laboratório (27 ± 2 °C), observando que o pico de acasalamento ocorreu durante as primeiras 48 horas após emergências dos adultos, continuando em nível reduzido até o sexto dia. A postura iniciou-se no terceiro dia, com o pico de oviposição ocorrendo no quinto dia.

2.3. Enzimas Digestivas dos Insetos

Insetos são excelentes modelos para o estudo da função intestinal principalmente porque existem espécies adaptadas a quase todos os tipos de habitat e de hábitos alimentares. Além disso, o intestino (Figura 1) é a maior interface entre o inseto e o ambiente. Portanto, é essencial o entendimento do processo digestivo para o desenvolvimento de métodos de controle populacional, como é o caso do uso de plantas transgênicas no controle de insetos fitófagos. A ocorrência de diferentes enzimas digestivas no canal digestivo de insetos deve-se, principalmente, à variação na composição química da dieta ingerida. É possível que todos os insetos tenham enzimas digestivas complementares àquelas utilizadas primariamente, em quantidades relativas que mudam em resposta à composição da dieta (Terra e Ferreira, 1994).

Para crescerem, se desenvolverem e se reproduzirem os insetos em geral requerem os mesmos aminoácidos essenciais aos mamíferos. Esses aminoácidos essenciais devem ser obtidos de uma dieta protéica e para isso os insetos aparentemente alimentam-se de todos os compostos orgânicos, de madeira a folhas, flores, raízes, tuberos, néctar, sementes, animais vivos, restos de outros organismos, sangue e de outros insetos, fungos e bactérias (Murdock e Shade, 2002; Fortunato *et*

al., 2007). Essa plasticidade teria sido conferida pela diversidade de enzimas digestivas que podem ser encontradas no intestino médio desse grupo de organismos, conferindo-lhes as habilidades de consumir e utilizar com eficiência uma grande variedade dos recursos alimentares (Terra *et al.*, 1996).

O intestino médio dos lepidópteros tem sido alvo de vários estudos relacionados ao processo de digestão, mecanismo secretor de enzimas, caracterização de proteases digestivas, absorção e movimento de íons, já que várias espécies de insetos desta ordem são de grande interesse econômico (Xavier *et al.*, 2005, Oliveira *et al.*, 2005, Pilon *et al.*, 2006, Fortunato *et al.*, 2007). Já foi demonstrado por Santos *et al.* (1986), que não ocorre digestão no intestino anterior das larvas de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae).

A organização do processo digestivo depende da compartimentalização das enzimas digestivas e do fluxo do intestino médio, processos estes responsáveis pela translocação das enzimas e produtos da digestão. A digestão de polímeros dos alimentos (proteínas, amido, celulose e hemicelulose) no intestino dos insetos acontece em três fases. A fase inicial ocorre no espaço endoperitrófico do intestino, onde a ação de hidrolases, como a tripsina, a α -amilase, a celulase e a hemicelulase promovem a quebra dos compostos ingeridos em moléculas menores. Em seguida, os oligômeros resultantes da primeira fase são hidrolisados em dímeros ou dipeptídeos também pela ação de hidrolases, como a α -amilase e aminopeptidase. Finalmente, os dímeros são transformados em monômeros mediante a ação de outras hidrolases como dipeptidases, maltase e celobiase. Ambas as etapas ocorrem no espaço ectoperitrófico (Terra *et al.*, 1996).

À medida que os alimentos são fracionados, as enzimas digestivas atravessam a membrana peritrófica e chegam ao espaço ectoperitrófico. Ao final do processo digestivo, as enzimas retornam para o interior da membrana peritrófica, na porção inicial do intestino médio. A água, por sua vez, passa pelo espaço ectoperitrófico até chegar aos cecos, nos quais é absorvida (Terra *et al*, 2000).

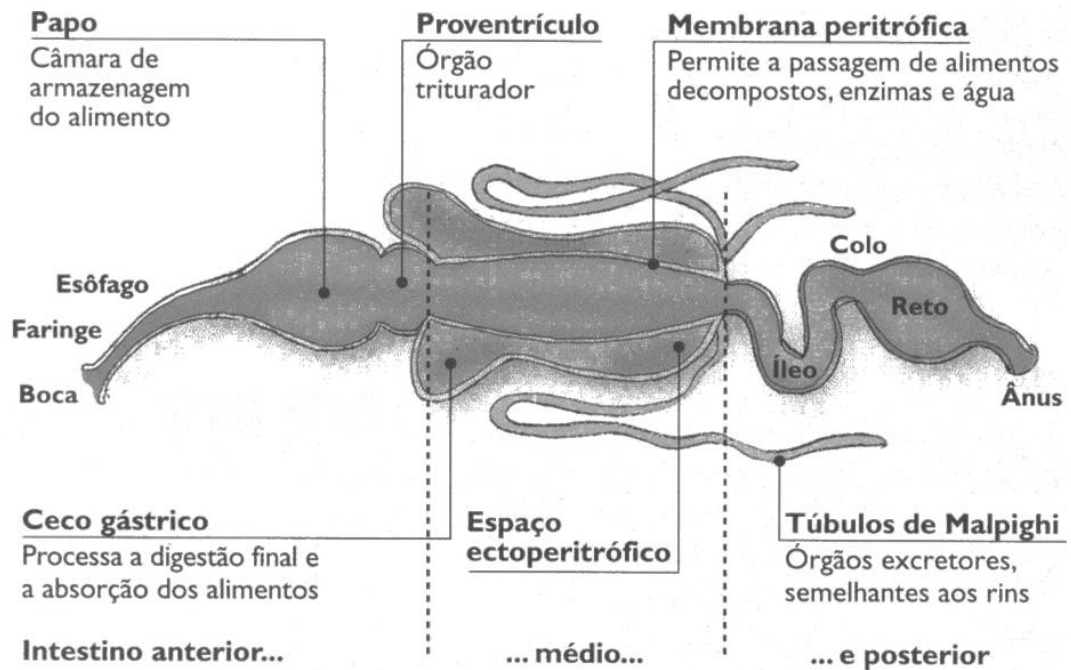


Figura 1. Esquema geral do intestino médio de um inseto (adaptado de Terra e Ferreira, 1994)

tripsina é recuperada no lúmen do intestino médio anterior, sendo que a maioria do *mRNA* para tripsina é encontrada na porção mediana do intestino médio. Estes resultados levaram à proposição de que essa enzima é secretada por células da porção mediana do intestino médio e carregada pelo espaço ectoperitrófico para o intestino médio anterior. Esta organização espacial do processo digestivo é provavelmente comum à maioria das larvas de lepidópteros, parecendo também ser similar em adultos (Ferreira *et al*, 1994).

Os principais grupos de enzimas digestivas dos insetos são constituídos pelas lipases, carboidrases e proteases, sendo este último grupo bem mais caracterizado.

2.4. Proteases de insetos

As proteases digestivas são encontradas na região do intestino médio dos insetos e catalisam a clivagem de ligações peptídicas das proteínas, liberando peptídeos e aminoácidos. As peptidases (ou peptídeo hidrolases) agem em ligações peptídicas e neste grupo estão incluídas as proteases (endopeptidases) e exopeptidases. As proteases são classificadas da seguinte maneira, de acordo com o seu mecanismo de catálise, estrutura tridimensional e com os resíduos de aminoácidos presentes no centro ativo: (1) serino-proteinases, com um aminoácido serino e outro histidina; (2) cisteíno-proteinases, com uma cisteína; (3) aspártico-proteinases, com um grupo aspartato e (4) metallo-proteinases, com um íon metálico (Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mn^{2+}) (Neurath, 1984; Mares-Guia e Shaw, 1965; Franco *et al.*, 1999).

Há uma grande diversidade de proteases e estas são divididas em dois grupos principais, exopeptidases e endopeptidases. As exopeptidases hidrolisam as ligações peptídicas próximas aos grupamentos amino ou carbóxi terminal no substrato, enquanto as endopeptidases caracterizam-se por clivar ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato (Mares-Guia e Shaw, 1965, Rao *et al.*, 1998).

Insetos fitófagos apresentam serino e cisteíno-proteases como principais enzimas digestivas (Haq *et al.*, 2004) sendo que em afídeos, as proteases presentes

no trato digestivo são apenas do tipo cisteíno-proteases. Nesses insetos, a atividade dos IP's não é significativa porque sua dieta é à base de nitrogênio solúvel com baixa quantidade de proteína. Em coleópteros, há uma ampla faixa de proteases intestinais enquanto em lepidópteros as serino-proteases são as mais comuns. Entre as serino-proteases, as tripsinas e quimiotripsinas são as enzimas mais comumente encontradas (Oliveira *et al.*, 2005) e que participam de uma grande diversidade de processos fisiológicos que incluem, além da digestão, ativação de proteínas específicas, como nas cascatas de coagulação, no sistema imune de insetos e plantas (Wilson *et al.*, 1997), desenvolvimento e produção de peptídeos biologicamente ativos (Gill *et al.*, 1996).

As tripsinas clivam, preferencialmente, as ligações peptídicas internas no lado carboxila de L-aminoácidos básicos como arginina (Arg) e lisina (Lys), sendo irreversivelmente inibidas pelo TLCK que promove a alquilação da histidina. O valor da massa molecular das tripsinas varia entre 20 e 35 KDa e seus valores de pI estão entre 4-5. Seu pH ótimo é alcalino entre 8-9 (Mares-Guia e Shaw, 1965). Em geral, as tripsinas isoladas de lepidópteros possuem os valores para pH de maior atividade superior aos valores de pH encontrados no intestino médio da maioria dos insetos (Lemos *et al.*, 1992). Algumas das propriedades das tripsinas de insetos assemelham-se às dos vertebrados, contudo algumas características podem ser contrastantes como os valores do pH de maior atividade, o peso molecular, a sensibilidade iônica, o ponto isoelétrico e a sensibilidade aos inibidores de protease de plantas (Oliveira *et al.*, 2005). Foi verificado que os íons cálcio não causam aumento da atividade ou da estabilidade das tripsinas de insetos e que elas são instáveis em pH ácido (Sakal *et al.*, 1988) O efeito dos íons cálcio foi avaliado na atividade das proteases presentes no intestino de *A. gemmatalis*, onde foi observado um aumento de atividade na

presença de 10-30 mM de CaCl₂ (Oliveira *et al.*, 2005). Em vertebrados, o íon cálcio impede a agregação de moléculas da enzima, protegendo-a da autólise e desnaturação pelo calor, induzindo uma mudança conformacional em sua estrutura para uma forma mais compacta, a qual é necessária para a atividade catalítica (Sipos e Merkel, 1970).

Oliveira *et al.* (2005) purificaram e caracterizaram bioquimicamente e cineticamente as proteases solúveis extraídas do intestino médio de *A. gemmatalis*. A fração parcialmente purificada mostrou três bandas com atividade proteolítica e massas moleculares de 66 KDa, 71 KDa e 91 KDa em gel SDS-PAGE. Ensaio de especificidade enzimática utilizando 7 peptídeos sintéticos com 13 resíduos de aminoácidos diferenciados apenas pelo 5º resíduo foram realizados tendo a tripsina e a quiniotripsina como controle. Somente os peptídeos contendo os aminoácidos lisina e arginina (específicos para tripsina) foram clivados pela tripsina e pela enzima purificada demonstrando que o intestino médio de *A. gemmatalis* apresenta uma serino-protease tripsina-*like*.

Xavier *et al.* (2005) identificaram e caracterizaram proteases ligadas à membrana do intestino médio de *A. gemmatalis* e demonstraram que o extrato insolúvel foi capaz de hidrolisar caseína e outros substratos sintéticos (L-BApNA e L-TAME). A atividade enzimática também foi investigada na presença de inibidores utilizando L-BApNA como substrato. EDTA, PMSF e TLCK inibiram a atividade da enzima, mas a maior inibição ocorreu com os inibidores benzamidina e aprotinina, concluindo-se que na membrana do intestino médio de *A. gemmatalis* estão ligadas enzimas tripsina-*like*.

As quimiotripsinas são serino-proteases tripsina-like que clivam proteínas nos grupos carboxila presentes nos aminoácidos aromáticos e é inibida por TPCK. A atividade da quimiotripsina é baixa no intestino médio de lepidópteros. Sua massa molecular varia entre 20 e 30 KDa e seu pH de maior atividade varia entre 8-9 (Terra e Ferreira, 1994). A quimiotripsina de insetos é instável em pH ácido e é fortemente inibida por SBTI (Sakal *et al.*, 1988).

Cisteíno-proteases são enzimas proteolíticas que agem via ataque nucleofílico pelo ânion sulfeto, no sítio ativo, à ligação peptídica (Kunakbaeva *et al.*, 2003). O sítio ativo de uma cisteíno protease é composto por um resíduo de cisteína, um de asparagina e um de histidina na tríade catalítica. O ataque nucleofílico pelo grupo tiol da cisteína ao carbono da carbonila no substrato, resulta num intermediário tetraédrico. Uma ligação covalente acil-enzima é formada após a clivagem da ligação peptídica. A hidrólise da acil-enzima leva à regeneração da enzima livre (Baird *et al.*, 2006).

2.5. Inibidores de proteases

A resistência de plantas a insetos e patógenos pode incluir a síntese de diversos compostos relacionados ao metabolismo secundário das plantas, dentre eles os antibióticos, os alcalóides e os terpenos (Franco *et al.*, 1999), além de compostos proteínáceos, os quais incluem enzimas como β -1,3-glucanases e quitinases, lecitinas, polifenóis oxidases (PPO's), inibidores de proteases (IP's) e de α -amilases (Bernays, 1990; Valueva e Mosolov, 2004). Em resposta à injúria, as proteínas produzidas podem ter um papel direto ou indireto (i) na limitação do dano induzido pelo ataque de insetos; (ii) no extermínio de patógenos oportunistas que invadem os locais injuriados e (iii) no desenvolvimento da resistência induzida que protege a

planta de subseqüentes ataques de insetos e patógenos (Walling, 2000; Silva *et al.*, 2002, 2004; Monteiro *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2004, 2005).

As α -amilases são endoamilases responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos e sua inibição impede o desenvolvimento e crescimento de muitos insetos (Franco *et al.*, 1999). O mecanismo de ação dos inibidores de α -amilases ainda não foi totalmente desvendado, mas sabe-se que a atividade inibitória depende tanto do pH quanto do tempo de exposição da enzima ao inibidor.

Inibidores de α -amilase ocorrem em muitas espécies de plantas, sendo abundantes em cereais e legumes, como parte natural do mecanismo de defesa. Os inibidores de α -amilase podem ser reconhecidos como substratos somente por enzimas de alguns herbívoros e ser hidrolisados, portanto esses inibidores não são efetivos contra todos os insetos (Franco *et al.*, 1999). As proteases do intestino médio de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera) são capazes de hidrolisar a subunidade β do inibidor por proteólise limitada e a clivagem é específica e irreversível, impedindo o inibidor de exercer a sua função (Michaud, 1997; Silva *et al.*, 2001; Carlini e Grossi-de-Sá, 2002). Uma das explicações mais convincentes para esse fenômeno está no fato de que coleópteros e lepidópteros apresentam pH intestinal em faixas diferentes. O pH intestinal de coleópteros é ácido, ao passo que o de lepidópteros é alcalino (Terra e Ferreira, 1994).

Contudo, compostos proteináceos, como os inibidores de proteases, passaram a ser considerados como uma forma de resistência de plantas a partir de 1962, quando Clarence Ryan, um bioquímico da Universidade de Washington, e seus colaboradores observaram que extratos de tuberos de batata inibiram a atividade da

quimiotripsina *in vitro* (Ryan, 1992). Até então, tais compostos permaneciam como um mistério, pois sua presença em plantas não havia sido explicada. Somente em 1972, Ryan suspeitou que fatores ambientais deveriam estar envolvidos na regulação desses compostos químicos e que eles teriam um papel de defesa na planta (Karban e Baldwin, 1997). Nesse mesmo ano, Green e Ryan (1972) publicaram um trabalho demonstrando injúrias promovidas pelo besouro da batata do Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, a folhas jovens de batata ou tomate induziram a rápida acumulação de inibidores de proteases nesses tecidos. Essa resposta também teria sido produzida quando essas mesmas folhas foram submetidas à injúria mecânica. A partir de então, diversos trabalhos têm sido realizados para verificar a presença e atividade desses compostos em plantas e seu efeitos sobre insetos e patógenos. Valueva e Mosolov (2004) realizaram alguns bioensaios com folhas de tomate *Lycopersicon esculentum* e verificaram que as folhas injuriadas por microorganismos foram induzidas a sintetizar 20 proteínas diferentes quando comparadas às folhas que não sofreram qualquer tipo de injúria.

Em tecidos mais vulneráveis ao ataque do herbívoro, os inibidores de proteases são defesas constitutivas, como nas sementes em que também podem ser utilizadas como proteínas de reserva, ou podem ser induzidas por danos mecânicos, por exemplo, quando o inseto se alimenta de uma folha (Silva-Filho e Falco, 2000). A expressão dos inibidores de protease é regulada durante o desenvolvimento ontogenético da planta ou por variáveis ambientais como a intensidade da luz ou a concentração de CO₂ (Broadway e Missurelli, 1990).

Os mais alto níveis de IP's foram encontrados em folhas jovens de plantas efêmeras (Silva *et al.*, 2002; Haq *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2005) ou em folhas

jovens de plantas maduras (Broadway e Missurelli, 1990), o que demonstra o maior investimento da planta para defender suas partes mais nutritivas e, conseqüentemente, mais expostas à herbivoria. Os IP's ocorrem como proteínas transientes que se acumulam localmente ou distalmente em resposta à injúria, como, por exemplo, nas folhas de tomate e batata, aonde chega a atingir concentrações de 200 $\mu\text{g/g}$. Cerca de 3 a 4 h após a injúria, os níveis de *mRNA* responsáveis pela tradução dos IP's elevam-se nas folhas injuriadas e não injuriadas localizadas nas porções distais à injúria. Os níveis de *mRNA* se elevam por até 8 h após uma única injúria e têm uma meia-vida de cerca de 12 h. Após a tradução pelo *mRNA*, os inibidores de proteases são acumulados no vacúolo central das células vegetais, persistindo por até 1 semana (Karban e Baldwin, 1997).

Localmente, os IP's são ativos contra nematóides, vírus, bactérias, fungos, ácaros e lesmas (Haq *et al.*, 2004), podendo ter um efeito protetivo cumulativo em plantas ao agir sobre diferentes organismos simultaneamente. Plantas de *Arabidopsis thaliana* modificada com o gene cistatina Oc-I delta D86 de uma variedade de arroz promoveram a perda da atividade de cisteíno-proteínases do intestino de duas espécies de nematóides, *Heterodera schachtii* e *Meloidogyne incognita*, resultando na redução do tamanho e da fecundidade das fêmeas dessas espécies (Haq *et al.*, 2004).

A classificação dos inibidores de proteases é baseada nos aminoácidos ativos presentes no centro reativo do inibidor e na especificidade para cada uma das quatro classes mecanicistas de enzimas proteolíticas, serino, cisteíno, aspártico e metalo-proteases (Haq *et al.*, 2004). Já foram encontrados em plantas, IP's para cada

uma das quatro classes de enzimas proteolíticas, mas os mais bem estudados são os inibidores de serino-proteases.

2.6. Inibidores de serino-proteases (EC 3.4.21)

Inibidores de serino-proteases são amplamente distribuídos no reino vegetal e já foram descritos em muitas espécies de plantas. Há um grande número de inibidores de serino-proteases conhecidos e parcialmente caracterizados, uma vez que esta é a classe de inibidores mais amplamente estudada (Haq *et al.*, 2004). Os inibidores de serino-proteases são encontrados principalmente em plantas das famílias Brassicaceae, Curcubitaceae, Fabaceae, Salicaceae, Glycinaceae, Leguminosae e Solanaceae (Karban e Baldwin, 1997). O papel fisiológico dos inibidores de serino-proteases nas plantas inclui a, (i) regulação das proteinases endógenas durante a dormência das sementes, (ii) imobilização das proteínas de reserva, (iii) proteção contra as enzimas proteolíticas de parasitas e insetos e (iv) proteínas de reserva (Haq *et al.*, 2004).

As diversas classes de inibidores de proteases foram subdivididas em várias famílias baseando-se na extensiva homologia entre seus membros, nas relações topológicas entre as pontes dissulfeto e a localização do sítio reativo (Laskowski e Kato, 1980). A princípio, os inibidores de serino-proteases de plantas foram agrupados em quatro famílias: (i) família do inibidor de tripsina (Kunitz) de soja, (ii) família do inibidor de protease (Bowman-Birk) de soja, (iii) família do inibidor I de batata e (iv) família do inibidor II de batata (Laskowski e Kato, 1980). No ano de 1985, foram criadas duas outras famílias, a do inibidor de tripsina de abóbora e a família do inibidor de tripsina e α -amilase que é característica de sementes de cereais (Wieczorek *et al.*, 1985). Essa família inclui diversas proteínas

como o inibidor de protease da cevada (Odani *et al.*, 1983) e do milho (Mahoney *et al.*, 1984), o inibidor de α -amilase do trigo (Kashlan *et al.*, 1981) e duas proteínas da cevada, solúveis em clorofórmio-metanol (Paz-Are *et al.*, 1986).

As duas mais bem caracterizadas famílias de inibidores de serino-proteases são os inibidores de tripsina da soja, dos tipos Kunitz (KTI) e Bowman-Birk (BBI). Nos grãos de soja, os inibidores de tripsina correspondem a 6% do total de proteína (Brandon e Friedman, 2002), sendo que cerca de 80% da inibição da atividade triptica nos grãos é causada pela ação do KTI e 20% pela ação do BBI (Brandon *et al.*, 1989). Inibidores KTI têm alta massa molecular entre que varia de 18 a 22 kDa, apresentando estrutura primária constituída por 181 resíduos de aminoácidos, um único sítio reativo que se liga à tripsina, uma ou duas cadeias polipeptídicas e baixo conteúdo de cistina. Esses inibidores usualmente contêm quatro resíduos de cisteína em duas pontes dissulfeto que, uma vez rompidas, acarretam a perda da atividade biológica desse inibidor. A modificação da posição P₁' no sítio reativo, pela inserção de uma simples molécula de glicina é suficiente para inativar o inibidor (Kowalski e Laskowski Jr, 1976; Sealock e Laskowski Jr, 1976; Brandon *et al.*, 1989; Birk 1996). Um único gene é responsável por codificar o inibidor acumulado nas sementes (Jofuku e Goldberg, 1989), e linhagens em que esse gene foi silenciado não acumulam KTI já foram identificadas (Bernard e Hymowitz, 1986; Orf e Hymowitz, 1979). A variedade contendo o gene silenciado para KTI foi introgridida em uma variedade de soja chamada Kunitz, e foi demonstrada uma redução nos efeitos antinutricionais dessa variedade de soja (Cook *et.al.*, 1998; Orf e Hymowitz, 1979).

Os inibidores do tipo Bowman-Birk apresentam baixa massa molecular, variando de 8 a 10 kDa, um alto conteúdo de cistina e dois sítios reativos por

molécula (Xavier-Filho e Campos, 1989; Birk, 1996), cada um com especificidade para uma faixa de serino endopeptidases como tripsina, quimiotripsina e elastase (Birk, 1985). No mínimo três genes codificam esses inibidores para produzir uma família de isoformas (Hwang *et.al.*, 1977; Spencer *et.al.*, 1984; Tan-Wilson *et.al.*, 1987). Devido ao fato de múltiplos genes controlarem a acumulação do inibidor BBI, a redução nas propriedades antinutricionais da família de isoinibidores BBI é mais difícil que no caso de KTI, que são controlados por um único gene.

2.7. Ação dos inibidores de proteases em insetos

O modo de ação dos IP's consiste em formar complexos as enzimas proteolíticas, resultando na sua inativação (Figura 2) (Mosolov *et al.*, 2001). A inibição de uma enzima proteolítica é competitiva e ocorre pela ligação do sítio ativo da enzima à região reativa do inibidor (sítio reativo) no intestino médio do inseto (Silva-Filho e Falco, 2000), formando complexos estáveis com as proteases alvo, bloqueando, alterando ou prevenindo o acesso ao sítio ativo da enzima (Haq *et al.*, 2004).

Os inibidores de proteases são altamente específicos, limitando a proteólise do substrato às suas enzimas cognatas (Karban e Baldwin, 1997). Os inibidores de proteases (IP's) são proteínas que inativam endopeptidases e exopeptidases e podem atuar defensivamente na planta contra herbívoros que contam com enzimas pertencentes a esses grupos, muitas das quais envolvidas em processos digestivos. A atividade dos inibidores de proteases se deve à sua capacidade de formar complexos estáveis.

O mecanismo da interação entre os inibidores e as serino proteases foi revisto por Laskowski e Kato (1980). Esse mecanismo envolve a formação de um complexo entre a enzima e o inibidor semelhante ao formado entre a enzima e seu substrato. A interação ocorre entre uma ligação peptídica na superfície da molécula do inibidor, chamada sítio reativo, e o sítio ativo da enzima. O valor de k_{cat}/K_M para a hidrólise

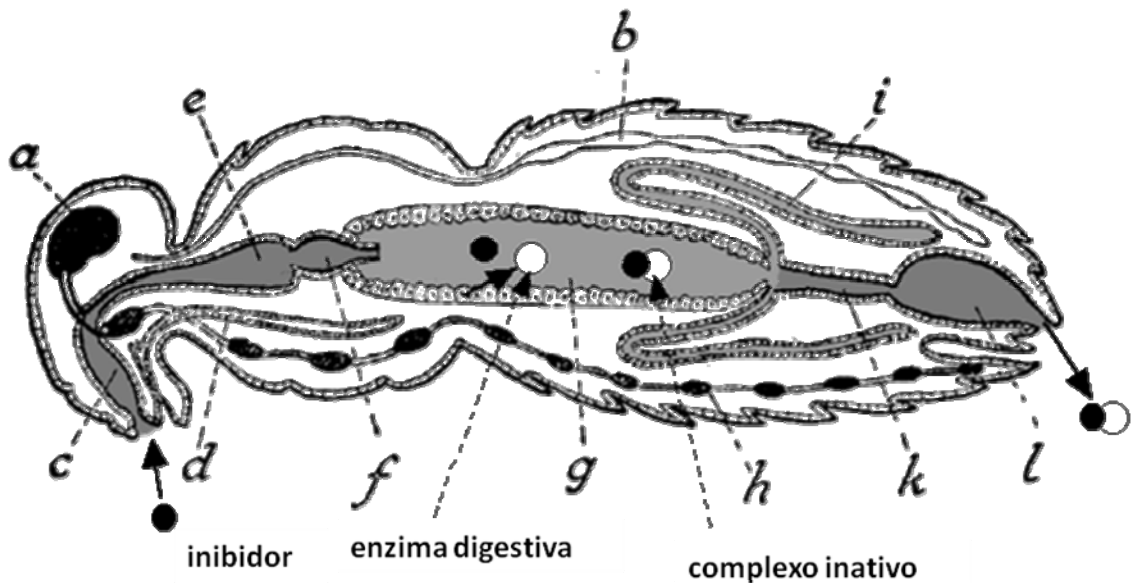
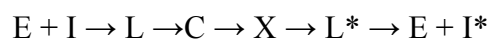


Figura 2. Esquema do corte longitudinal de um inseto mostrando a formação do complexo inativo enzima-inibidor no intestino médio (adaptado de Gatehouse e Gatehouse, 2000)

dessa ligação peptídica pela enzima a pH neutro é muito alto, $10^4-10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Estell *et al.*, 1980), comparado a um valor típico do substrato normal de $10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$. Para a hidrólise de um inibidor de protease, os valores de K_{cat} e K_M são muitas ordens de magnitude abaixo que os valores para o substrato normal (Laskowski e Kato, 1980). Por essa razão, a ligação é lentamente hidrolisada e o sistema se comporta como se estivesse em equilíbrio, a enzima e o inibidor de um lado e o complexo enzima-inibidor do outro com uma constante de equilíbrio resultante muito alta (10^7 a 10^{13} M^{-1}). A hidrólise da ligação peptídica do sítio reativo não é completa; em pH neutro há um equilíbrio entre o inibidor modificado (com a ligação clivada do sítio reativo) e o inibidor não modificado (com a ligação intacta), de forma que a constante de

equilíbrio esteja próxima de uma unidade. O mecanismo total da interação enzima-inibidor, incluindo apenas aqueles 21 intermediários cujas existências foram definitivamente confirmadas, pode ser escrito como (Laskowski e Kato, 1980):



em que E é a enzima; I e I* são os inibidores não modificados e modificados, respectivamente; L e L* são complexos não covalentes (rapidamente dissociáveis) de E com I e I*, respectivamente; X é um intermediário de relativa vida longa, e C é o complexo estável da enzima-inibidor.

As análises de cristalografia de raios-X dos complexos estáveis de vários inibidores com as enzimas demonstraram que o sítio reativo do inibidor reage com o sítio ativo da enzima de forma semelhante ao substrato (McPhalen *et al.*, 1985). Em cada caso ocorrem inúmeros contatos entre a enzima e o inibidor, o que leva a um ajuste otimizado, embora uma pequena adaptação conformacional do inibidor (presumivelmente no passo $L \rightarrow C$) aconteça. Durante o contato entre a enzima e o inibidor, numerosas interações de Van der Waals, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas são formadas.

Hixson e Laskoeski (1970) sugeriram que o inibidor de tripsina e as proteases formem um intermediário acil-enzima. Blow e Steiz (1970) descrevem que a deslocalização de cargas negativas no centro ativo da enzima contribui para a estabilização de um carbono tetraédrico.

Subseqüentemente, tomando-se como base dados mais refinados de cristalografia de raios-X, a formação de um carbono covalente tetraédrico está fora de questão e foi concluído que um complexo não covalente foi formado onde o carbono da carbonila da Lys-15 do inibidor de tripsina assumia uma estrutura

tetraédrica distorcida intermediária entre a hibridação sp^2 e sp^3 e que o átomo de O^γ da Ser-195 da tripsina era o causador da distorção tetraédrica (Hüber *et al.*, 1974).

Essa visão foi abandonada quando se percebeu o que ocorre com a anidrotripsina, um derivado cataliticamente inativo da tripsina que forma complexo estável com o inibidor de força comparável e essencialmente com a mesma geometria (Ako *et al.*, 1974) e com distorção tetraédrica precisamente igual à de um complexo com a tripsina (Hüber *et al.*, 1974). Todavia, a distorção tetraédrica parcial ocorre. Acredita-se atualmente que a distorção é o resultado da atração entre o oxigênio da carbonila do inibidor e a cavidade oxianiônica (Kraut, 1977) da tripsina. O carbono da carbonila do inibidor é agora posicionado para ataque nucleofílico pelo oxigênio O^γ da Ser-195 da enzima, mas no complexo estável anidrotripsina e inibidor o ataque não ocorre. É importante observar que os resultados de estudos de cristalografia de raios-X (Laskowski e Kato, 1980; Read *et al.*, 1983) e ressonância magnética nuclear ^{13}C (Baillargeon *et al.*, 1980) em complexos isolados não mostraram a existência de um átomo de carbono tetraédrico no sítio reativo do inibidor nos complexos isolados.

Os inibidores de proteases são considerados agentes antimetabólicos levando a uma deficiência protéica nos insetos. Sua atividade antibiótica é atribuída à interferência na digestão protéica que diminui a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto (Oliveira *et al.*, 1993; Silva-Filho e Falco, 2000; Xavier *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005). No entanto, a interferência na digestão protéica pode ser parte de um processo mais elaborado. Um mecanismo de *feedback* leva o inseto à hiperprodução de proteases para compensar a perda de atividade de suas enzimas digestivas (Silva-Filho e Falco, 2000; Oliveira *et al.*, 2005). A hiperprodução de

proteases promove depleção dos aminoácidos essenciais ao metabolismo do inseto, resultando no retardo do seu crescimento (Oliveira *et al.*, 2005). Nos casos em que a enzima também está envolvida em processos como o de muda e na síntese de neuropeptídeos, os inibidores perturbariam essa atividade, retardando o crescimento e o desenvolvimento da larva (Karban e Baldwin, 1997).

2.8. Benzamidinas

A benzamidina é uma amida aromática (Figura 3A), inibidor sintético competitivo da tripsina, apresentando K_i de 1,0 mM (Mares-Guia *et al.*, 1981). A benzamidina, quando presente no meio reacional em baixas concentrações, posiciona-se no sítio de especificidade, sítio S_1 da tripsina, onde é estabilizada por interações hidrofóbicas no bolso hidrofóbico e por interações eletrostáticas entre seu grupamento amidina e um resíduo carboxílico pertencente a um ácido aspártico localizado no fundo do bolso do sítio S_1 (Mares-Guia e Shaw, 1965; Mares-Guia *et al.*, 1981, Oliveira *et al.*, 1993).

O berenil (aceturato de diminazeno) é uma molécula formada por duas moléculas de benzamidina ligadas por meio de uma ligação triazeno na posição 4 de cada anel (Figura 3B). A ligação triazeno é susceptível à clivagem resultando na formação de 4-aminobenzamidina e um sal 4-amidinofenildiazônio (Raether *et al.*, 1974). O berenil comporta-se como um inibidor parcialmente competitivo parabólico da tripsina (Junqueira *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1993) apresentando K_i de 1,79 μ M. e tem sido utilizado com sucesso no tratamento de uma variedade de infecções tripanossômicas quando administrado intramuscularmente em animais de interesse agrônômico como gado, ovelhas, cabras, porcos e cavalos (Peregrine e Mamman, 1993). O berenil é registrado para uso veterinário não sendo atualmente aprovado

para uso em humanos (Bouteille *et al.*, 2003) embora consista em uma alternativa para o tratamento contra *Trypanosoma brucei gambiense* e *T. b. rhodesiense* quando administrados por injeção intramuscular (Hutchinson e Watson, 1962; Temu 1975; Abaru e Matovu 1981). Quaisquer efeitos colaterais observados para o berenil foram temporários e não foram mais prejudiciais que aqueles notados para suramina (Abaru *et al.*, 1984) ou pentamidina (Bouteille *et al.*, 2003), utilizadas para esse tipo de enfermidade. Adicionalmente, os custos e o período de tratamento com berenil são menores que os dos medicamentos aprovados atualmente. Embora tenha sido observada atividade anti-tripanosossômica do berenil após sua administração oral em humanos (Bailey, 1968), foi verificada diminuição significativa na concentração do medicamento no estômago como resultado da degradação da molécula de berenil por catálise ácida (Figura 4), limitando a quantidade de ingrediente ativo absorvido pela circulação sanguínea. A hidrólise do berenil ocorre numa faixa de pH de 1 a 8, sendo que a maior degradação ocorre em pH 7,0 (Campbell *et al.*, 2004).

A maioria dos insetos apresenta pH intestinal entre 6 e 7, mas lepidópteros apresentam pH intestinal alcalino em torno de 10 (Terra e Ferreira, 1994), indicando que o pH não é um fator que impede a utilização do berenil como inibidor de proteases para insetos dessa ordem.

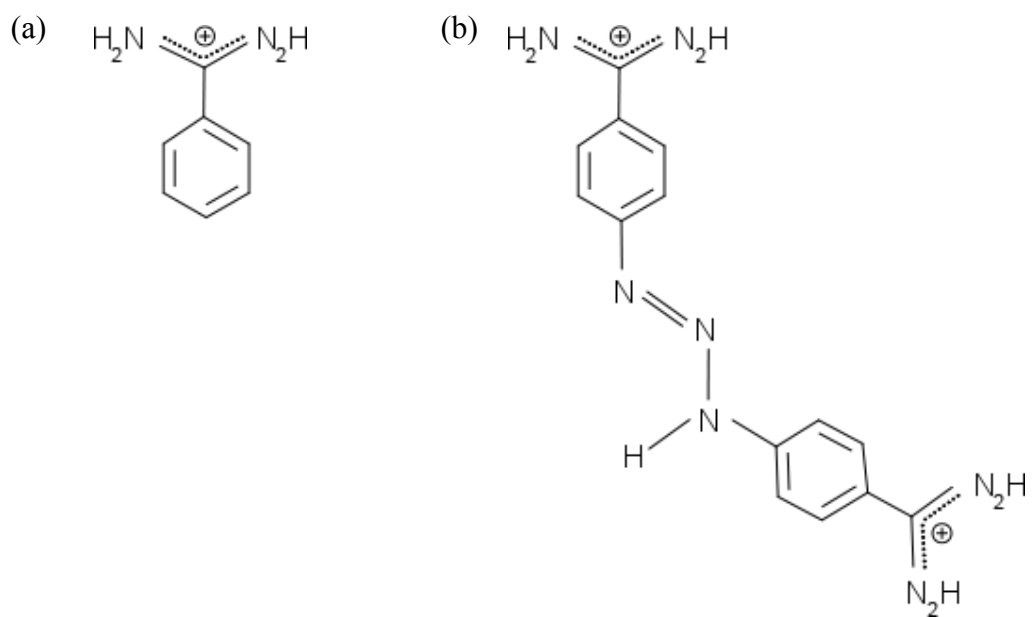


Figura 3. Estruturas da benzimidina (A) e do berenil (B).

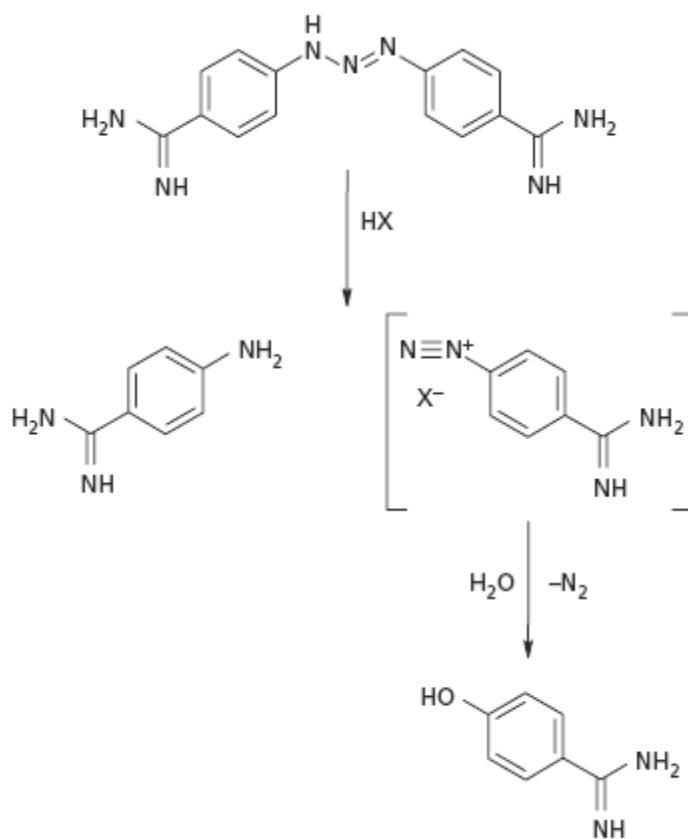


Figura 4. Rota da degradação do berenil por catálise ácida

3. Referências bibliográficas:

- Ako, H., Foster, R.J., Ryan, C.A. 1974. Mechanism of action of naturally occurring proteinase inhibitors. Studies with anhydrotrypsin and anhydrochymotrypsin purified by affinity chromatography. *Biochemistry*, 13:132-139.
- Baillargeon, M.W., Laskowski, Jr. M., Neves, D.E., Porubcan, M.A., Markley, J.L. 1980. Soybean trypsin inhibitor (kunitz) and its complex with trypsin. Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies of the reactive site arginine, *Biochemistry*, 19: 5703-5708.
- Baird, I.R., Mosi, R., Olsen, M., Cameron, B.R., Fricker, S.P., Skerlj, R.T. 2006. '3 + 1' mixed-ligand oxorhenium(V) complexes and their inhibition of the cysteine proteases cathepsin B and cathepsin K. *Inorgânica Chemica Acta* 359: 2736-2750.
- Baldwin, I.T., 2001. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. *Plant Physiology* 127(4): 1449-1458.
- Bernard, R.L., Hymowitz, T. 1986. Registration of L81-4590, L81-4871, and L83-4387 soybean germplasm lines lacking the Kunitz trypsin inhibitor. *Crop Science* 26: 650-651.
- Bernays, E.A., Chapman, R.F. 1984. Host-plant selection by phytophagous insects (ed.) 1990. Chapman e Hall, New York, 312p.
- Birk, Y. 1985. The Bowman-Birk inhibitor. *International Journal of Peptides and Protein Ressearch* 25: 113-131.
- Birk, Y. 1996. Protein proteinase inhibitors in legume seeds-overview. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 44(4): 26-30.
- Blow, D.M., Steitz, T.A. 1970. X-Ray difraction studies of enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 39: 63-96.
- Brandon, D.L., Bates, A.H., Friedman, M. 1989. M. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay of the Bowman-Birk protease inhibitor of soybeans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37: 1192-1196.
- Brandon, D.L., Friedman, M. 2002. Immunoassays of soy proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6635-6642.
- Broadway, R.M., Missurelli, D.L., 1990. Regulatory mechanisms of tryptic inhibitory activity in cabbage plants. *Biochemistry* 29(12): 3721-3725.
- Campbell, M., Pranker, R.J., Davie, A.S., Charman, W.N., 2004. Degradation of berenil (diminazene acetate) in acidic aqueous solution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56: 1-6.

Carlini, C.R., Grossi-De-Sá, M.F., 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40: 1515-1539.

Cook, D.A., Jensen, A.H., Farley, J.R., Hymowitz, T. 1988. Utilization by growing and finishing pigs of raw soybeans of low Kunitz trypsin inhibitor content. *Journal of Animal Sciences* 66: 1686–1691.

Ehrlich, P.R., Raven, P.H., 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, 18(4): 586-608.

Elisor, L.O., 1942. Notes on the biology and control of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner. Louisiana Agricultural Experimental Station Bulletin 350: 15-25.

EMBRAPA-CNPSO, Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Soja, 1995. Manejo de pragas da soja. Circular Técnica da EMBRAPA – CNPSO, 5, 44p.

EMBRAPA-CNPSO, Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Soja, 2006. Tecnologia de produção de soja – região central do Brasil 2007. Londrina. 225p.

Estell, D.A., Wilson, K.A., Laskowski, M. Jr 1980. Thermodynamics and kinetics of hydrolysis of the reactive-site peptide bond in pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz) by *Dermasterias imbricata* trypsin. *Biochemistry*, 19:131-37.

Ferreira, C., Capella, A.N., Sitnik, R., Terra, W.R., 1994. Properties of digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 107(4): 631-640.

Ferreira, C.C.A., Oliveira, M.G.A., Oliveira, J.A., Almeida, F.T., Pires, C.V., Piovesan, N.D., Moreira, M.A., 2004. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à remoção dos primórdios florais.. *Ciência e Agrotecnologia*, 28(2): 263-270.

Ferreira, C.C.A., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Guedes, R.N.C., Almeida, F.T., Silva, C.H.O., Moreira, M.A., 2005. Lack of seed lipoxigenases does not affect soybean defense against removal of reproductive tissue. *Bioscience Journal (UFU)* 21(1): 49-55.

Ford, B.J., Strayer, J.R., Godfrey, G.L., 1975. The literature of arthropods associated with soybean. IV. A bibliography of the velvetbean caterpillar *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera Noctuidae). *Natural History Survey* 92: 15p.

Fortunato, F.S., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Zanuncio, J.C., Oliveira, J.A., Almeida, F.T., Pilon, A.M., Sediyaama, C.S., Moreira, M.A., 2004. Effect of the *Anticarsia gemmatilis* injury on the lipoxigenases activity from soybean leaves. *Bioscience Journal* 20(2): 37-46.

Fortunato, F.S., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Silva, C.H.O., Guedes, R.N.C., Moreira, M.A.M., 2007. Lipoxigenase-induced defense of soybean varieties to the

attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). Journal of Pest Science. (Aceito para publicação)

Franco, O.L., Melo, F.R., Silva, M.C.M.da, Sá, M.F.G.de., 1999. Inibidores de enzimas digestivas e a obtenção de plantas resistentes. Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento 11: 36-40.

Franco, O.L., Rigden, D.J., Melo, F.R., Grossi-de-Sá, M.F., 2002. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases-structure, function and potential for crop protection. European Journal of Biochemistry 269(2): 397-412.

Gill, I., López-Fandiño, R., Jorba, X., Vulfson, E.N. 1996. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. Enzyme and Microbial Technology 18: 162-183.

Green, T.R., Ryan, C.A. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. Science 175: 776-777.

Greene, G.L., Reid, J.C., Blount, V.N., Riddle, T.C., 1973. Mating and oviposition behavior of the velvetbean cartepillar in soybean. Environmental Entomology 2: 1113-1115.

Guyton, F.E., 1940. An outbreak of the velvetbean caterpillar in Alabama with data on control. Journal of Economic Entomology 33(4): 635-639.

Haq, S.K., Atif, S.M., Khan, R.H., 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. Archives of Biochemistry and Biophysics 431(1): 145-159.

Hilder, V.A., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F., Boulter, D. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature. 300:160-160.

Hinds, W.E., Osterberger, B.A., 1931. The soybean caterpillar in Lousiana. Journal of Economic Entomology 24:1168-1173.

Hixson, H.F., Laskowski, M. Jr. 1970. Formation from trypsin and modified soybean trypsin inhibitor of a complex which upon kinetic control dissociation yields trypsin and virgin inhibitor Journal of Biological Chemistry, 245: 2027-2031.

Hüber, R., Kukla, D., Bode, W., Schwager, P., Bartels, K., Deisennhofer, J., Steigermann, W. 1974. Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II – Crystallographic refinement at 1,9 Å resolution. Journal of Molecular Biology, 89: 73-101.

Hwang, DL-R, Lin, K-TD, Yang, W-K, Foard, D.E. 1977. Purification, partial characterization, and immunological relationships of multiple low molecular weight protease inhibitors of soybean. Biochimica et Biophysica Acta 495: 369–382.

- Jofuku, K.D., Goldberg, R.B. 1989. Kunitz Trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the Soybean life cycle and in transformed tobacco plants. *Plant Cell* 1: 1079–1093.
- Junqueira, R.G., Silva, E., Mares-Guia, M. 1992. Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 25(9): 873-887.
- Karban, R., Agrawal, A.A., Thaler, J.S., Adler, L.S., 1999. Induced plant responses and information content about risk of herbivory. *TREE* 14(11): 443-7.
- Karban, R., Baldwin, I.T., 1997. *Induced responses to herbivory*. Chicago University Press, 319 p.
- Kashlan, N., Richardson, M. 1981. The complete amino acid sequence of a major wheat protein inhibitor of α -amylase, *Phytochemistry*, 20(8): 1781-1784.
- Kessler, A., Baldwin, I.T., 2002. Plant response to insect herbivory: the emerging molecular analysis. *Annual Review of Plant Biology* 53: 299-328.
- Kogan, M., Turnipseed, S.G., 1987. Ecology and management of soybean arthropods. *Annual Review of Entomology* 32: 507-538.
- Kowalski, D., Laskowski, M.Jr. 1976. Chemical-enzymatic replacement of Ile64 in the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Biochemistry* 15: 1300–1309.
- Kraut, J. 1977. Serine protease: Structure and mechanism of catalysis. *Annual Review of Biochemistry*, 46: 331-358.
- Kunakbaeva, Z., Carrasco, S., Rozas, I. 2003. An approximation to the mechanism of inhibition of cysteine proteases: nucleophilic sulfur addition to Michael acceptors type compounds. *Journal of Molecular Structure* 626: 209-216.
- Laskowski Jr., M., Kato, I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry* 49: 593-626.
- Lemos, F.J.A., Terra, W.R. 1992. Soluble and membrane-bound forms of trypsin-like enzymes in *Musca domestica* larval midguts. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22: 613-619.
- Leppla, N.C., 1976. Circadian rhythms of locomotion and reproductive behavior in adult velvetbean caterpillar. *Annals of the Entomological Society of America* 69(1): 45-48.
- Magrini, E.A., Botelho, P.S.M., Silveira Neto, S., 1999. Biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) in the soybean crop. *Scientia Agricola* 56(3): 547-555.
- Mahoney, W.C., Hermodson, M.A., Jones, B., Powers, D.D., Corfman, R.S., Reeck, G.R. 1984. Amino acid sequence and secondary structural analysis of the corn

inhibitor of the trypsin and activated Hageman factor. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 8412-8419.

Mares-Guia, M., Shaw, E., 1965. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate side chain. *Journal of Biological Chemistry* 240: 1579-1585

McPhalen, C.A., Schebli, H.P., James, M.N.G. 1985. Crystal and molecular structure of the inhibitor eglin from leeches in complex with subtilisin Carlsberg, *FEBS Letters*, 188: 55-60.

Mello, M.O., Silva-Filho, M.C., 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14(2): 71-81.

Michaud, D., 1997. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. *Trends in Biotechnology* 15: 4-6.

Monteiro, M.R.P., Costa, N.M.B., Oliveira, M.G.A., Pires, C.V., Moreira, M.A., 2004. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do inibidor de tripsina Kunitz e das isoenzimas lipoxigenases. *Revista de Nutrição da PUCCAMP* 17(2): 195-205.

Moscardi, F., Barfield, C.S., Allen, G.E., 1981. Effects of temperature on adult velvetbean caterpillar oviposition, egg hatch, and longevity. *Annals of the Entomological Society of America* 74(2): 167-171.

Mosolov, V.V., Grigor'eva, L.I., Valueva. T.A., 2001. Plant proteinase inhibitors as multifunctional proteins. *Applied Biochemistry and Microbiology* 37 (6): 545-551.

Murdock, L.L., Shade, R.E., 2002. Lectins and protease inhibitors as plant defense against insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(22): 6605-6611.

Neurath, H., 1984. Evolution of proteolytic enzymes. *Science* 224(4647): 350-357.

Nickle, D.A., 1977. The peanut agroecosystem in central Florida; economic threshold for defoliating noctuids (Lepidoptera, Noctuidae), associated complex (Hymenoptera, Braconidae). 131p. Dissert. (PhD), Univ. Florida, Gainesville, USA.

Odani, S., Koide, T., Ono, T. 1983. The complete amino acid sequence of barley trypsin inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 7998-8003.

Oliveira, M.G.A., Simone, S.G.De., Xavier, L.P., Guedes, R.N.C., 2005. Partial purification and characterization of trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 140(3): 369-380.

Orf, J.H., Hymowitz, T. 1979. Genetics of the Kunitz trypsin inhibitor: an antinutritional factor in soybeans. *Journal of the American Oil Chemists Society* 56: 722-726.

- Panizzi, A.R., Correa, B.S., Gazzoni, D.L., Oliveira, E.B., Newman, G.C., Turnipseed, S.G., 1977. Insetos da soja no Brasil. Londrina, EMBRAPA CNPSo, 20p (Boletim Técnico, nº 1).
- Paz-Are, J., Ponz, F., Rodriguez-Palenzuela, P., Lázaro, A., Hernandez-Lucas, C., Garcia -Olmedo, F., Carbonero, P. 1986. Characterization of cDNA clones of the family of trypsin/ α -amylase inhibitors (CM-proteins) in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theoretical and Applied Genetics, 71: 842-846.
- Pilon, A.M., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.C., 2006. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. Pesticide Biochemistry and Physiology 86(1): 23-29.
- Price, P.W. 1997. Insect Ecology. John Willey & Sons, Inc., New York, 874p.
- Raether, W., Loewe, H., Seidenath, H. 1974. Trypanozider effekt der in saurer lösung entstehenden spaltprodukte Von berenil und ihre mögliche in vivo-rückkupplung in NMRI-mäusen. Tropenmed. Parasit. 25: 273–282.
- Rao, M.B., Tanksale, M., Mohini, S. Vasanti, V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbial and Molecular Biology Reviews 62(3): 597-635.
- Read, R.J., Fujinaga, M., Sielecki, A.R., James, M.N.G. 1983. Structure of the complex of streptomyces griseus protease B and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor at 1.8 Å resolution. Biochemistry, 22: 4420-4426.
- Reid, J.C., 1975. Larval development and consumption of soybean foliage by the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera Noctuidae), in the laboratory 118p. dissert. (PhD), Univ. Florida, Gainesville, USA.
- Rhoades, D.F., Cates, R.G., 1976. Toward a general theory of plant anti-herbivore chemistry. In: Wallace J.W., Mansel, R.L. (eds) Biochemical interactions between plants and insects. Plenum, New York, pp 168-213.
- Rosenthal, G.A., Berenbaum, M.R. 1991. (eds) Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites. Academic Press, New York.
- Ryan, C.A., 1992. The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. Plant Molecular Biology 19: 123-133.
- Sakal, E., Applebaum, S.W., Birk, Y. 1988. Purification and characterization of *Locusta migratoria* chymotrypsin. International Journal of Peptide and Protein Research 32: 590-598.
- Sales, M.P., Gerhardt, J.R., Grossi-de-Sá, M.F., Xavier-Filho, J., 2000. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? Plant Physiology 124(2): 515-522.

Santos, C.D., Ribeiro, A.F., Terra W.R., 1986. Differential centrifugation, calcium precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnyis ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and interferences concerning secretory mechanisms. *Canadian Journal of Zoology* 64(2): 490-500.

Sealock, R.W., Laskowski, M.Jr. 1969. Enzymatic replacement of the arginyl by a lysyl residue in the reactive site of soybean trypsin inhibitor. *Biochemistry* 8: 3703–3710.

Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., Grossi-De-Sá, M.F., Isejima, E.M., Da Matta, R.A., Miguens, F.C., Bifano, T.D., 2001. Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -amylases in response to different diets. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31: 41–50.

Silva, F.B., Oliveira, M.G.A., Batista, R.B, Pires, C.V., Xavier, L.P., Piovesan, N.D., Oliveira, J.A., Jose, I.C., Moreira, M.A., 2002. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Arquivos do Instituto Biológico* 69(1): 67-74.

Silva, F.B., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Pires, C.V., Oliveira, J.A., Pilon, A.M., Piovesan, N.D., Moreira, M.A., 2004. Função bioquímica da via das lipoxigenases em plantas de soja submetidas ao ataque de mosca branca (*Bemisia argentifolii*). *Ciência e Agrotecnologia* 28(2): 409-416.

Silva-Filho, M.C., Falco, M.C., 2000. Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidos pelas plantas. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento* 12, 38-42.

Sipos, T., Merkel, J.R. 1970. Na effect calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry* 9(14): 2766-2775.

Spencer, R.W, Foard, D.E, Larkins, B.A. 1984. Molecular cloning and analysis of a gene coding for the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean. *Journal of Biological Chemistry* 259: 9883–9890.

Tan-Wilson, A.L., Chen, J.C., Duggan, M.C., Chapman, C., Obach, R.S., Wilson, K.A. 1987. Soybean Bowman-Birk trypsin iso-inhibitors: classification and report of a glycine-rich trypsin inhibitor class. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 974–981.

Tarragó, M.F.S., Silveira Neto, S., Carvalho, S., Barbin, D., 1977. Influência de fatores ecológicos na flutuação populacional das lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Rachiplusia nu* (Guen) em Santa Maria-RS. *Anais da sociedade Entomológica do Brasil* 6(2):180-193.

Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 109(1): 1-62.

Terra, W., Ferreira, C., Baker, J.E., 1996. Digestive enzymes. In: Lehane, M. J. and Billingsley, P. F. (eds) *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, Cambridge, pp. 206-235, 1996.

Terra, W.R., Ferreira, C., 2000. A digestão dos insetos. In: Medeiros, M.A. *As pragas também morrem pela boca*. Pesquisa Fapesp 54:20-27.

Turnipseed, R.G., Kogan, M., 1976. Soybean entomology. *Annual Review of Entomology* 21: 247-282.

Valueva, T.A., Mosolov, V.V., 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry* 69(11): 1305-1309.

Walling, L.L., 2000. The myriad plant responses to herbivores. *Journal of Plant Growth Regulation* 19(2): 195-216.

Walling, L.L., 2001. Induced resistance: from the basic to the applied. *TRENDS in Plant Science* 6 (10): 445-7.

Waters, D.J., Barfield, C.S., 1989. Larval development and consumption by *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) fed various legume species. *Environmental Entomology* 18(6): 1006-1010.

Watson, J.R., 1916. Life history of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Journal of Economic Entomology* 9: 521-528.

Wieczorek, M., Otlewski, J., Cook, J., Parks, K., Leluk, J., Wilimowska-Pelc, A., Polanosxski, A., Wilusz, T., Laskowski, Jr. M. 1985. The squash family of serine inhibitors. Amino acid summer squash, zucchini, and cucumber seeds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 126: 646-651.

Wille, J.E., 1943. *Entomologia Agrícola del Peru*. Estacion Experimental Agrícola de la Molina. 468p.

Wilson, I., Vogel, J., Somerville, S. 1997. Signalling pathways: A common theme in plants and animals? *Current Opinion in Biology* 7(3): 175-178.

Xavier, L.P., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.C., Santos, A.V., Simone, S.G., 2005. Membrane-bound trypsin-like activity of midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Entomology* 102(2): 147-153.

Xavier-Filho, J., Campos, F.A.P. Proteinase inhibitors. In: Cheeke, P.R. (ed). *Toxicants of Plant Origin*. Boca Raton, CCR Press. v. 3, p 1-27, 1989.

**Resposta alimentar e desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner)
ao Inibidor de Proteases Berenil**

RESUMO:

1. As plantas apresentam variados mecanismos de defesa contra a herbivoria. Os inibidores de proteases podem inibir as proteases digestivas do intestino dos insetos e interferir no consumo e assimilação do alimento, afetando negativamente o desenvolvimento e a sobrevivência dos insetos. Os objetivos desse trabalho foram avaliar se a concentração do inibidor sintético de serino-proteases, berenil presente na dieta de *A. gemmatalis*, (i) diminui o consumo, a digestibilidade e a eficiência na utilização do alimento pelas lagartas e (ii) afeta negativamente a performance do inseto.
2. A lagarta da soja, *A. gemmatalis*, foi alimentada, individualmente, em dietas artificiais contendo 0; 0,00095; 0,0019; 0,0038; 0,0076; 0,0152; 0,0304; 0,0608; 0,0912; 0,125 e 0,25% (p/p) de berenil diariamente.
3. Com o aumento da concentração de berenil todos os parâmetros avaliados foram afetados. Houve aumento no consumo, no balanço entre a ingestão e a excreção, na taxa de consumo relativa e na digestibilidade da dieta e na duração da fase larval e do ciclo de vida da lagarta. Por outro lado, houve redução na taxa relativa de crescimento, na biomassa incorporada, na eficiência na assimilação do alimento ingerido e digerido, no peso das pupas, adultos, no tamanho das mariposas adultas e no comprimento das asas.
4. Foram obtidos resultados significativos para a utilização do berenil mesmo em baixas concentrações em condições de laboratório para o controle de uma

população de *A. gemmatalis*. Estudos adicionais em campo são necessários para identificar a ação do berenil sobre populações de *A. gemmatalis* em condições naturais, tornando possível as novas etapas na identificação e síntese de um peptídeo mimético como alternativa ao uso de agroquímicos no controle da lagarta da soja.

PALAVRAS-CHAVE: Inibidor de proteases, eficiência alimentar, performance, berenil, *Anticarsia gemmatalis*.

1. Introdução

Plantas e insetos coexistem no ambiente terrestre numa interação complexa e dinâmica (Erlich e Raven, 1964; Becerra, 1997). As plantas dependem dos insetos para dispersão de sementes (Boulay, 2005), reprodução (Fleming, 2007) e defesa (Doak *et al.*, 2007), enquanto os insetos herbívoros encontram nas plantas abrigo, alimento e sítios de oviposição, que por sua vez são fatores fundamentais para sua proliferação. Por outro lado, dependendo da intensidade do ataque, insetos fitófagos podem ser prejudiciais às plantas, promovendo injúrias suficientes para levá-las à morte (Maron e Crone, 2006) ou inviabilizando sua reprodução.

Para reduzir a intensidade do ataque herbívoro, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa constitutiva ou induzida que incluem características físicas (espinhos, tricomas, rigidez do tecido foliar, lignina, domácias, ceras e resinas) (Agrawal e Fishbein, 2006; Matos *et al.*, 2006; Farrel *et al.*, 1991), toxicidade (taninos, glucosinolatos, glicosídeos, cianetos e alcalóides) (Feeny, 1976; Bennett e Wallsgrave, 1994; Duffey e Stout, 1996; Trigo, 2000; de Bruxelles e Roberts, 2001), assincronia fenológica, capacidade de re-crescimento (tolerância) (Marquis, 1996), defesas indiretas (voláteis e arquitetura da planta) (Baldwin e Preston, 1999) e redução da sua qualidade nutricional (proteínas e antiproteínas) (Chen *et al.*, 2007). A síntese de proteínas com valor defensivo pode resultar no aumento da absorção de substâncias tóxicas pelo inseto, como é o caso das lecitinas (Murdock e Shade, 2002), ou promover danos ao intestino do inseto, como ocorre com as quitinases (Falco *et al.*, 2001), ou principalmente pela inibição de enzimas digestivas (Terra e Ferreira, 1994). Em paralelo, os insetos podem desenvolver estratégias para superar as barreiras impostas pelas plantas, evitando os compostos

indesejáveis ou pela detoxificação (entenda-se detoxificar como retirar o caráter tóxico de um determinado composto) dos compostos tóxicos (Scott e Wen, 2001; Freeman *et al.*, 2006).

Anticarsia gemmatalis (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto desfolhador que promove grandes danos em cultivos comerciais de soja (Turnipseed e Kogan, 1976). As lagartas têm causado perdas econômicas significativas em toda a América do Sul e no sul dos Estados Unidos (Kogan e Turnipseed, 1987), tendo sido necessária intensa e constante aplicação de inseticidas para o seu controle. No Brasil, a implementação do programa de manejo integrado de pragas para controlar a lagarta da soja tem envolvido a utilização de nucleopoliedrovírus de *A. gemmatalis* (Fuxa *et al.*, 1999) com resultados satisfatórios em termos econômicos e ecológicos. Contudo, é necessária a implementação de formas de controle adicionais para a proteção ou o desenvolvimento de cultivares resistentes à insetos-praga.

Os insetos obtêm os aminoácidos essenciais para a manutenção das funções vitais com o auxílio de proteases extracelulares que quebram as proteínas ingeridas na dieta. As plantas, por sua vez, sintetizam compostos denominados inibidores de proteases que podem ter papel de defesa contra a herbivoria (Ryan, 1990; Jonhston *et al.*, 1993; Gatehouse *et al.*, 1999). Os inibidores ligam-se às proteases digestivas reduzindo a concentração de enzimas livres, causando um atraso na digestão protéica. Como resposta fisiológica compensatória, há a indução da síntese protéica e a hipersecreção de enzimas digestivas, levando à depleção dos aminoácidos essenciais para outros processos metabólicos do inseto. Esse déficit de aminoácidos pode ter efeitos diretos na história de vida do herbívoro, resultando em retardamento

no desenvolvimento e até mesmo causando a morte do organismo (Broadway e Duffey, 1986).

As enzimas digestivas têm sido selecionadas como alvos para o desenvolvimento de métodos de controle de insetos-praga e sua eficácia contra uma série de espécies tem sido relatada (Ortego *et al.*, 1988; Bolter *et al.*, 1997). Embora haja uma vasta literatura relativa às proteases digestivas de larvas de lepidópteros (Broadway *et al.*, 1986; Johnston *et al.*, 1993; Ferreira *et al.*, 1994; McManus *et al.*, 1995; Gatehouse *et al.*, 1999; Pompermayer *et al.*, 2001; Telang *et al.*, 2003), poucos trabalhos dizem respeito aos inibidores de proteases de *A. gemmatalis* (Pilon *et al.*, 2006). Nesse sentido, os objetivos desse trabalho foram avaliar se a concentração do inibidor sintético de serino-proteases, berenil presente na dieta de *A. gemmatalis*, (i) diminui o consumo, a digestibilidade e a eficiência na utilização do alimento pelas lagartas e (ii) afeta negativamente a performance do inseto (desenvolvimento pós-embrionário).

2. Material e Métodos

2.1 Criação da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis*

Os experimentos foram conduzidos com insetos provenientes de uma criação estabelecida no laboratório de criação de insetos no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) sob condições constantes de temperatura (26 ± 2 °C), umidade relativa ($70 \pm 5\%$), fotoperíodo (14 h-claro/10 h-escuro), a partir de indivíduos obtidos do Centro Nacional de Pesquisa da Soja (CNPSO), Londrina, PR.

Os adultos foram mantidos em gaiolas com dimensões de 50 cm de largura, 40 cm de comprimento e 50 cm de altura, cobertas com tecido de organza e revestidas internamente com folhas de papel sulfite branco (A4). Os insetos adultos foram alimentados em um chumaço de algodão embebido com uma solução nutritiva à base de mel (10,5 g), cerveja (350 mL), sacarose (60 g), ácido ascórbico (1,05 g), nipagin® (1,05 g) e água (1050 mL), colocado sobre uma placa de Petri no fundo da gaiola.

No dia seguinte à postura das mariposas, o que ocorre cerca de três dias após a emergência dos adultos, as folhas de papel toalha que revestiram as gaiolas, contendo ovos aderidos, foram retiradas e cortadas em pedaços de 2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento. Cada um desses fragmentos foi transferido para um copo plástico de 500 mL com um orifício de 2 cm na tampa recoberto por tecido de organza, e mantidos em uma câmara climatizada. Após a eclosão dos ovos, quarenta lagartas foram alimentadas diariamente com dieta artificial (Hoffman-Campo *et al.* 1985) até atingirem a fase de pré-pupa.

2.2 Preparo da dieta artificial

As dietas foram preparadas com concentrações crescentes do inibidor de protease, berenil (Tabela 1). No preparo das dietas misturou-se feijão cozido (mulatinho), levedo de cerveja, gérmen de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água com o auxílio de um liquidificador industrial. A mistura foi autoclavada durante 1 hora à pressão de 1,5 kgf/cm². Em seguida, a mistura foi transferida para o liquidificador e foram adicionados ácido ascórbico, ácido sórbico, nipagin®, formol 40% e solução vitamínica (Tabela 2) até formar uma pasta homogênea. Essa pasta foi transferida ainda quente para recipientes plásticos com tampa e mantida à

temperatura de 25 °C até esfriar. Posteriormente, os recipientes foram levados a uma câmara germicida com luz ultravioleta onde permaneceram por 5 minutos. A dieta foi conservada em geladeira a ± 4 °C até o término dos experimentos.

2.3. Determinação das concentrações de berenil utilizadas nos bioensaios

Ensaio preliminares foram realizados com dietas contendo 0; 0,125 e 0,25% (p/p) de berenil conforme trabalho de Pilon (2007) realizado com benzamidina. Contudo, para os tratamentos contendo inibidor, as lagartas de *A. gemmatalis* não completaram o ciclo de vida, morrendo ainda no 2º instar. Com base nessas observações, foram definidas concentrações menores que as utilizadas anteriormente nos ensaios preliminares. As novas concentrações de berenil foram obtidas dividindo-se o valor 0,125 por 2. Foi preparada uma dieta com concentração de 0,0608% (p/p) de berenil, ou seja, aproximadamente a metade da menor concentração de inibidor. Esse mesmo cálculo foi realizado e foram obtidas concentrações de 0,0304 e 0,0152% (p/p) de berenil. Também foi considerado o valor de 0,304 como intervalo superior para 0,0608, obtendo-se uma concentração de 0,0912% (p/p) de berenil. As dietas contendo 0,0152; 0,0304; 0,0608 e 0,0912% (p/p) foram testadas e observou-se que as lagartas de *A. gemmatalis* não sobreviveram até sofrerem metamorfose larva-pupa. O mesmo cálculo foi utilizado para obter novas concentrações de inibidor que, ao serem adicionados na dieta, possibilitassem que os insetos que se alimentassem e completassem todo o ciclo de vida. Foram determinadas as concentrações de 0,0076; 0,0038; 0,0019; 0,00095% (p/p) de berenil e realizados bioensaios nos quais observou-se que as lagartas de *A. gemmatalis* completaram todo o seu ciclo de desenvolvimento quando alimentadas

Tabela 1. Composição das dietas artificiais (g/100 g de mistura) utilizadas nos bioensaios com lagartas de *A. gemmatalis*

Ingredientes	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Dieta 7	Dieta 8	Dieta 9	Dieta 10	Dieta 11
Feijão mulatinho (cozido) ¹	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80
Levedo de cerveja ¹	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40
Gérmen de trigo ¹	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80
Proteína de soja ¹	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80
Caseína ²	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90
Agar-agar ³	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34
Ácido ascórbico ²	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
Ácido sórbico ³	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
Solução vitamínica ¹	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
Nipagin® ³	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Formol 40% ¹	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
Inibidor berenil ²	0	0,00095	0,0019	0,0038	0,0076	0,0152	0,0304	0,0608	0,0912	0,125	0,25

¹ Obtido no comércio de Viçosa, MG;

² Obtido da Sigma Aldrich;

³ Obtido da Isofar- Indústria e comércio de produtos químicos;

Tabela 2. Composição da solução vitamínica utilizada na composição das dietas artificiais utilizadas nos bioensaios com lagartas de *A. gemmatalis*

Ingredientes	mg/100 mL de xarope
Niacinamida	1000
Pantotenato de cálcio	1000
Tiamina	250
Riboflavina	500
Piridoxina	250
Biotina	0,02
Vitamina B12	2
Ácido fólico	250

com dietas contendo de 0 a 0,0076% (p/p) de berenil. Todos os 11 tratamentos (dieta controle e dietas contendo cada uma das 10 concentrações de inibidor) foram utilizados para realização dos experimentos de desenvolvimento pós-embrionário, digestibilidade e atividade enzimática de *A. gemmatalis*.

2.4. Desenvolvimento pós-embrionário de *A. gemmatalis*

Quarenta larvas de primeiro ínstar de *A. gemmatalis*, provenientes da criação-estoque, foram individualizadas em potes plásticos de 200 mL. Os potes foram cobertos com uma tampa plástica com orifício central de 1 cm de diâmetro recoberto por tecido de organza e mantidos em câmara climatizada. As lagartas foram alimentadas, diariamente, com dieta artificial. A duração da fase larval, bem como a longevidade dos adultos foi determinada para cada tratamento. A duração do ciclo de vida foi obtida pelo número de dias compreendidos entre a individualização das lagartas até a morte dos adultos. A partir do quinto dia após a eclosão dos ovos as lagartas foram pesadas, diariamente, até atingir a fase de pupa. As pupas também foram pesadas e as mariposas depois de mortas foram pesadas e foram registrados o

comprimento do corpo e das asas anteriores e posteriores, direita e esquerda com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo modelo CD-6”CS, Japão). Foram determinados o tempo médio de vida dos insetos e a sobrevivência acumulada.

2.5. Consumo e eficiência de *A. gemmatalis* na assimilação do alimento

Para medir o consumo e a eficiência de *A. gemmatalis* na assimilação da dieta ingerida, foram determinados os índices digestórios como proposto por Waldbauer (1968), das quarenta lagartas individualizadas durante todo o seu desenvolvimento nos tratamentos de 0; 0,00095; 0,0019; 0,0038; 0,0076; 0,0152; 0,0304; 0,0608; 0,0912; 0,125 e 0,25% de berenil adicionada na dieta. Os parâmetros biológicos avaliados foram a ingestão de dieta (mg), as fezes excretadas (mg), o balanço entre a ingestão de dieta e a excreção das fezes (g), a digestibilidade aproximada (%), a eficiência na conversão do alimento ingerido (%), a eficiência na conversão do alimento digerido (%), a taxa de crescimento relativa (mg/mg.dia) e a taxa de consumo relativa (mg/mg.dia). Para o cálculo dos índices digestórios foram utilizadas as seguintes equações:

- Digestibilidade aproximada (AD):

$$AD = \frac{\text{ingestão} - \text{fezes}}{\text{ingestão}} \quad (\text{Eq. 1})$$

- Eficiência na conversão do alimento ingerido (ECI):

$$ECI = \frac{\text{biomassa incorporada}}{\text{ingestão}} \quad (\text{Eq. 2})$$

- Eficiência na conversão da comida digerida (ECD):

$$ECD = \frac{\text{biomassa incorporada}}{\text{ingestão} - \text{fezes}} \quad (\text{Eq. 3})$$

- Balanço entre entrada de alimento e eliminação de fezes (B):

$$B = \text{ingestão} - \text{fezes} \quad (\text{Eq. 4})$$

- Taxa relativa de crescimento (RGR):

$$\text{RGR} = \frac{\text{biomassa incorporada por indivíduo}}{\text{tempo} \times \text{biomassa incorporada total por tratamento}} \quad (\text{Eq. 5})$$

- Taxa de consumo relativa (RCR):

$$\text{RCR} = \frac{\text{ingestão}}{\text{tempo} \times \text{biomassa incorporada total por tratamento}} \quad (\text{Eq. 6})$$

2.6. Obtenção das medidas de consumo de *A. gemmatalis*

Toda a dieta fornecida para as lagartas era pesada no momento em que era colocada no pote, descontando-se o valor do pote e obtendo-se o peso fresco da mesma. No dia seguinte, as sobras de dieta eram recolhidas, colocadas em placas de Petri ($\square = 10 \text{ cm}$) identificadas com o código do tratamento e da replicata e secas em estufa sem entrada de ar com temperatura controlada de $105 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. Após esse período de tempo, as dietas eram retiradas da estufa e imediatamente colocadas num dessecador. As placas de Petri eram mantidas no dessecador até que atingissem a temperatura ambiente e, em seguida eram pesadas em balança analítica. Para o cálculo da umidade presente nas dietas, foram pesadas determinadas quantidades de cada uma das dietas frescas (controle e contendo inibidor) e submetidas ao mesmo procedimento de secagem descrito anteriormente. As placas contendo as dietas foram colocadas no dessecador e após atingirem a temperatura ambiente foram novamente pesadas. Em todo esse procedimento foram descontados os pesos das placas utilizadas para secagem da dieta. Todo esse procedimento foi realizado em triplicata. O peso seco das dietas foi utilizado para a determinação da

ingestão utilizada nos cálculos de digestibilidade aproximada (AD), eficiência na conversão do alimento ingerido (ECI), eficiência na conversão da comida digerida (ECD), no balanço entre entrada de alimento e eliminação de fezes e na taxa de consumo relativa (RCR).

2.7. Determinação da quantidade de fezes produzidas por *A. gemmatalis*

As fezes eliminadas pelas lagartas de *A. gemmatalis* eram coletadas diariamente antes de ser fornecida dieta fresca para as mesmas. As fezes eram então recolhidas com o auxílio de pinça ou pincel de cerdas duras, acondicionadas em frascos de vidro etiquetados e mantidos tampados e acondicionados em geladeira à 4 °C. Os potes trocados por outros limpos e numerados da mesma forma que os anteriores. Ao final dos bioensaios, as fezes foram mantidas em estufa sem circulação de ar, conforme descrito no item anterior, por 24 horas. A quantidade total de fezes foi utilizada para calcular a digestibilidade aproximada (AD), a eficiência na conversão do alimento digerido (ECD), o balanço entre a entrada de alimento e a eliminação de fezes (B). Como a quantidade de fezes era muito pequena, os testes de determinação de proteína presente nas fezes foram realizadas em duplicatas. As fezes eram pesadas e divididas em quantidades semelhantes e os pesos anotados para os devidos cálculos.

2.8. Determinação da biomassa incorporada por *A. gemmatalis*

Para se determinar a biomassa incorporada pelas lagartas, cada uma delas era pesada individualmente e diariamente no momento em que o alimento fresco era fornecido e as fezes eram recolhidas. Dessa forma, era obtida a biomassa diária incorporada por cada uma das lagartas. A biomassa incorporada total por tratamento

foi obtida pela soma do peso líquido de cada uma das lagartas e depois efetuada a soma de todas as replicatas do tratamento.

2.9. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de regressão utilizando o programa TableCurve 2D Windows v2.0 (Jandel Scientific, 1994) e os modelos escolhidos foram plotados no programa SigmaPlot, versão 7.0 (SPSS, 2001). Para determinar o tempo médio de vida e a sobrevivência acumulada dos insetos foi utilizado o procedimento PROC LIFETEST do programa SAS (SAS Institute, 1989). As curvas de sobrevivência acumulada foram comparadas pelo teste de Wilcoxon. (Tabela 2A, anexos).

3. Resultados e discussão

A adição de berenil na dieta afetou significativamente todos os parâmetros relacionados ao consumo, utilização do alimento e características fenotípicas do inseto. Tem sido demonstrado que a ingestão de inibidores de proteases em dietas naturais e artificiais retarda o crescimento e o desenvolvimento de diversos insetos-praga, atuando como uma forma efetiva de controle (Broadway, 1986; McManus, 1995; Gatehouse, 1999; Pilon *et al.*, 2006). Desse modo, a susceptibilidade aos inibidores de proteases pode ser medida em termos de desenvolvimento, sobrevivência e fecundidade do inseto.

A ingestão (Figura 1a) e a digestibilidade da dieta pelas lagartas de *A. gemmatalis* (Figura 1b) aumentaram com o incremento de inibidor na dieta, isto é, apesar de as lagartas terem ingerido mais inibidores elas apresentaram maior digestibilidade da dieta. O incremento da digestibilidade pode estar relacionado ao

aumento na síntese de serino-proteases ou mesmo de outras proteases (Jongsma e Bolter, 1997; Brito *et al.*, 2001; Pilon *et al.*, 2006). O aumento da concentração de berenil na dieta pode resultar na ocupação pelo berenil do sítio de especificidade S₁ (Mares-Guia e Shaw, 1965; Andrade *et al.*, 1990; Junqueira *et al.*, 1992) como também do sítio secundário, sítio de ativação da tripsina S₂ (Oliveira *et al.*, 1993), ocasionando na ativação da tripsina como já foi demonstrado por Oliveira *et al.*, 1993.

A eliminação das fezes aumentou até a concentração de 0,0019% de inibidor, onde atingiu um valor máximo diminuindo nas concentrações subseqüentes (Figura 2a). O balanço entre a quantidade de dieta ingerida e a quantidade de fezes excretadas (Figura 2b) foi diretamente proporcional à dieta ingerida, indicando assimilação significativa na quantidade de dieta ingerida, conforme foi verificado pela medida da digestibilidade, que é um parâmetro utilizado para determinar a quantidade de alimento assimilado pelo inseto.

Embora a ingestão de alimento e a taxa relativa de consumo tenham aumentado com o aumento da concentração de inibidor na dieta (Figura 3a), a taxa relativa de crescimento do inseto decresceu com o aumento na concentração de berenil (Figura 3b; Figura 4 – teste preliminar). O berenil é um inibidor parcialmente competitivo da tripsina podendo formar complexos binários EI e ternários IEI e IES (Oliveira *et al.*, 1993). Assim, pode ter ocorrido uma diminuição na biodisponibilidade de aminoácidos essenciais ao crescimento do inseto devido a este tipo de inibição alostérica causando queda em sua taxa de crescimento. Por outro lado, o aumento da ingestão de dieta, mesmo contendo maior conteúdo de inibidor

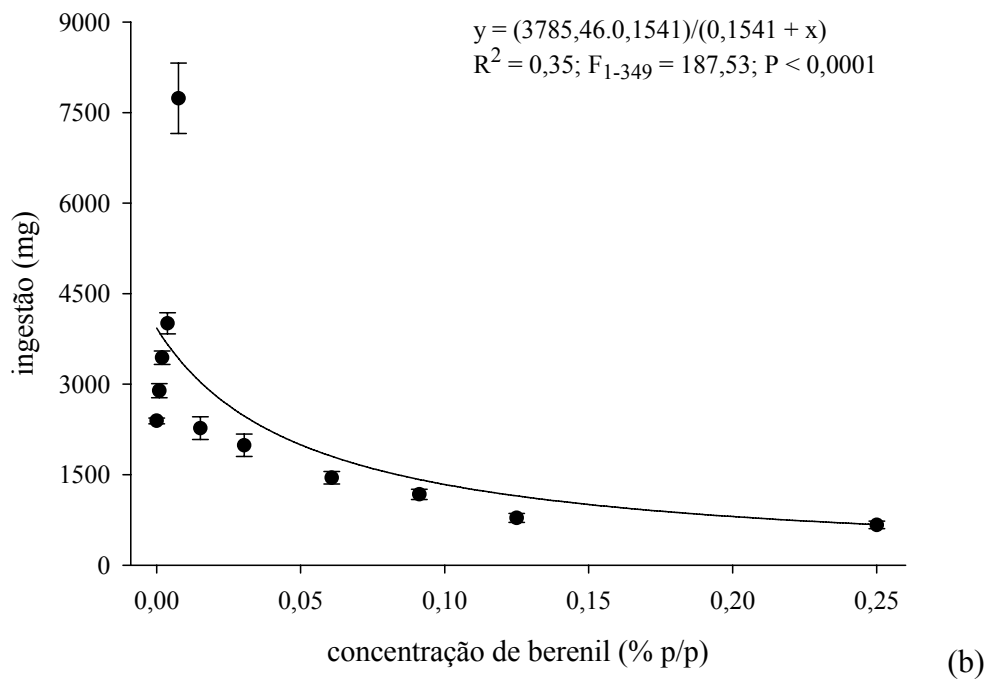
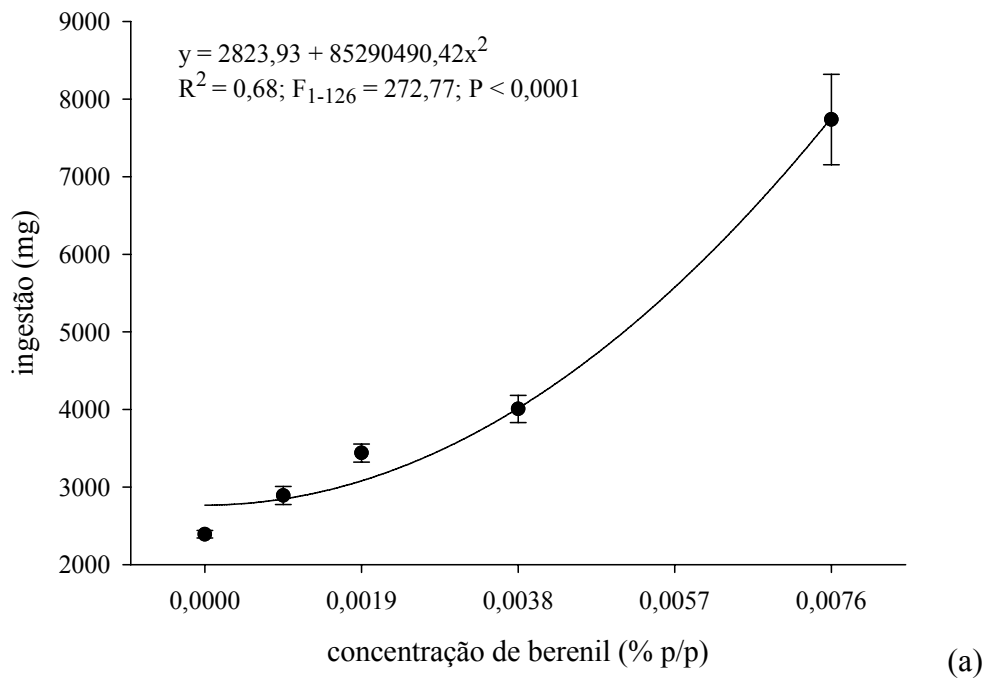


Figura 1. (a) e (b) Ingestão de dieta por *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil. Os pontos representam as médias de (a) 17 a 32 e (b) 17 a 39 repetições e barras representam o erro padrão da média.

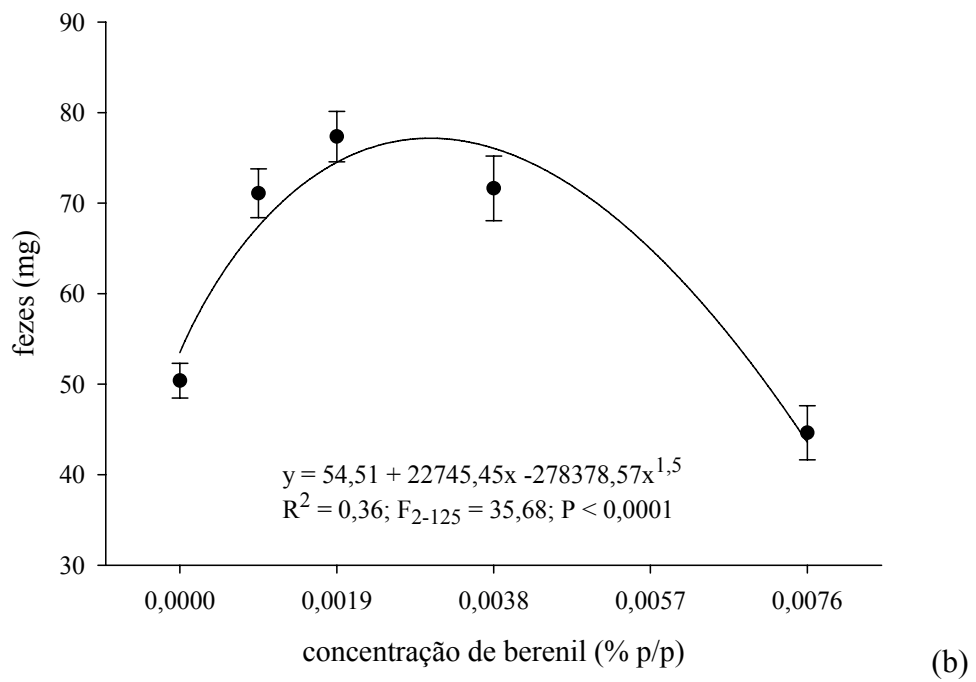
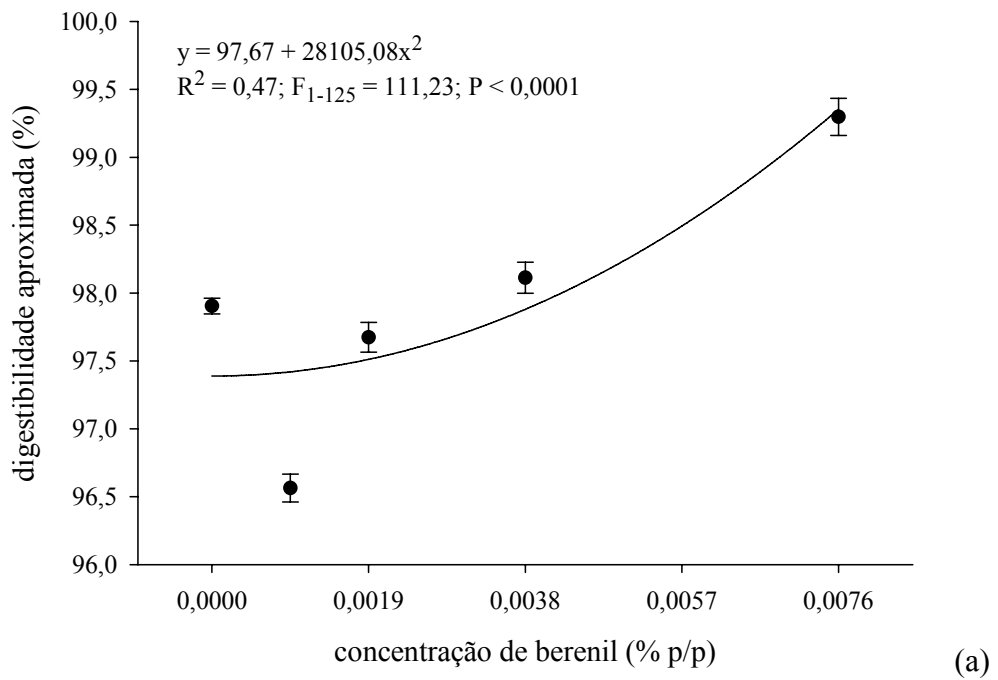


Figura 2. (a) Digestibilidade aproximada e (b) Fezes excretadas de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Os pontos representam as médias de 17 a 32 repetições e barras representam o erro padrão da média.

poderia ser uma estratégia de compensação alimentar para suprir o déficit de nutrientes necessários para o desenvolvimento ótimo do inseto (Simpson e Simpson 1990; Slansky, 1993; Pilon *et al.*, 2006), e essa estratégia já teria sido verificada em resposta à ingestão de inibidores de proteases em vários insetos (Abdeen *et al.*, 2005; Cloutier *et al.*, 2000; de Leo *et al.*, 1998; Winterer e Bergelson, 2001; Pilon *et al.*, 2006; Stepphun e Baldwin, 2007).

Por outro lado, a alimentação compensatória pode representar custos para o desenvolvimento do inseto. O aumento no consumo de alimento pelo inseto pode implicar no prolongamento do ciclo larval que, associado à alta taxa de ingestão de *A. gemmatalis* resultaria no consumo de grande quantidade de toxinas ou de compostos antinutricionais (Raubenheimer, 1992; Slansky e Wheeler, 1992), como é o caso dos inibidores de proteases ou mesmo na contaminação pela ingestão de patógenos (Boots, 2000). O consumo de dieta contendo berenil prolongou a duração da fase larval da lagarta-da-soja (Figura 5a) e de todo o ciclo de vida do inseto (Figura 5b), mais uma evidência indireta de que deve ter ocorrido deficiência na biodisponibilidade de aminoácidos essenciais ao crescimento e desenvolvimento do inseto.

Verificou-se que o tempo médio de sobrevivência é diretamente proporcional ao aumento da concentração de inibidor na dieta (Figura 6a). Adicionalmente, a sobrevivência acumulada de *A. gemmatalis* diferiu significativamente entre os tratamentos, exceto nas concentrações de 0,0019% e 0,0038% de berenil, que não diferiram significativamente entre si (Figura 6b) e mantêm-se por mais tempo em concentrações mais alta do inibidor devido ao prolongamento do tempo de vida dos insetos pela ingestão de berenil.

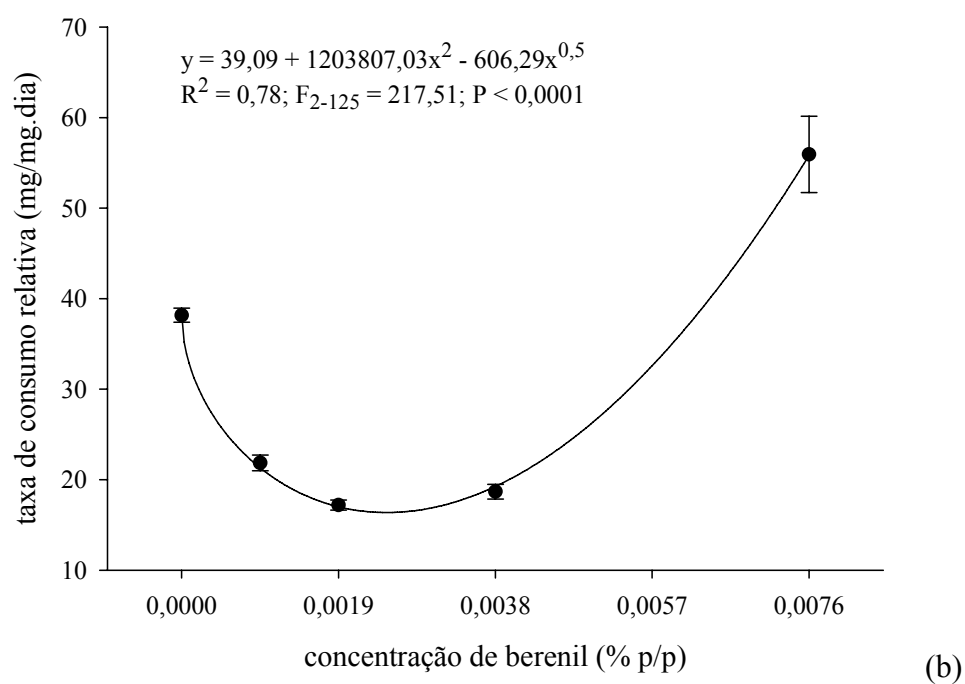
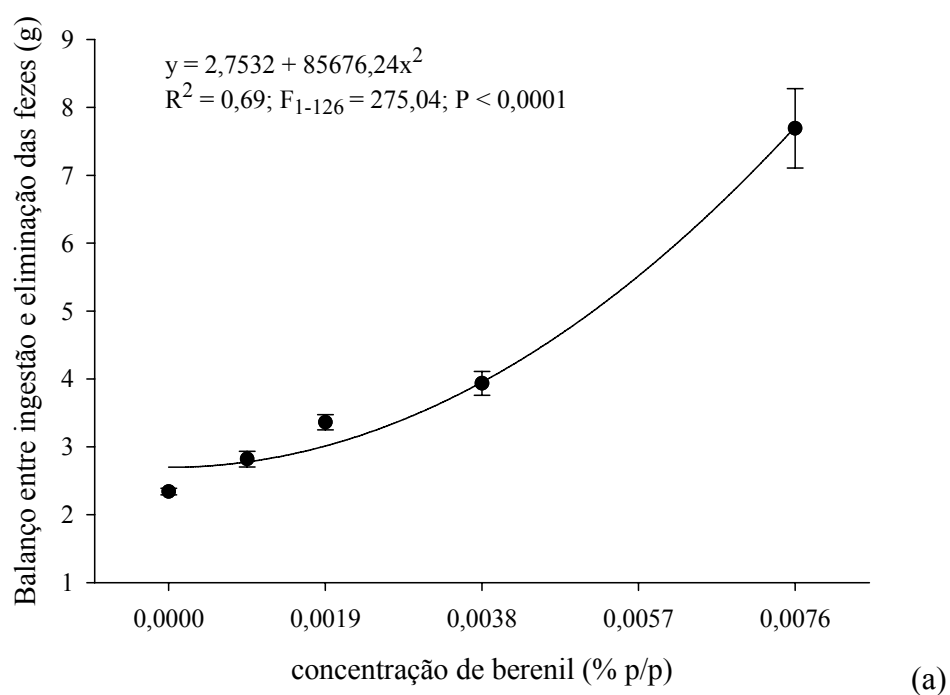


Figura 3. (a) Balanço entre ingestão e eliminação de fezes e (b) Taxa de consumo relativa de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Os pontos representam as médias de 17 a 32 repetições e barras representam o erro padrão da média.

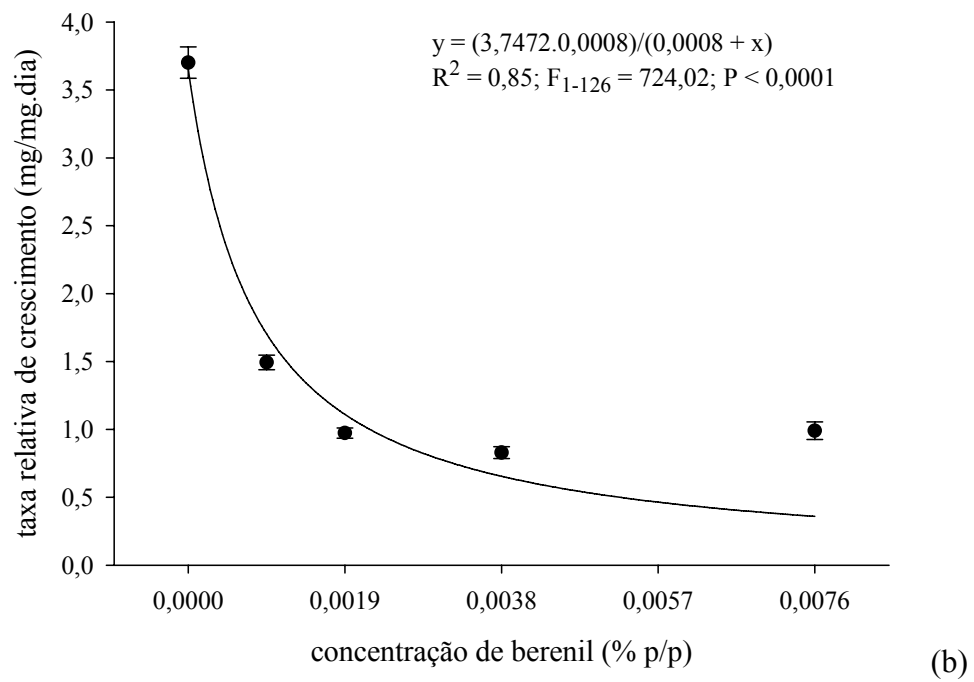
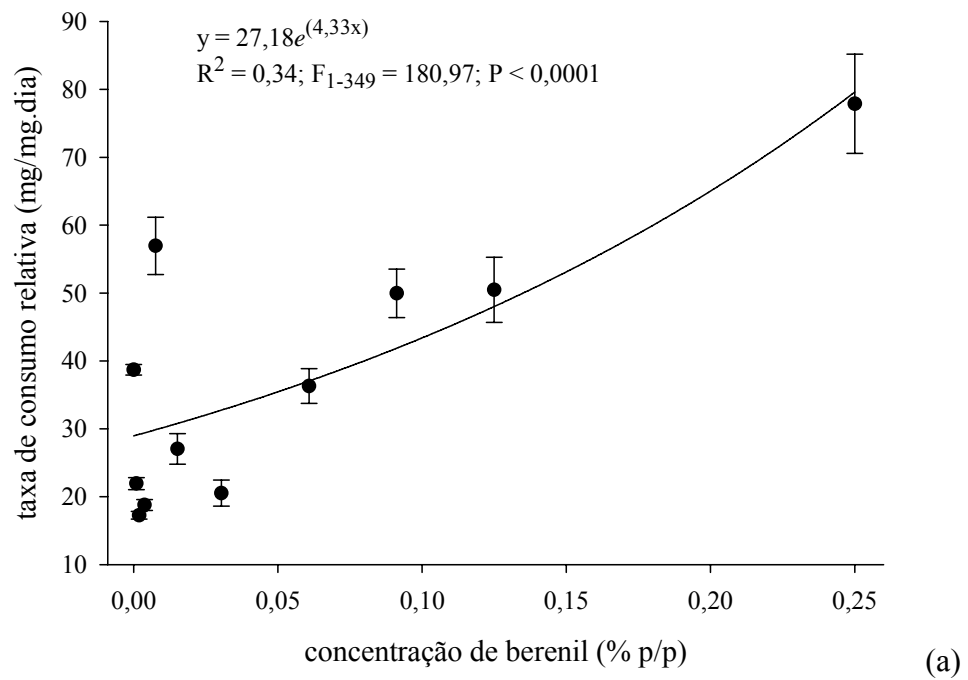


Figura 4. (a) Taxa de consumo relativa e (b) Taxa relativa de crescimento de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Os pontos



Figura 5. Lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas em dietas artificiais acrescidas do inibidor de protease berenil, nas seguintes concentrações: a) 0,25%, b) 0,125% e c) 0% (controle), 12 dias após a eclosão dos ovos (teste preliminar).

Clancy e Price (1987) propuseram a hipótese do desenvolvimento lento/alta mortalidade, que postula que a qualidade nutricional e/ou as características aleloquímicas da planta hospedeira influenciam a taxa de desenvolvimento larval que, conseqüentemente, expõe o inseto por um período maior de tempo aos seus inimigos naturais, resultando no aumento da mortalidade. Sob o ponto de vista ecológico, custos adicionais à compensação alimentar incluem o aumento na vulnerabilidade das lagartas a intempéries, parasitóides e predadores (Heinrich e Collins, 1983; Tulings *et al.*, 1991; Leather e Walsh, 1993; Benrey e Denno, 1997; Bernays, 1997; Scheirs e DeBruyn, 2002; Mulatu *et al.* 2004), bem como o aumento no risco de consumir níveis deletérios de toxinas (Raubenheimer, 1992; Slansky & Wheeler, 1992) e patógenos (Boots, 2000). Adicionalmente, a manutenção do padrão normal de desenvolvimento das lagartas pode não ser mantido em condições de estresse nutricional como as impostas pela alimentação em dietas contendo inibidor.

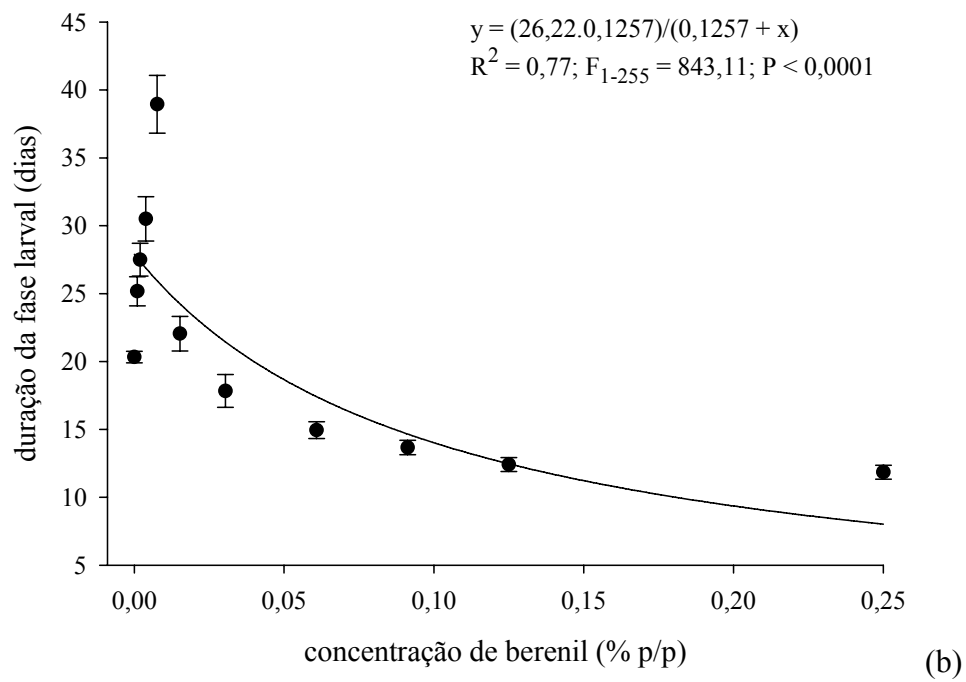
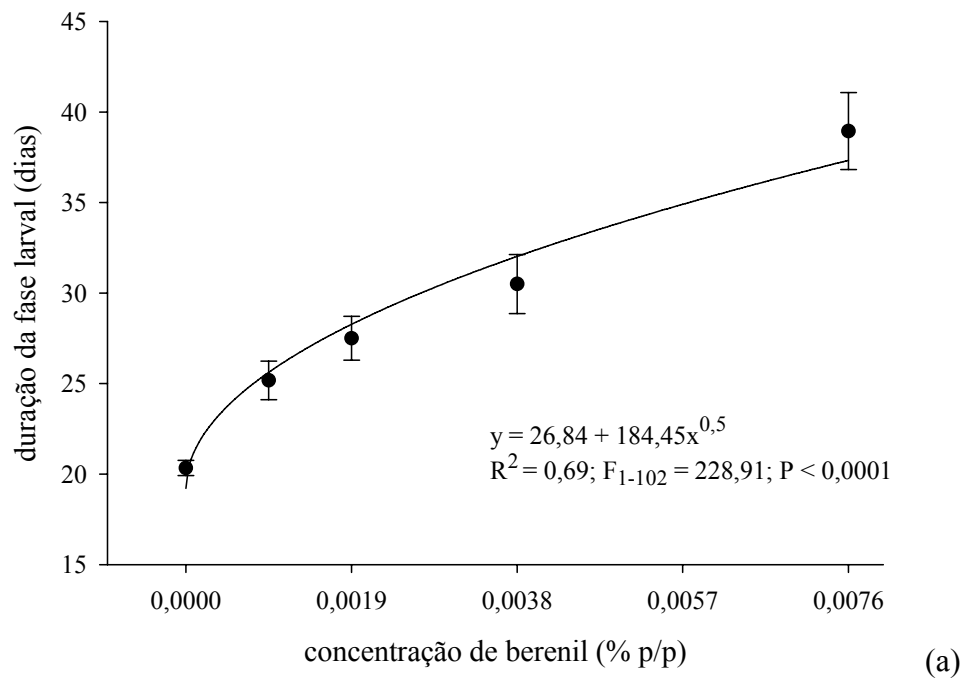


Figura 6. (a) e (b) Duração da fase larval de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Os pontos representam as médias de (a) 37 a 40 e (b) 34 a 40 repetições e barras representam o erro padrão da média.

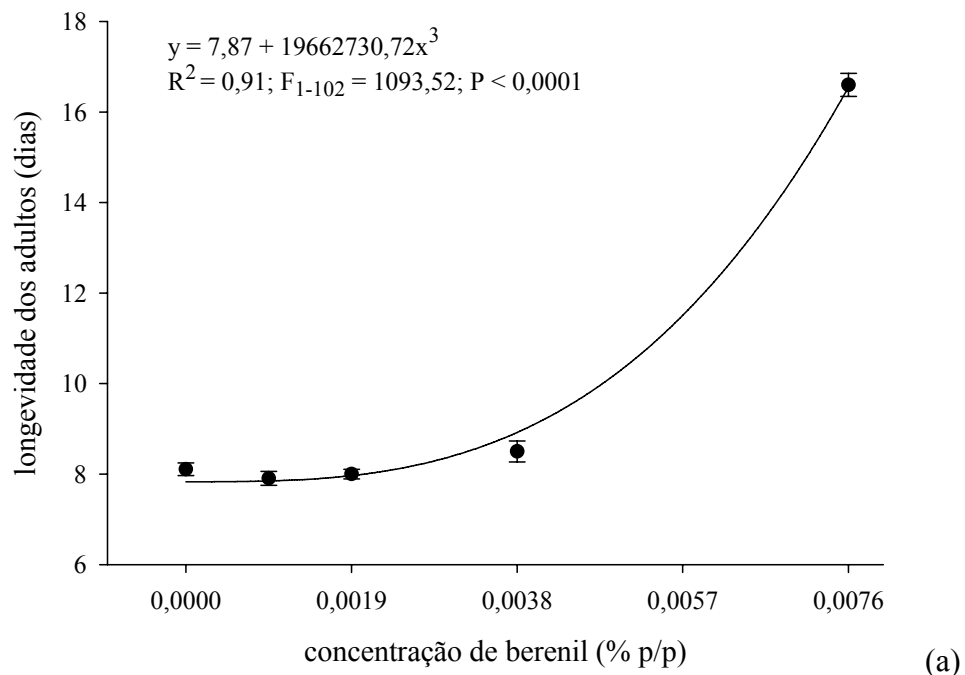


Figura 7. (a) Longevidade dos adultos de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Os pontos representam as médias de 11 a 28 repetições e barras representam o erro padrão da média.

Freqüentemente, observa-se ainda que a ingestão reduzida de nutrientes aumenta a eficiência pós-ingestiva na utilização dos nutrientes (Slansky e Feeny, 1977; Scriber e Slansky, 1981; Slansky e Wheeler, 1989; Simpson e Raubenheimer, 2001; Lee *et al.*, 2002). Esperaria-se que as lagartas que se alimentaram em dietas contendo concentrações crescentes de inibidor de proteases tivessem sua eficiência na utilização dos nutrientes ingeridos aumentada para compensar o consumo de redutores de digestibilidade, quando comparadas às lagartas às quais os nutrientes não foram fatores limitantes, obedecendo a homeostase nutricional (Raubenheimer e Simpson, 1994). No entanto, o que se verifica é uma baixa eficiência das lagartas de *A. gemmatalis* na conversão do alimento ingerido (Figura 7a) e digerido (Figura 7b) com a crescente exposição ao inibidor de protease na dieta. A eficiência na

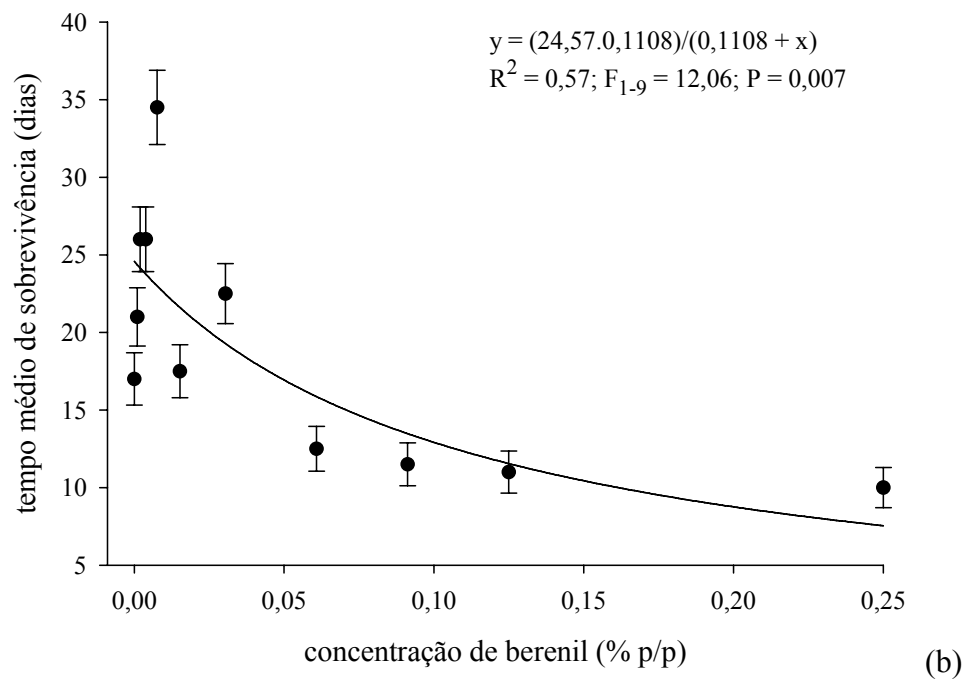
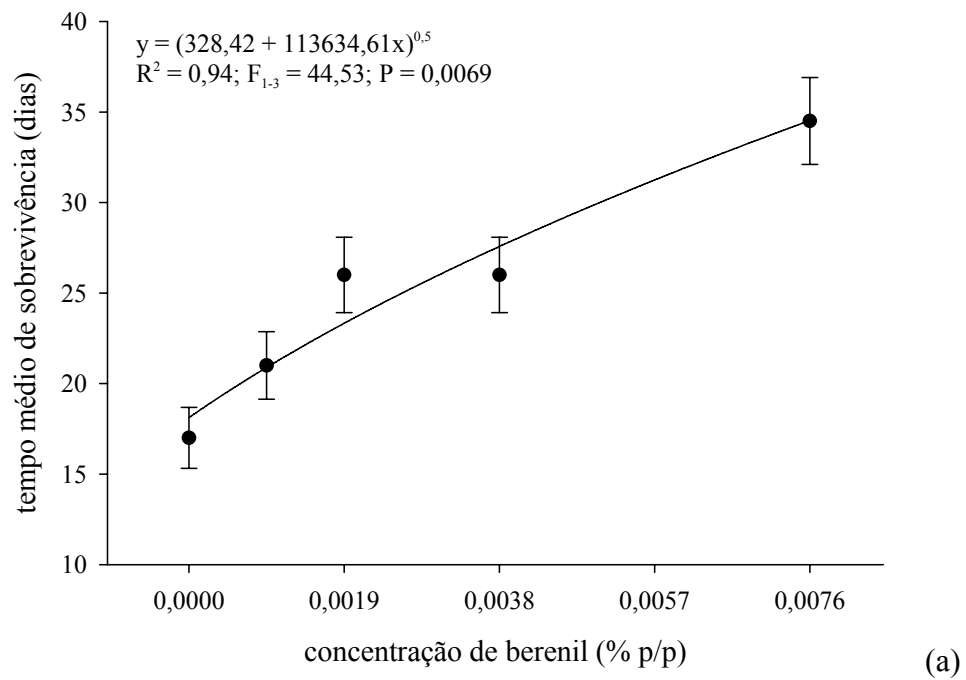


Figura 8. (a) e (b) Tempo médio de sobrevivência de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Os pontos representam as médias (a) 40 e (b) repetições e barras representam o erro padrão da média.

conversão do alimento ingerido e digerido foram inversamente proporcionais à concentração de inibidor na dieta, respectivamente. A reduzida eficiência na conversão do alimento talvez tenha ocorrido pela redução na disponibilidade de aminoácidos essenciais uma vez que a tripsina atua em resíduos de Lys e Arg. A queda na conversão alimentar causa a deficiência de aminoácidos para a biossíntese de proteínas essenciais ao crescimento do inseto.

Van't Hof e Martin (1989) observaram que a redução no teor de umidade em dietas fornecidas às lagartas de *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) promoveu um prolongamento no tempo de desenvolvimento do inseto. Durante a fase larval, as lagartas apresentaram uma maior taxa respiratória que, por sua vez, resultou no aumento do consumo de energia pelo inseto. Se a reduzida taxa de crescimento promove o aumento no período de alimentação, estágio associado ao alto custo metabólico, a extensão da fase larval implica num maior gasto energético. Assim, é possível que o gasto energético envolvido no processamento das dietas contendo inibidores das enzimas digestivas de *A. gemmatalis* não seja a causa das baixas taxas de crescimento das lagartas. A presença de inibidores na dieta promoveria o lento desenvolvimento de *A. gemmatalis*, resultando num maior consumo de energia relacionado às fases imaturas do ciclo de vida de insetos holometábolos.

O efeito inicial nas taxas de crescimento relativa foi a diferença significativa entre a biomassa incorporada pelas lagartas durante a fase larval (Figura 8a), indicando que a ingestão de inibidor resultou em menor ganho de peso pelas lagartas quando comparadas àquelas que consumiram dieta sem a adição de berenil. Resultados semelhantes foram observados para lagartas de *Spodoptera littura* (Lepidoptera: Noctuidae) (McManus e Burgess, 1995) e *Diatraea saccharalis*

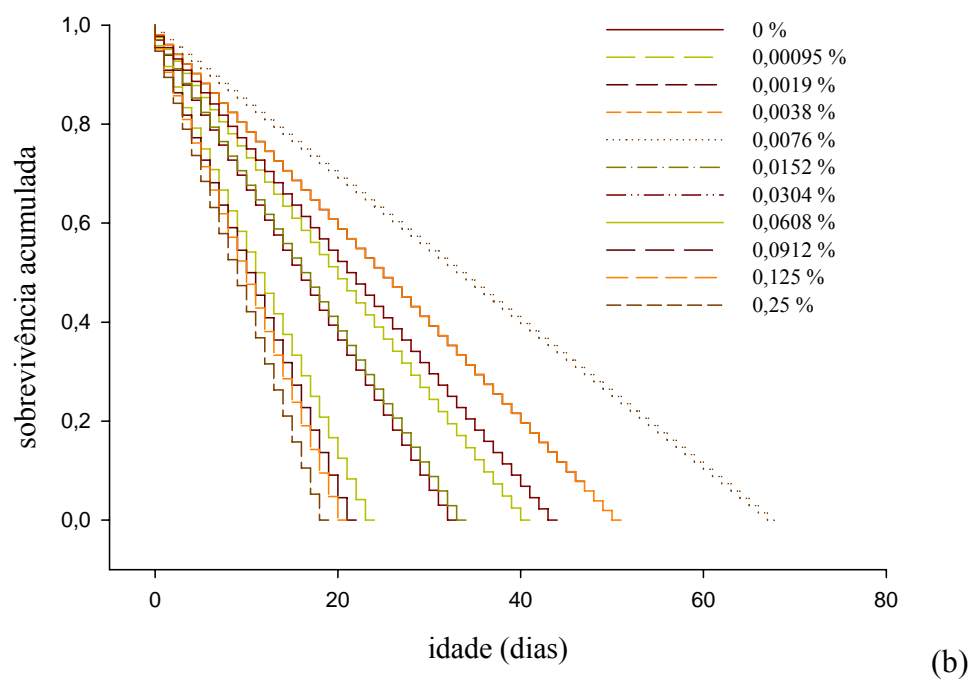
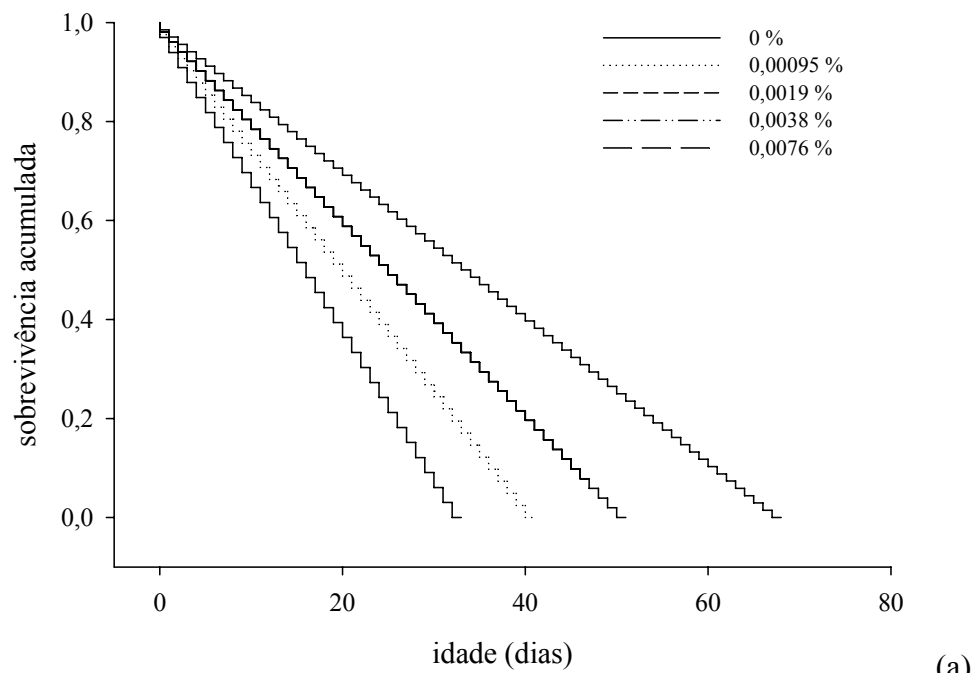
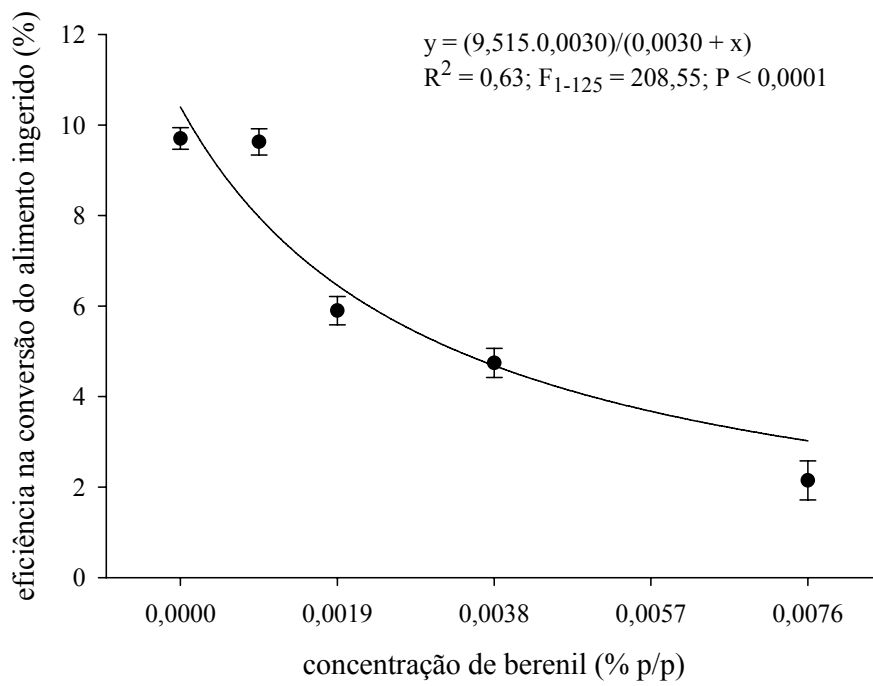
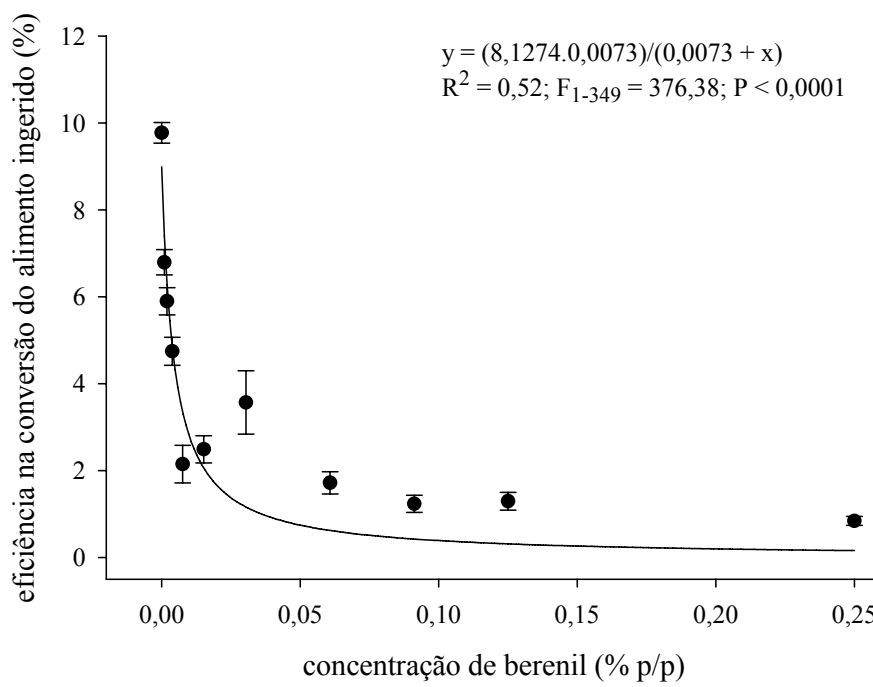


Figura 9. (a) e (b) Sobrevivência acumulada de *A. gemmatalis* ($n = 40$) em função da concentração de berenil na dieta. Curvas diferem significativamente (Teste de Wilcoxon, $P's < 0,0001$) exceto para 0,0019 e 0,0038%, que não diferem entre si.



(a)



(b)

Figura 10. (a) e (b) Eficiência na conversão do alimento ingerido de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Os pontos representam as médias de (a) 17 a 32 e (b) 17 a 39 repetições e barras representam o erro padrão da média.

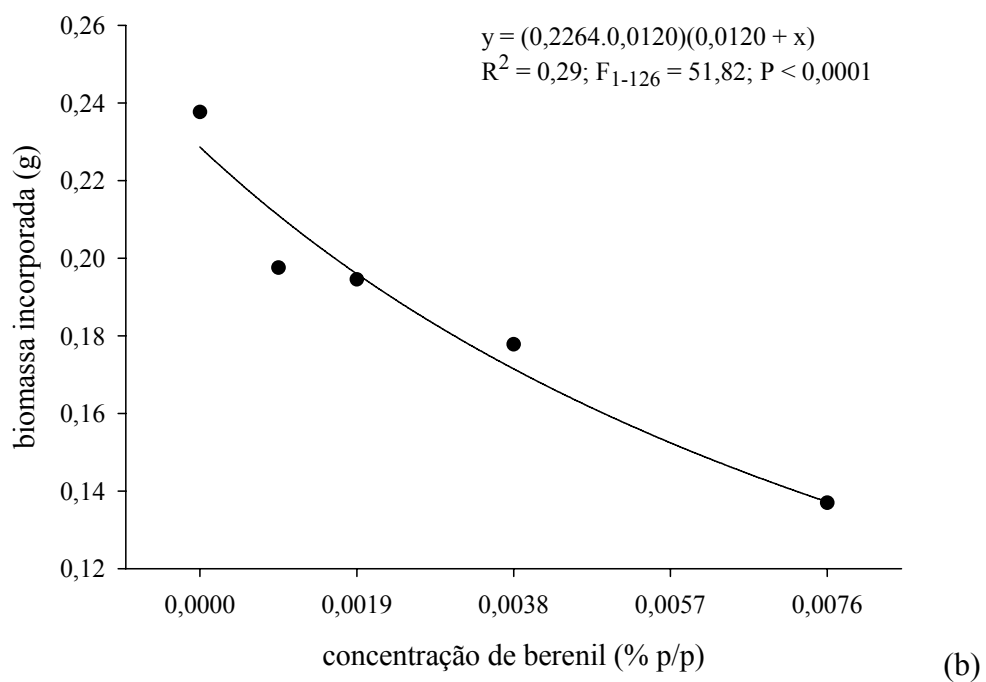
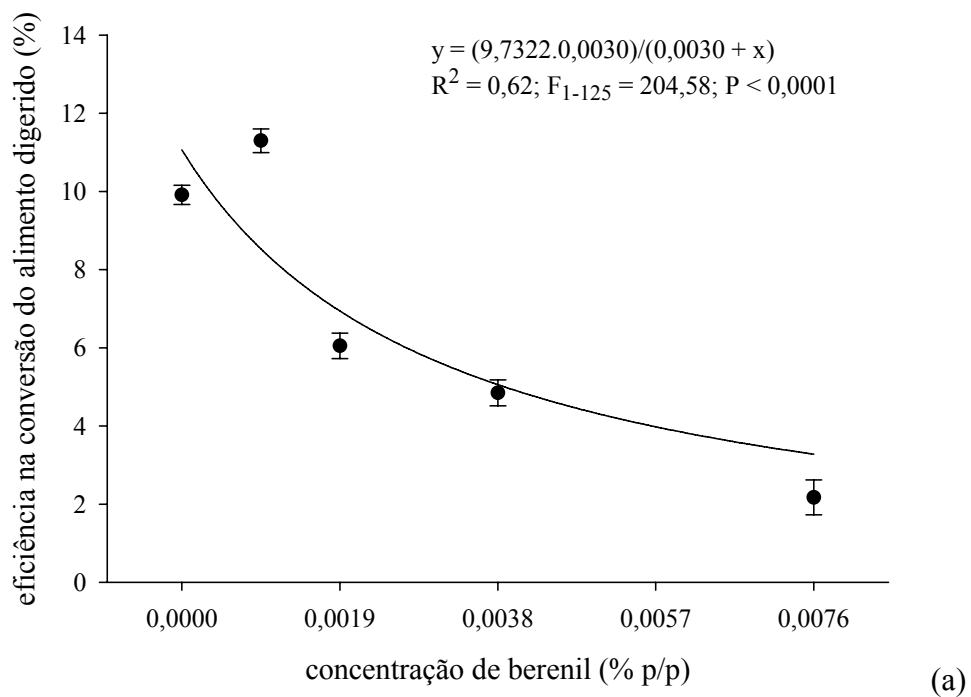


Figura 11. (a) Eficiência na conversão do alimento digerido e (b) Biomassa incorporada de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Os pontos representam as médias de 17 a 32 repetições e barras representam o erro padrão da média.

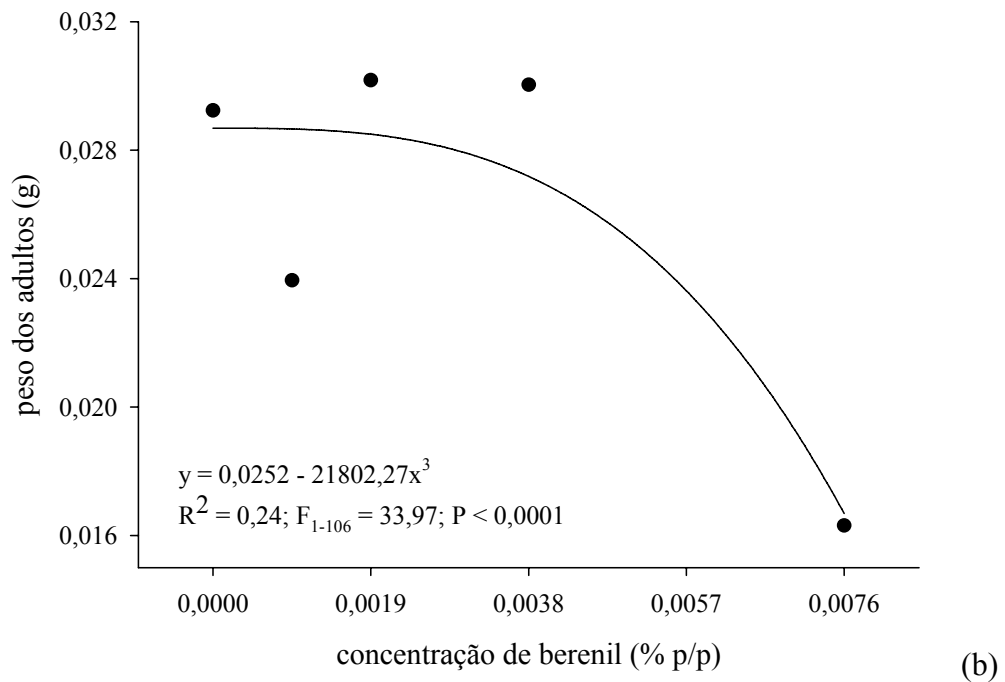
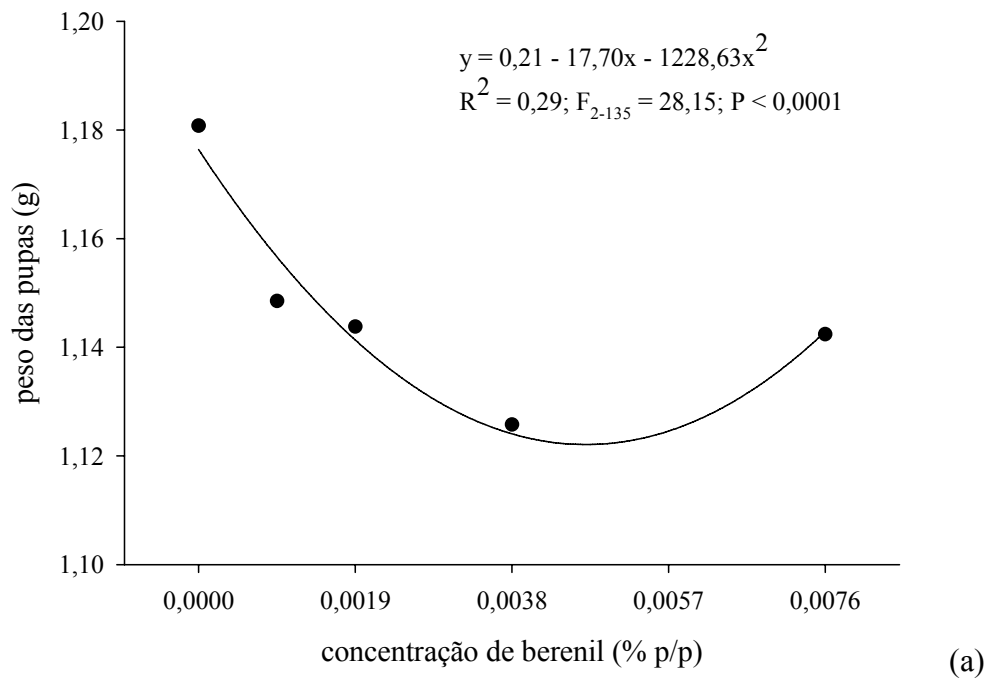


Figura 12. (a) Peso das pupas e (b) Peso dos adultos de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Os pontos representam as médias de 21 a 32 repetições.

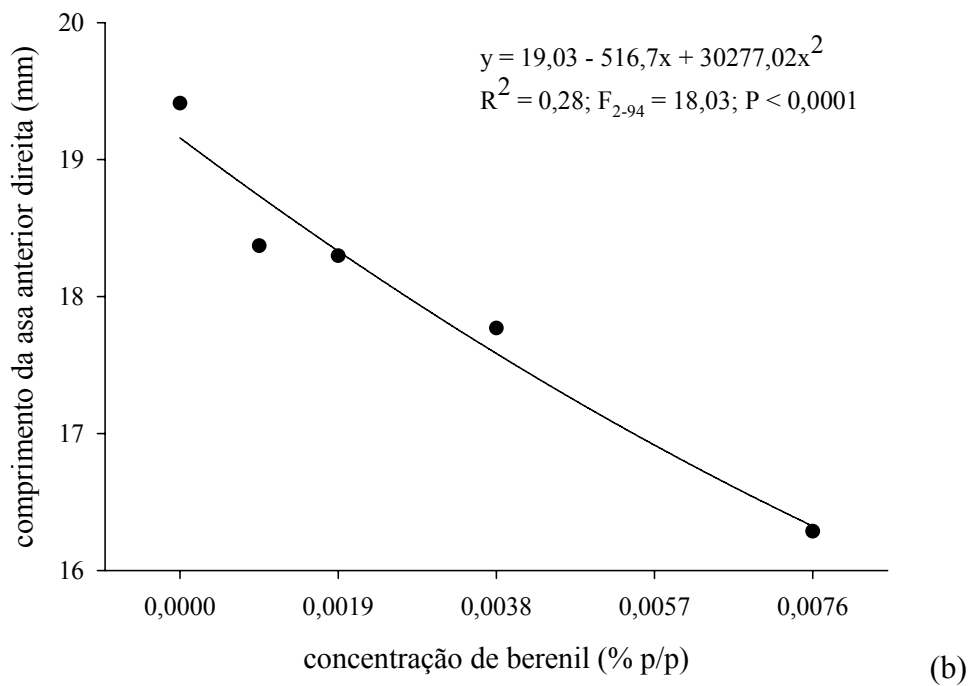
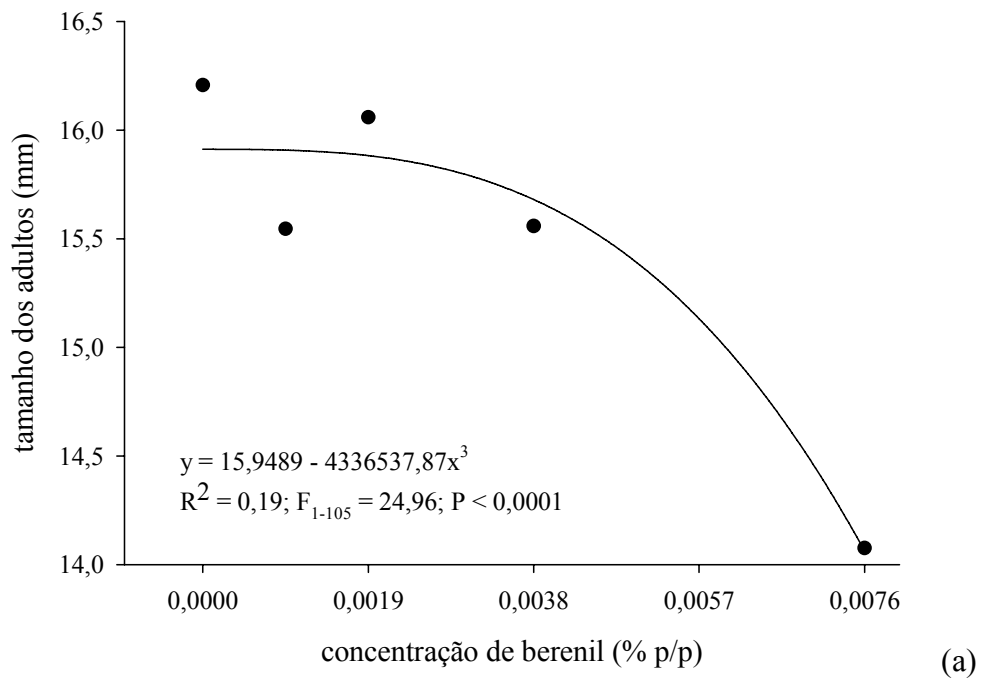


Figura 13. (a) Tamanho dos adultos de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Os pontos representam as médias de 11 a 29 repetições; e (b) Comprimento da asa anterior direita dos adultos de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Os pontos representam as médias de 11 a 24 repetições.

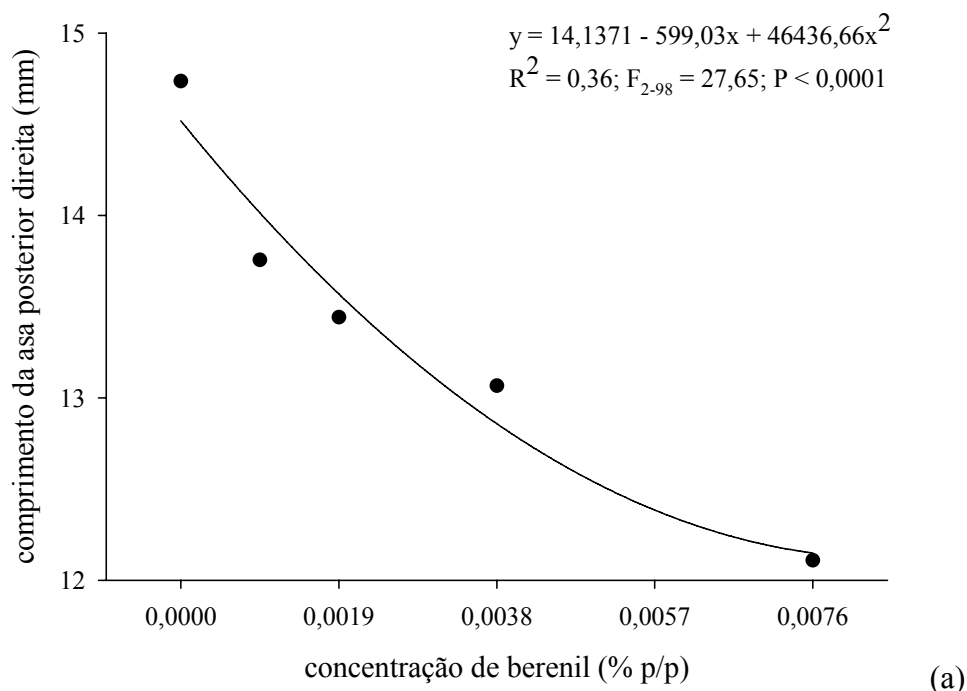


Figura 14. Comprimento da asa posterior direita dos adultos de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Os pontos representam as médias de 11 a 26 repetições.

(Lepidoptera: Pyralidae) (Pompermayer *et al.*, 2001) alimentadas em dietas acrescidas do inibidor de protease da soja do tipo Kunitz (SBTI), essas lagartas apresentaram taxa de crescimento e peso menores que as lagartas que não ingeriram inibidor.

A adição de berenil na dieta fornecida às lagartas de *A. gemmatalis* também afetou as fases de desenvolvimento que se seguem à fase larval. O peso das pupas (Figura 8b) e dos adultos (Figura 9a), o tamanho corporal dos adultos (Figura 9b) e comprimento das asas anterior direita (Figura 10a) e posterior direita (Figura 10b) diminuíram com o aumento da concentração de berenil na dieta. O fato de as pupas apresentarem um menor peso com o aumento da concentração do inibidor sugere que a fecundidade do inseto e, conseqüentemente, a taxa intrínseca de crescimento populacional também diminuiriam com a ingestão de inibidor, como observado em

lagartas de *D. saccharalis* (Pompermayer *et al.*, 2001) alimentadas com SBTI. A redução na fecundidade, atraso no desenvolvimento e o aumento da mortalidade pela ingestão de inibidor também foram verificados em coleópteros da espécie *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) (Bolter e Latoszeck-Green, 1997) quando alimentados em dietas contendo o inibidor de cisteíno-proteases, E-64. Por outro lado, foram relatados alguns casos em que a mortalidade associada à ação de inibidores de proteases é reduzida até mesmo quando altas concentrações do inibidor foram usadas (Ortego *et al.*, 1998), o que não é o caso desse trabalho.

Estudos anteriores realizados com *A. gemmatalis* e o inibidor benzamidina, demonstraram que são necessárias altas concentrações do inibidor (> 0,50% p/p) na dieta para afetar negativamente a performance do inseto e aumentar o consumo, a digestibilidade e os perfis de atividade enzimática do intestino médio da lagarta, sugerindo que os insetos, após a ingestão de inibidores de proteases, podem apresentar respostas de defesa através da hiperprodução de proteases sensíveis à benzamidina e/ou síntese de proteases insensíveis ao inibidor (Pilon *et al.*, 2006). Assim, a benzamidina e os inibidores similares de tripsina, são duvidosos para o uso contra insetos bem adaptados como é o caso de *A. gemmatalis*. Ao contrário, inibidores capazes de ocupar outros sub-sítios do centro catalítico da tripsina, diferente da benzamidina que ocupa somente o sub-sítio S1 (Oliveira, *et al.*, 1993), podem ser alternativas no controle desse inseto-praga.

Podemos observar que os parâmetros biológicos do inseto: taxa relativa de crescimento (Figura 3b), duração da fase larval (Figura 5a), duração do ciclo larval (Figura 5b), eficiência de conversão alimentar (Figura 7a), eficiência de conversão de alimentos ingerido (Figura 7b), biomassa incorporada (Figura 8a) peso de pupas

(Figura 8b) peso dos adultos (Figura 9a), tamanho dos adultos (Figura 9b), comprimento das asas anterior e posterior (Figuras 10a e 10 b), relacionados ao crescimento e/ou desenvolvimento do inseto foram comprometidos com o aumento do inibidor de tripsina-*like*, berenil, na dieta. Estas observações reforçam a hipótese de que este inibidor esteja inibindo serino proteases tripsina-*like* do intestino do inseto diminuindo a biodisponibilidade de aminoácidos essenciais à biossíntese de proteínas importantes para o seu crescimento, desenvolvimento e manutenção do inseto, comprometendo assim sua performance e podendo levá-lo à morte.

Nesse sentido, o berenil surge como alternativa promissora para o controle da lagarta-da-soja e mesmo de outros insetos. Estudos adicionais devem ser realizados para verificar o mecanismo de funcionamento do inibidor no intestino da lagarta e, futuramente, permitir a síntese de peptídeos miméticos para serem aplicados no campo, como estratégia para aumentar a resistência das plantas a insetos-praga.

4. Referências bibliográficas

- Abdeen, A., Virgos, A., Olivella, E., Villanueva, J., Aviles, X., Gabarra, R., Prat, S., 2005. Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology* 57(2): 189–202.
- Agrawal, A. A., Fishbein, M., 2006. Plant defenses syndromes. *Ecology* 87(7) Supplement: 132-149.
- Andrade, M.H.G., Silva, E., Mares-Guia, M., 1990. A plausible identification of secondary binding site in trypsin and trypsinogen. *Brazilian Journal Medical Biology Research* 23: 1223-1231.
- Baldwin, I.T., Preston, C.A., 1999. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta* 208(2): 137-145.
- Becerra, J.X., 1997. Insects on Plants: macro evolutionary chemical trends in host use. *Science* 276(5310): 253-256.
- Bennett, R.N., Wallsgrave, R.M., 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytologist* 127(4): 617–633.
- Benrey, B., Denno, R.F., 1997. The slow-growth-high-mortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. *Ecology* 78(4): 987-999.
- Bernays, E.A., 1997. Feeding by lepidopteran larvae is dangerous. *Ecological Entomology* 22(1): 121–123.
- Bolter, C.J., Latoszeck-Green, M., 1997. Effect of chronic ingestion of the cysteine protease inhibitor, E-64, on Colorado potato beetle gut proteinases. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83(3): 295-303.
- Boots, M., 2000. Density-independent resource limitation and the transmission of an insect pathogen. *Oecologia* 124(2): 172–175.
- Boulay, R., Fedriani, J.M., Manzaneda, A.J., Cerda, X., 2005. Indirect effects of alternative food resources in an ant-plant interaction. *Oecologia* 144(1): 72-79.
- Brito, L.O., Lopes, A.R., Parra, J.R.P., Terra, W.R., Silva-Filho, M.C., 2001. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology* 128B, 365-375.
- Broadway, R.M., Duffey, S.S., 1986. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology* 32(10): 827-833.

- Chen, H., Gonzales-Vigi, E., Wilkerson, C.G., Howe, G.A., 2007. Stability of plant defense proteins in the gut of insect herbivores. *Plant Physiology* 143(4):1954-1967.
- Clancy, K.M., Price, P.W., 1987. Rapid herbivores growth enhances enemy attack: sublethal plant defenses remain a paradox. *Ecology* 68(3): 736-738.
- Cloutier, C., Jean, C., Fournier, M., Yelle, S., Michaud, D., 2000. Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and overproduction of insensitive proteases. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 44(2): 69–81.
- de Bruxelles, G.L., Roberts, M.R., 2001. Signals regulating multiple responses to wounding and herbivores. *Critical Reviews in Plant Science* 20(6): 487-521.
- De Leo, F., Bonade-Bottino, M.A., Ceci, L.R., Gallerani, R., Jouanin, L., 1998. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. *Plant Physiology* 118(3): 997–1004.
- Doak, P., Wagner, D., Watson, A., 2007. Variable extrafloral nectary expression and its consequences in quaking aspen. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne De Botanique* 85(1): 1-9.
- Duffey, S.S., Stout, M.J., 1996. Antinutritive and toxic components of plant defense against insects. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 32(1): 3–37.
- Ehrlich, P.R., Raven, P.H., 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution* 18(4): 586–608.
- Falco, M.C., Marbach, P.A.S., Pompermayer, P., Lopes, F.C.C., Silva-Filho, M.C., 2001. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. *Genetics and Molecular Biology* 24(1-4): 113-122.
- Farrell, B.D., Dussourd, D.E., Mitter, C., 1991. Escalation of plant defense: Do latex and resin canals spur plant diversification? *American Naturalist* 138(4): 881–900.
- Feeny, P.P., 1976. Plant apparency and chemical defense, p.1-40 In: Wallace, J.W.; Mansell, R.L. (eds). *Biochemical interaction between plants and insects*. Plenum, New York.
- Ferreira, C., Capella, A.N., Sitnik, R., Terra, W.R., 1994. Properties of digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 107(4): 631-640.
- Fleming, P.A., Hofmyer, S.D., Nicolson, S.D., 2007. Role of insects in the pollination of *Acacia nigrescens* (Fabaceae). *South African Journal of Botany* 73(1): 49-55.
- Freeman, J.L., Quinn, C.F., Marcus, M.A., Fakra, S., Pilon-Smits, E.A.H., 2006. Selenium-Tolerant Diamondback Moth Disarms Hyperaccumulator Plant Defense. *Current Biology* 16(22): 2181-2192.

Fuxa, J.R., Richter, A.R., 1999. Classical biological control in an ephemeral crop habitat with *Anticarsia gemmatalis* nucleopolyhedrovirus. *Biocontrol* 44(4): 405-421.

Gatehouse, A.M.R., Norton, E., Davison, G.M. *et al.*, 1999. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*: effects on plant protease inhibitors *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Insect Physiology* 45(6): 545-558.

Heinrich, B., Collins, S.L., 1983. Caterpillar leaf damage, and the game of hide-and-seek with birds. *Ecology* 64(3): 592-602.

Hoffmann-Campo, C.B., Oliveira, E.B., Moscardi, F., 1985. Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). EMBRAPA, Serviço de produção de informação, Brasília. 23p.

Jandel Scientific, 1994. TableCurve 2D Windows v 2.0 user's manual. Jandel Scientific, San Rafael, Califórnia, 404p.

Johnston, K.A., Gatehouse, J.A., Anstee, J.H., 1993. Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. *Journal of Insect Physiology* 39(8): 657-664.

Jongsma, M., Bolter, C., 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 43(10), 885-895.

Junqueira, R.G., Silva, E., Mares-Guia, M. 1992. Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 25 (9): 873-887.

Kogan, M., Turnipseed, S.G., 1987. Ecology and management of soybean arthropods. *Annual Review of Entomology* 32: 507-538.

Leather, S.R., Walsh, P.J., 1993. Sub-lethal plant defences: the paradox remains. *Oecologia* 93(2): 153-155.

Lee, K.P., Behmer, S.T., Simpson, S.J., Raubenheimer, D., 2002. A geometric analysis of nutrient regulation in the generalist caterpillar *Spodoptera littoralis* (Boisduval). *Journal of Insect Physiology* 48(6): 655-665.

Lee, K.P., Raubenheimer, D., Simpson, S.J., 2004. The effects of nutritional imbalance on compensatory feeding for cellulose-mediated dietary dilution in a generalist caterpillar. *Physiological Entomology* 29(2): 108-117.

Mares-Guia, M., Shaw, E., 1965. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate side chain. *Journal of Biological Chemistry* 240: 1579-1585.

Maron, J.L., Crone, E., 2006. Herbivory: effects on plant abundance, distribution and population growth. *Proceedings of the Royal Society B* 273(1601): 2575-2584.

Marquis, R.J., 1996. Plant architecture, sectoriality and plant tolerance to herbivores. *Vegetatio* 127 (1): 85-97.

Matos, C.H.C., Pallini, A. Chaves, F. F., Schoereder, J.H., Janssen, A., 2006. Do domatia mediate mutualistic interactions between coffee plants and predatory mites? *Entomologia Experimentalis et Applicata* 118(3): 185-192.

McManus, M.T., Burgess, E.P.J., 1995. Effects of soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera littura*. *Journal of Insect Physiology* 41(9): 731-738.

Mello, M.O., Silva-Filho, M.C., 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14(2): 71-81.

Mulatu, B., Applebaum, S.W., Coll, M., 2004. A recently acquired host provides an oligophagous insect herbivore with enemy-free space. *Oikos* 107(2): 231-238.

Murdock, L.L., Shade, R.E., 2002. Lectins and protease inhibitors as plant defense against insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50(22): 6605-6611.

Oliveira, M.G.A., Rogana, E., Rosa, J.C., Reinhold, B.B., Andrade, M.H., Greene, L.J., Mares-Guia, M., 1993. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site. *Journal of Biological Chemistry* 268(4): 26893-26903.

Ortego, F., Farinós, G.P., Ruiz, M., Marco, V., Castañera, P., 1998. Characterization of digestive proteases in the weevil *Aubeonymus mariaefranciscae* and effects of proteinase inhibitors on larval development and survival. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 88(3): 265-274.

Pilon, A.M., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.C., 2006. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86(1): 23-29.

Pompermayer, P., Lopes, A.R., Terra, W.R., Parra, J.R.P., Falco, M.C., Silva-Filho, M.C., 2001. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99(1): 79-85.

Raubenheimer, D., 1992. Tannic acid, protein, and digestible carbohydrate: dietary imbalance and nutritional compensation in locusts. *Ecology* 73(3): 1012-1027.

Raubenheimer, D., Simpson, S.J., 1994. The analysis of nutrient budgets. *Functional Ecology* 8(6): 783-791.

Ryan, C.A., 1990. Proteinase inhibitors in plants: genes improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 28: 425-449.

SAS Institute, 1989. SAS/STAT User's Guide. Version 6.0. SAS Institute, Cary, NC, USA.

Scheirs, J., DeBruyn, L. 2002. Temporal variability of top-down forces and their role in host choice evolution of phytophagous arthropods. *Oikos* 97(1): 139-144.

Scott, J.G., Wen, Z.G., 2001. Cytochromes P450 of insects: the tip of the iceberg. *Pest Management Science* 57(10): 958-967.

Scriber, J.M., Slansky, F., 1981. The nutritional ecology of immature insects. *Annual Review of Entomology* 26: 183–211.

Simpson, S.J., Simpson, C.L., 1990. The mechanisms of nutritional compensation by phytophagous insects. *Insect Plant Interactions*, vol. 2 (ed. by E. A. Bernays), pp. 111–160. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Simpson, S.J., Raubenheimer, D., 2001. The geometric analysis of nutrient–allelochemical interactions: a case study using locusts. *Ecology* 82(2): 422–439.

Slansky, F., Feeny, P., 1977. Stabilization of the rate of nitrogen accumulation by larvae of the cabbage butterfly on wild and cultivated food plants. *Ecological Monographs* 47(2): 207–228.

Slansky Jr., F., Scriber, J.M., 1985. Food consumption and utilization, p.87-167 In: Kerkut, G.A.; Gilbert, L.I. (eds), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, v. 4. Pergamon Press, Oxford, 373p.

Slansky, F., Wheeler, G.S., 1989. Compensatory increases in food consumption and utilization efficiencies by velvetbean caterpillars mitigate impact of diluted diets on growth. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 51(2): 175–187.

Slansky, F., Wheeler, G.S., 1992. Caterpillars' compensatory feeding response to diluted nutrients leads to toxic allelochemical dose. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 65(2): 171–186.

Slansky, F., 1993 Nutritional ecology: the fundamental quest for nutrients, p.29-91. In: Stamp, N.E.; Caesy, T.M. (eds.), *Caterpillars: Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging*. Chapman & Hall, New York.

SPSS Inc., 2000. SigmaPlot 2000 user's guide. Version 7.0 (Revised Edition). SPSS Inc., Chicago.

Stephun, A., Baldwin, I.T., 2007. Resistance management in a native plant: nicotine prevents herbivores for compensating for plant protease inhibitors. *Ecology Letters* 10(6): 499-511.

Telang, M.A., Srinivasan, A., Patankar, A.G., Harsulkar, A.M., Joshi, V.V. Damle, A., Deshpande, V.V., Sainani, M.N., Ranjekar, P.K., Gupta, G.P., Birah, A., Rani, S., Kachole, M., Giri, A P., Gupta, V.S., 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors:

potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Phytochemistry* 63: 643-652.

Trigo, J.R., 2000. The chemistry of antipredator defense by secondary metabolites in neotropical Lepidoptera: facts, perspectives and caveats. *Journal of Brazilian Chemical Society* 11(6): 551-561.

Turlings, T.C.J., Tumlinson, J.H., Eller, F.J., Lewis, W.J., 1991. Larval-damaged plants: source of volatile synomones that guide the parasitoid *Cotesia marginiventris* to the micro-habitat of its hosts. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 58(1): 75–82.

Turnipseed, R.G., Kogan, M., 1976. Soybean entomology. *Annual Review of Entomology* 21: 247-282.

Van't Hof, H.M., Martin, M.M., 1988. The effect of diet water content on energy expenditure by third-instar *Manduca sexta* larvae (Lepidoptera: Sphingidae). *Journal of Insect Physiology* 35(5): 433-436.

Waldbauer G.P., 1968. The consumption and utilization of food by insects. *Advances in Insect Physiology* 5: 229-288.

Winterer, J., Bergelson, J., 2001. Diamondback moth compensatory consumption of protease inhibitor transformed plants. *Molecular Ecology* 10(4): 1069–1074.

**Digestibilidade Protéica e Atividade das Proteases Digestivas da Lagarta da
Soja em Função da Concentração de Berenil na Dieta**

RESUMO:

1. Os inibidores de proteases ocorrem naturalmente em muitas famílias botânicas, desempenhando diversas funções. Podem atuar em diversos processos fisiológicos das plantas, como reservas protéicas e, principalmente, na defesa contra insetos herbívoros. Os inibidores funcionam como substratos específicos para as proteases digestivas de herbívoros, formando um complexo estável no qual a proteólise é limitada e extremamente lenta. Os objetivos desse trabalho foram avaliar se a concentração do inibidor sintético de serino-proteases, berenil presente na dieta de *A. gemmatalis*, (i) diminui o consumo e a digestibilidade protéica do alimento pelas lagartas e (ii) afeta negativamente a atividade das proteases digestivas de *A. gemmatalis*.
2. A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, foi alimentada em dietas artificiais contendo 0; 0,00095; 0,0019; 0,0038; 0,0076; 0,0152; 0,0304; 0,0608; 0,0912; 0,125 e 0,25% (p/p) de berenil, diariamente.
3. Com o aumento da concentração de berenil houve aumento do consumo de dieta e da digestibilidade protéica, enquanto a atividade proteásica e a atividade tríptica dos extratos enzimáticos diminuíram, indicando que não houve síntese de outras proteases. É provável que tenha ocorrido o fenômeno de ativação enzimática pelo inibidor. O berenil pode estar ligando-se ao sítio de especificidade S₁, e ao sítio secundário S₂, o sítio de ativação da tripsina.

4. Foram obtidos resultados significativos para a utilização do berenil, mesmo em baixas concentrações e sob condições de laboratório, para o controle de uma população de *A. gemmatalis*. Estudos adicionais em campo são necessários para identificar a ação do berenil sobre populações de *A. gemmatalis* em condições naturais, tornando possível as novas etapas na identificação e síntese de um peptídeo mimético como alternativa ao uso de agroquímicos no controle da lagarta da soja.

PALAVRAS-CHAVE: Inibidor de proteases, ativação enzimática, digestibilidade protéica, berenil, *Anticarsia gemmatalis*.

1. Introdução

Inibidores de proteases compreendem uma das mais abundantes classes de proteínas das plantas. A maioria dos órgãos de estocagem das plantas como sementes e tuberos contém de 1 a 10% das proteínas totais na forma de inibidor de proteases que inibem diferentes tipos de enzimas. Os inibidores podem agir no controle da proteólise dentro das células, organelas ou fluidos quando a limitação da proteólise é importante para os processos bioquímicos e fisiológicos (Ussuf *et al.*, 2001, Fortunato *et al.*, 2007).

Em insetos, estudos anteriores demonstraram que os inibidores de proteases podem reduzir a atividade proteolítica *in vitro* de proteases extraídas de um grande número de espécies (Broadway e Duffey, 1986; Fortunato *et al.*, 2007), conseqüentemente, a ingestão crônica desses inibidores na dieta ou a presença em altas concentrações na planta reduz significativamente o desenvolvimento desses herbívoros. Entretanto, para a utilização efetiva de inibidores de proteases no manejo de pragas é imprescindível conhecer os tipos de enzimas presentes no intestino desses insetos. Das quatro classes de enzimas proteolíticas, as duas mais comumente encontradas no intestino de insetos fitófagos são as serino e cisteíno-proteases. Asparto e metalo-proteases são classes de enzimas que desempenham papel menos importante no processo digestivo dos insetos embora estejam presentes em algumas ordens (Terra *et al.*, 1994).

O intestino das larvas de lepidópteros é um ambiente proteolítico complexo podendo conter tripsinas, quimiotripsinas, elastases, proteases catepsina-B *like*, aminopeptidases e carboxipeptidases, todas responsáveis pela digestão protéica (Xavier *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005; Pilon *et al.*, 2006; Srinivasan *et al.*, 2006).

Serino-proteases são as proteases mais bem estudadas e estão presentes em vírus, procariontes e eucariontes, sugerindo que essas enzimas tenham papel vital para a sobrevivência dos organismos. Em insetos, as serino-proteases são conhecidas por predominar no ambiente intestinal e contribuir com cerca de 95% da atividade proteolítica total em lepidópteros (Xavier *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005; Pilon *et al.*, 2006; Srinivasan *et al.*, 2006). Entre as serino-proteases, tripsina e quimiotripsina são as mais comumente encontradas, atuando em uma ampla faixa de processos fisiológicos que incluem digestão, ativação de proteínas na cascata da melanização e nos processos de encapsulamento, ação antibacteriana pela síntese de peptídeos, metamorfose, síntese de neuropeptídeos, coagulação da hemolinfa e resposta imune em insetos (Oliveira *et al.*, 1993; Gorman e Paskewitz, 2001; Haq *et al.*, 2004).

O mecanismo de ação das tripsinas envolve a clivagem preferencial das ligações peptídicas internas das cadeias laterais carboxila de L-aminoácidos básicos como arginina e lisina. A atividade digestiva de enzimas tripsina-like foi amplamente reportada entre espécies de insetos e sua especificidade assemelha-se às tripsinas dos vertebrados. Contudo, tripsinas de ambos os grupos podem diferir no pH de atividade é máxima, no peso molecular, na sensibilidade a íons, no ponto isoelétrico e na sensibilidade a inibidores de proteases vegetais (Terra *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2005).

Inibidores de serino-proteases podem ter diversas funções em plantas. Estas incluem a regulação de proteinases endógenas durante a dormência de sementes, a mobilização das proteínas de reserva e a proteção contra as enzimas proteolíticas de parasitas e insetos (Haq *et al.*, 2004). Sua ação sobre as tripsinas digestivas de mamíferos e insetos pode diferir, indicando que a perturbação da digestão protéica do

inseto, quando alimentado em dieta contendo inibidores de protease, requer a seleção dos inibidores apropriados para que as proteases digestivas sejam afetadas. Em adição, a adaptação de insetos a inibidores de proteases tem sido observada em algumas espécies (Broadway, 1995; Jongsma e Bolter, 1997), o que pode comprometer seu potencial como método alternativo para o controle de insetos-praga. Os mecanismos pelos quais tal adaptação ocorre são importantes e já começam a receber atenção de alguns grupos de pesquisa (Srinivasan *et al.*, 2006).

A soja (*Glicine max* (L.) Merrill) é um cultivo de importância mundial (Silva *et al.*, 2002, 2004; Monteiro *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2004, 2005) que tem inibidores de serino-proteases induzíveis como mecanismo de defesa a insetos herbívoros (REFERÊNCIA). Contudo, a lagarta da soja, *A. gemmatalis*, permanece como uma praga-chave dos cultivos de soja em regiões tropicais. Caracterizações recentes das proteases digestivas da lagarta da soja indicam que tripsina-like são as enzimas digestivas predominantes nessa espécie (Oliveira *et al.*, 2005). Isso torna *A. gemmatalis* um modelo adequado para estudos visando avaliar a adaptação potencial do inseto a inibidores de proteases não somente de ocorrência natural, como o inibidor de tripsina da soja (SBTI) e inibidor Bowman-Birk da soja (SBBI), mas também a inibidores sintéticos, como a benzamidina (Pilon *et al.*, 2007) e o berenil.

Nesse sentido, os objetivos desse trabalho foram avaliar se a concentração do inibidor sintético de serino-proteases, berenil presente na dieta de *A. gemmatalis*, (i) diminui o consumo e a digestibilidade protéica do alimento pelas lagartas e (ii) afeta negativamente a atividade das proteases digestivas de *A. gemmatalis*.

2. Material e Métodos

2.1. Criação da lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatilis*

Os experimentos foram conduzidos com insetos provenientes de uma criação estabelecida no laboratório de criação de insetos no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV) sob condições constantes de temperatura (26 ± 2 °C), umidade relativa ($70 \pm 5\%$), fotoperíodo (14 h-claro/10 h-escuro), a partir de indivíduos obtidos do Centro Nacional de Pesquisa da Soja (CNPSO), Londrina, PR.

Os adultos foram mantidos em gaiolas com dimensões de 50 cm de largura, 40 cm de comprimento e 50 cm de altura, cobertas com tecido de organza e revestidas internamente com folhas de papel sulfite branco (A4). Os insetos adultos foram alimentados em um chumaço de algodão embebido com uma solução nutritiva à base de mel (10,5 g), cerveja (350 mL), sacarose (60 g), ácido ascórbico (1,05 g), nipagin® (1,05 g) e água (1050 mL), colocado sobre uma placa de Petri no fundo da gaiola.

No dia seguinte à postura das mariposas, o que ocorre cerca de três dias após a emergência dos adultos, as folhas de papel toalha que revestiram as gaiolas, contendo ovos aderidos, foram retiradas e cortadas em pedaços de 2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento. Cada um desses fragmentos foi transferido para um copo plástico de 500 mL com um orifício de 2 cm na tampa recoberto por tecido de organza, e mantidos em uma câmara climatizada. Após a eclosão dos ovos, quarenta lagartas foram alimentadas diariamente com dieta artificial (Hoffman-Campo *et al.* 1985) até atingirem a fase de pré-pupa.

2.2. Preparo da dieta artificial

As dietas foram preparadas com concentrações crescentes do inibidor de protease, berenil (Tabela 1). No preparo das dietas misturou-se feijão cozido (mulatinho), levedo de cerveja, gérmen de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água com o auxílio de um liquidificador industrial. A mistura foi autoclavada durante 1 hora à pressão de 1,5 kgf/cm². Em seguida a mistura foi transferida para o liquidificador e foram adicionados ácido ascórbico, ácido sórbico, nipagin®, formol 40% e solução vitamínica (Tabela 2) até formar uma pasta homogênea. Essa pasta foi transferida ainda quente para recipientes plásticos com tampa e mantida à temperatura de 25 °C até esfriar. Posteriormente, os recipientes foram levados a uma câmara germicida com luz ultravioleta onde permaneceram por 5 minutos. A dieta foi conservada em geladeira a ± 4 °C até o término dos experimentos.

2.3. Determinação das concentrações de berenil utilizadas nos bioensaios

Ensaio preliminares foram realizados com dietas contendo 0; 0,125 e 0,25% (p/p) de berenil conforme trabalho de Pilon (2007) realizado com benzamidina. Contudo, para os tratamentos contendo inibidor, as lagartas de *A. gemmatalis* não completaram o ciclo de vida, morrendo ainda no 2° instar. Com base nessas observações, foram definidas concentrações menores que as utilizadas anteriormente nos ensaios preliminares. As novas concentrações de berenil foram obtidas dividindo-se o valor 0,125 por 2. Foi preparada uma dieta com concentração de 0,0608% (p/p) de berenil, ou seja, aproximadamente a metade da menor concentração de inibidor. Esse mesmo cálculo foi realizado e foram obtidas concentrações de 0,0304 e 0,0152% (p/p) de berenil. Também foi considerado o valor de 0,304 como intervalo superior para 0,0608, obtendo-se uma concentração de

0,0912% (p/p) de berenil. As dietas contendo 0,0152; 0,0304; 0,0608 e 0,0912% (p/p) foram testadas e observou-se que as lagartas de *A. gemmatalis* não sobreviveram até sofrerem metamorfose larva-pupa. O mesmo cálculo foi utilizado para obter novas concentrações de inibidor que, ao serem adicionados na dieta, possibilitassem que os insetos que se alimentassem e completassem todo o ciclo de vida. Foram determinadas as concentrações de 0,0076; 0,0038; 0,0019; 0,00095% (p/p) de berenil e realizados bioensaios nos quais observou-se que as lagartas de *A. gemmatalis* completaram todo o seu ciclo de desenvolvimento quando alimentadas com dietas contendo de 0 a 0,0076% (p/p) de berenil. Todos os 11 tratamentos (dieta controle e dietas contendo cada uma das 10 concentrações de inibidor) foram utilizados para realização dos experimentos de desenvolvimento pós-embrionário, digestibilidade e atividade enzimática de *A. gemmatalis*.

2.4. Digestibilidade protéica

Quarenta larvas de primeiro ínstar de *A. gemmatalis*, provenientes da criação-estoque, foram individualizadas em potes plásticos de 200 mL. Os potes foram cobertos com uma tampa plástica com orifício central de 1 cm de diâmetro recoberto por tecido de organza e mantidos em câmara climatizada sob condições controladas de temperatura (item 2.1). As lagartas foram alimentadas, diariamente, com dieta artificial pesada imediatamente antes de ser fornecida aos insetos. No dia seguinte, as sobras de dieta eram recolhidas e secas em estufa com circulação de ar, a 105 °C por 24 h. Em seguida, as sobras de dieta foram transferidas para um dessecador para que esfriassem sem reabsorver umidade. Após atingirem a temperatura ambiente, as sobras foram pesadas e os pesos anotados para o cálculo do consumo individual total das lagartas. Amostras das dietas oferecidas às lagartas também foram secas em

estufa, mantidas em dessecador até atingirem a temperatura ambiente e pesadas para determinação do teor de umidade. Foram realizadas três repetições.

As fezes eliminadas pelas lagartas foram coletadas diariamente, a partir da introdução da dieta até a fase pré-pupa, e acondicionadas em recipientes individuais mantidos sob refrigeração. Ao término do experimento, as fezes foram secas em estufa seguindo o mesmo procedimento descrito para as sobras de dieta. A concentração de proteínas presentes na dieta ingerida e nas fezes excretadas foi determinada pelo método semimicro-Kjeldahl descrito pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists, 1984). Cada amostra foi colocada em um tubo de vidro ao qual foram adicionados 10 mL de solução digestora (H_2SO_4 95% e catalisadores químicos (Se e CuSO_2)). Cada tubo foi colocado em uma chapa de aquecimento com temperatura final de 340 °C, durante 3 h. Após a obtenção do material aparentemente digerido, os tubos foram retirados da chapa e em seguida foi adicionado 1 mL de peróxido de hidrogênio 30% em cada tubo. Posteriormente, os tubos contendo a mistura foram submetidos a aquecimento a 340 °C por mais 1 hora. Após esse tempo, os tubos foram retirados do aquecimento e mantidos em temperatura ambiente até esfriarem. As amostras digeridas foram destiladas e a amônia liberada nesse processo foi recolhida em um erlenmeyer de 125 mL contendo 20 mL de solução de ácido bórico 4%. O material recolhido foi titulado com HCl 0,05 N. O volume de HCl gasto na titulação foi registrado e utilizado para o cálculo da concentração de nitrogênio total da amostra. Para conversão da concentração de nitrogênio em proteínas foi utilizado o fator 6,25. Cada ensaio foi realizado em duplicata. A digestibilidade protéica foi calculada subtraindo-se a quantidade de proteínas eliminadas nas fezes da quantidade de proteínas ingeridas, dividido pela quantidade de proteína ingerida, conforme a fórmula a seguir:

$$\% \text{Digestibilidade} = \left(\frac{\text{PI} - \text{PE}}{\text{PI}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

em que,

PI = Proteína ingerida;

PE = Proteína eliminada.

2.5. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio da lagarta

O intestino médio de *A. gemmatalis* foi obtido após dissecação de larvas de 6º instar em presença de HCl 10^{-3} M a 4 °C e acondicionados em tubos plásticos de 2 mL contendo 1 mL de HCl 10^{-3} M. Em cada tubo foram adicionados 150 mg de intestino das lagartas. O extrato enzimático foi obtido pelo extravasamento do conteúdo do lúmen intestinal mediante o rompimento das células do epitélio intestinal resultante de nove ciclos de congelamento em N₂(liq) e descongelamento em banho a 37 °C (Oliveira *et al.*, 2005). Após os ciclos, frações de 1 mL do extrato foram centrifugadas em tubos plásticos de 2 mL com tampas a 100.000 g por 30 min a 4 °C. O sobrenadante contendo o material solúvel foi retirado e mantido a -18 °C para determinação da concentração de proteína e atividade enzimática.

2.6. Concentração de proteína

A concentração de proteína dos extratos enzimáticos de *A. gemmatalis* foi obtida segundo o método descrito por Bradford (1976), utilizando como padrão uma solução 0,2 mg/mL de (BSA).

2.7. Atividade proteásica

A atividade proteásica foi determinada segundo o método descrito por Tomarelli *et al.* (1949) utilizando-se azocaseína 2% (p/v) como substrato em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, 37 °C. A mistura reacional consistiu em 50 µL de substrato e 60 µL de extrato enzimático e foi incubada por 30 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 240 µL de ácido tricloroacético (TCA) 10% (p/v).

Após a parada de reação as amostras foram agitadas vigorosamente em vórtex e mantidas em repouso no gelo por 15 minutos. Em seguida, os tubos plásticos de 2 mL com tampas contendo as amostras foram centrifugados a 8.000 g por 5 minutos a 25 °C para remoção da proteína precipitada. Uma alíquota de 240 µL do sobrenadante foi transferida para tubos contendo 280 µL de NaOH 1M. A atividade do sobrenadante foi determinada, espectrofotometricamente, a 440 nm. O experimento foi realizado em uma série de três repetições e em triplicatas.

2.8. Atividade amidásica

A atividade amidásica foi determinada segundo o método descrito por Erlanger *et al.* (1961) com algumas modificações, utilizando o substrato cromogênico para tripsina-like L-BAPNA (N-benzoil-L-arginil *p*-nitroanilida) 60 mM diluído em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl₂ 20 mM, obtendo-se uma concentração final de substrato de 1,2 mM. A mistura reacional consistiu de 500 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, 500 µL de substrato e 10 µL de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático a absorbância da amostra foi obtida em 410 nm em função do tempo (2,5 min), a 25 °C. A atividade foi determinada pela formação do produto *p*-nitroanilida, utilizando para os cálculos o coeficiente de

Tabela 1. Composição das dietas artificiais (g/100 g de mistura) utilizadas nos bioensaios com lagartas de *A. gemmatalis*

Ingredientes	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 3	Dieta 4	Dieta 5	Dieta 6	Dieta 7	Dieta 8	Dieta 9	Dieta 10	Dieta 11
Feijão mulatinho(cozido) ¹	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80	4,80
Levedo de cerveja ¹	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40	2,40
Gérmen de trigo ¹	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80
Proteína de soja ¹	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80	3,80
Caseína ²	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90	1,90
Agar-agar ³	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34	1,34
Ácido ascórbico ²	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
Ácido sórbico ³	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11	0,11
Solução vitamínica ¹	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38	0,38
Nipagin® ³	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19	0,19
Formol 40% ¹	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23	0,23
Inibidor berenil ²	0	0,00095	0,0019	0,0038	0,0076	0,0152	0,0304	0,0608	0,0912	0,125	0,25

¹ Obtido no comércio de Viçosa, MG;

² Obtido da Sigma-Aldrich;

³ Obtido da Isofar- Indústria e comércio de produtos químicos;

Tabela 2. Composição da solução vitamínica utilizada na composição das dietas artificiais utilizadas nos bioensaios com lagartas de *A. gemmatalis*

Ingredientes	mg/100 mL de xarope
Niacinamida	1000
Pantotenato de cálcio	1000
Tiamina	250
Riboflavina	500
Piridoxina	250
Biotina	0,02
Vitamina B12	2
Ácido fólico	250

extinção molar de $8800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. O experimento foi realizado em uma série de três repetições e em triplicatas.

2.9. Atividade esterásica

A atividade esterásica foi determinada segundo o método descrito por Hummel (1959), utilizando-se o substrato L-TAME (N- α -Tosil-L-arginil metil éster) em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 com CaCl_2 20 mM, na concentração final de 0,10 mM. A mistura reacional consistiu de 500 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, 500 μL de substrato e 10 μL de extrato enzimático. Após a adição do extrato enzimático, a absorbância da amostra foi obtida em 247 nm em função do tempo (2,5 min), a 25 °C. Para o cálculo da atividade foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $540 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a 247 nm. O experimento foi realizado em uma série de três repetições e em triplicatas.

2.10. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de regressão utilizando o programa TableCurve 2D Windows v2.00 (Jandel Scientific, 1994) e os modelos escolhidos foram plotados pelo programa SigmaPlot, versão 7.0 (SPSS, 2001) (Tabela 2B, anexos).

3. Resultados e discussão

3.1. Consumo alimentar

O consumo total de dieta pelas lagartas de *A. gemmatalis* aumentou com o aumento da concentração de inibidor na dieta (Figura 1a), com um pico no consumo sendo observado quando as lagartas foram alimentadas em dietas com 0,0076% (p/p) de berenil. Em concentrações maiores de inibidor, o consumo total diminuiu a níveis mais baixos que o tratamento em que não houve adição de inibidor na dieta. O aumento significativo no consumo na concentração de 0,0076% de berenil pode ter ocorrido devido ao prolongamento na duração da fase larval do inseto (Figura 1b). Em concentrações de berenil maiores que 0,0076% , a duração da fase larval diminui devido à morte de todos os insetos nesses tratamentos antes de atingir a fase adulta. Por outro lado, o aumento no consumo de dieta com a adição de inibidores parece ser uma estratégia de alimentação compensatória, sugerindo que a ingestão de IP tenha promovido uma contra-adaptação do inseto.

Esse tipo de resposta já foi observado em lagartas de *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), especialista em plantas da família Cruciferae e com histórico de resistência a todos os inseticidas empregados no seu controle, inclusive o Bt (Talekar e Shelton, 1993). A alimentação das lagartas em plantas de mostarda expressando um inibidor ao qual a lagarta não estaria adaptada, o inibidor protéico da

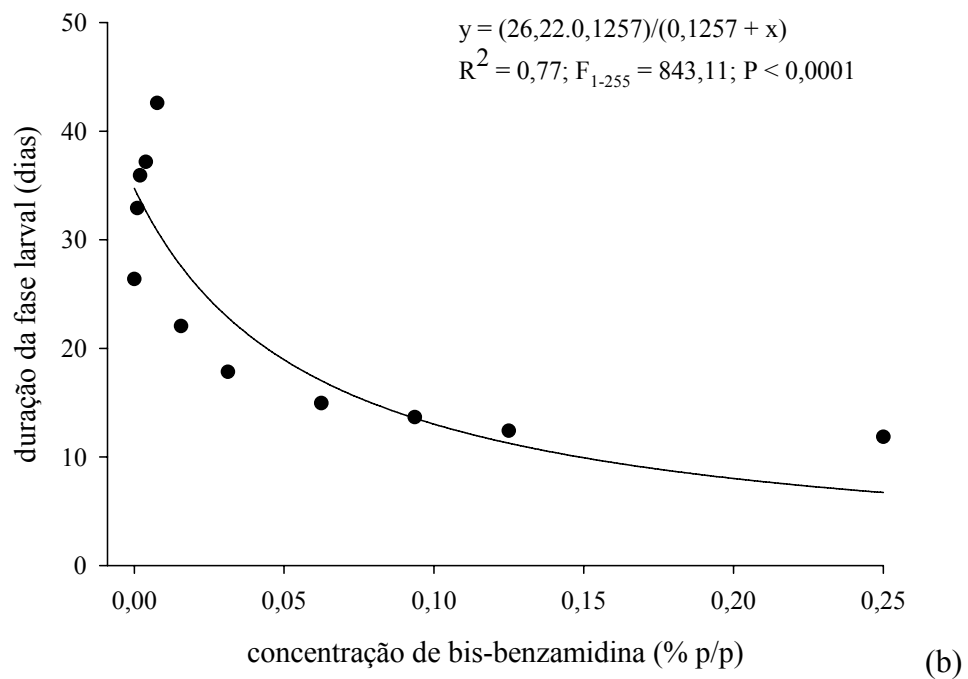
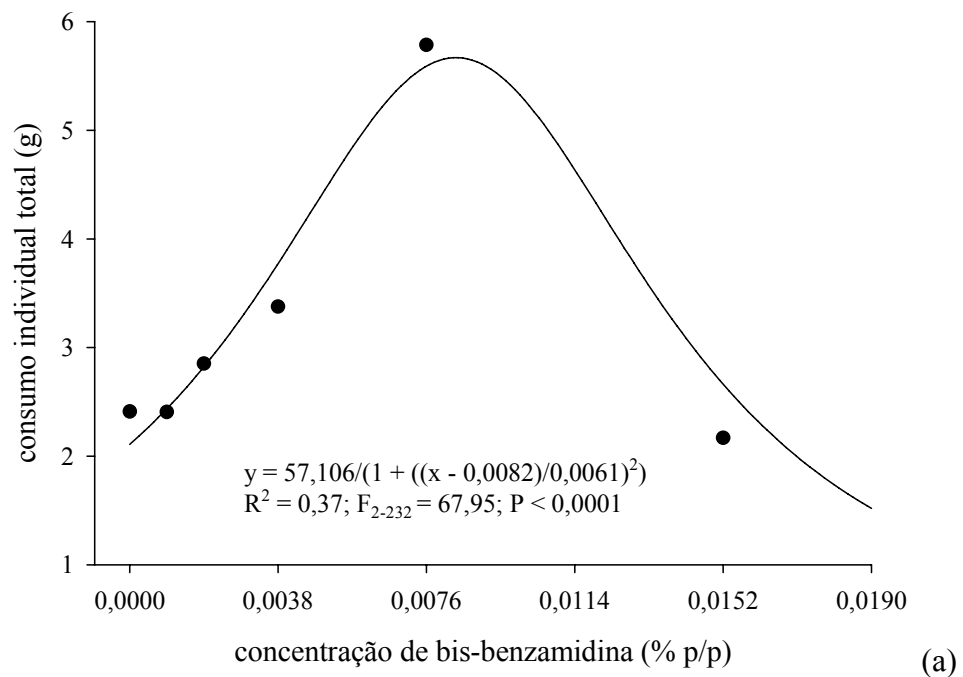


Figura 1. (a) Consumo individual total de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Pontos representam as médias de 37 a 40 repetições; (b) Duração da fase larval de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Pontos representam as médias de 18 a 39 repetições.

da batata (PI II), reduziu a taxa de crescimento populacional do inseto, mas promoveu o aumento no consumo foliar das plantas pelas lagartas como estratégia para compensar o efeito deletério do inibidor (Winterer e Bergelson, 2001).

3.2. Digestibilidade protéica e atividade enzimática

Com o aumento da concentração de berenil na dieta, além do aumento do consumo alimentar, a digestibilidade protéica das lagartas aumentou significativamente (Figura 2a) sugerindo a ativação do mecanismo que regula o nível da atividade de tripsina no intestino médio de *A. gemmatalis* pelo inibidor. O aumento da digestibilidade pode estar associado ao aumento da síntese de serino-proteases ou outros tipos de proteases. Com o aumento da concentração de inibidor na dieta poderia estar havendo, também, a ocupação do sítio de especificidade S₁ pelo berenil (Mares-Guia e Shaw, 1965), bem como a ocupação do sítio secundário, o sítio de ativação da tripsina S₂ (Oliveira *et al.*, 1993), promovendo ativação da tripsina, como já fora demonstrado por Oliveira *et al.* (1993).

Lagartas de lepidópteros polífaros têm a capacidade de responder a mudanças na qualidade nutricional da dieta e/ou agentes antimetabólicos, como os inibidores de proteases, alterando suas proteases digestivas. As mudanças podem ser qualitativas, caracterizando-se pelo aumento nos níveis de proteases intestinais para manter a digestão nos níveis ideais, ou quantitativas, que incluem a síntese de isoformas insensíveis às quais o inibidor seria incapaz de se ligar e inibir (Srinivasan *et al.*, 2006). *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto herbívoro generalista que tem o repolho como sua planta hospedeira preferida. Quando alimentadas em dieta protéica contendo inibidor de proteases extraído de folhas de repolho, as lagartas de *T. ni* tiveram sua digestibilidade protéica aumentada devido à

síntese de outras proteases (Broadway, 1995). A síntese de tripsinas insensíveis à ação de IP's também é uma das estratégias empregadas por *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *S. frugiperda* não teve o seu crescimento e desenvolvimento afetados pela ingestão de inibidor extraído de sementes de soja (Paulillo *et al.*, 2000) porque expressaram endopeptidases com baixa susceptibilidade ao inibidor, enquanto *H. virescens* produziu isoformas de tripsina ao alimentarem-se em folhas de tabaco (Brito *et al.*, 2001), uma de suas plantas hospedeiras caracterizada por conter altos níveis de defesas químicas. A adaptação à ingestão de IP's pela síntese de proteases insensíveis também já foi identificada em outras espécies da família Noctuidae como *Helicoverpa zea*, *T. ni*, *Agrotis ipsilon* e *H. armigera*. (Mazundar-Leighton e Broadway, 2001; Chougule *et al.*, 2005, Volpicella *et al.*, 2006).

Lepidópteros também respondem à presença de inibidores pela regulação das isoformas de quimiotripsina e tripsinas no trato intestinal (Bown, *et al.*, 2004; Telang *et al.* 2003). Em coleópteros, foi observada reconfiguração da expressão das enzimas digestivas quando as larvas foram alimentadas em dietas com inibidores de proteases. *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), duas pragas de grãos armazenados, seriam capazes de alterar o perfil de suas enzimas proteolíticas entre aspartil, cisteíno e serino-proteases quando alimentadas em dietas acrescidas de inibidores de cisteíno e serino-proteases, E-64 e inibidor de tripsina Kunitz da soja e inibidor de cisteíno-proteases da soja, respectivamente (Oppert *et al.*, 2005; Zhu-Salzman *et al.*, 2003), ou mesmo reconfigurar a expressão da principal enzima digestiva (Ahn *et al.*, 2007). Embora *A. gemmatilis* seja um herbívoro generalista e tenha demonstrado adaptação a IP's de tripsina-like pela hiperprodução de enzimas proteolíticas (Pilon *et al.*, 2006)

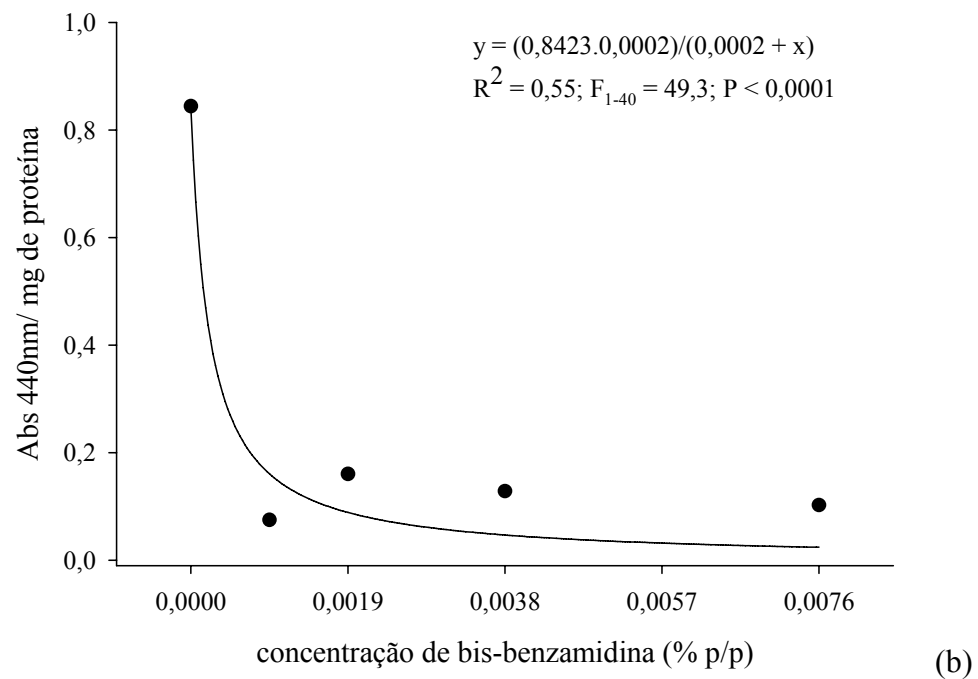
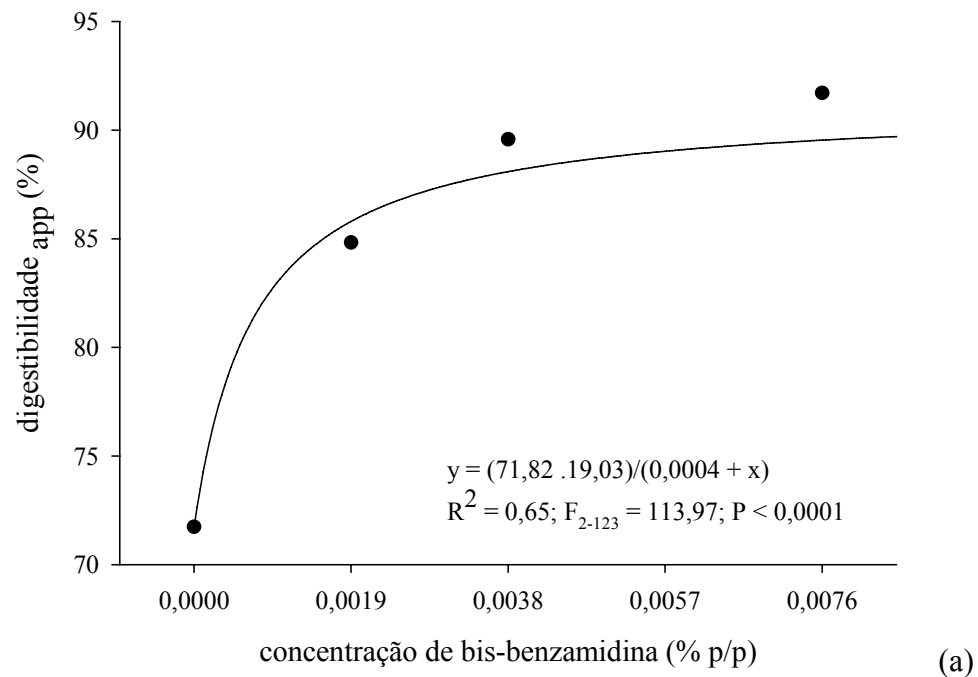


Figura 2. (a) Digestibilidade protéica aparente total de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. Pontos representam as médias de 16 a 32 repetições. (b) Atividade proteolítica específica das enzimas tripsina-like no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas em função da concentração de berenil na dieta. Pontos representam as médias de 8 a 9 repetições.

essa não parece ser a resposta da lagarta-da-soja quando alimentada em dieta acrescida de berenil. Foi verificado que a atividade proteolítica no intestino médio diminuiu com o aumento da concentração do inibidor (Figura 2b), indicando que não houve aumento na produção de enzimas digestivas em resposta à ingestão do inibidor. A atividade de tripsina-*like* também diminuiu em presença do inibidor, como pode ser observado nos perfis das atividades amidásica e esterásica (Figuras 3a e b). O inibidor berenil além de se ligar ao centro ativo da tripsina como inibidor competitivo, liga-se ao sítio ativo secundário da enzima causando um comportamento competitivo parabólico com o substrato (Andrade *et al.*, 1990).

O berenil é um inibidor parcialmente competitivo da tripsina podendo formar complexos binários EI e ternários IEI e IES (Oliveira *et al.*, 1993). O complexo ternário IES não impede a enzima de produzir produto, mas somente o complexo IEI. Assim, a atividade é apenas diminuída em presença do berenil. No entanto, ele também atua como um modulador causando a ativação da enzima quando ocupa o sítio secundário S₂ (Oliveira *et al.*, 1993) podendo aumentar sua atividade através do fenômeno de ativação enzimática.

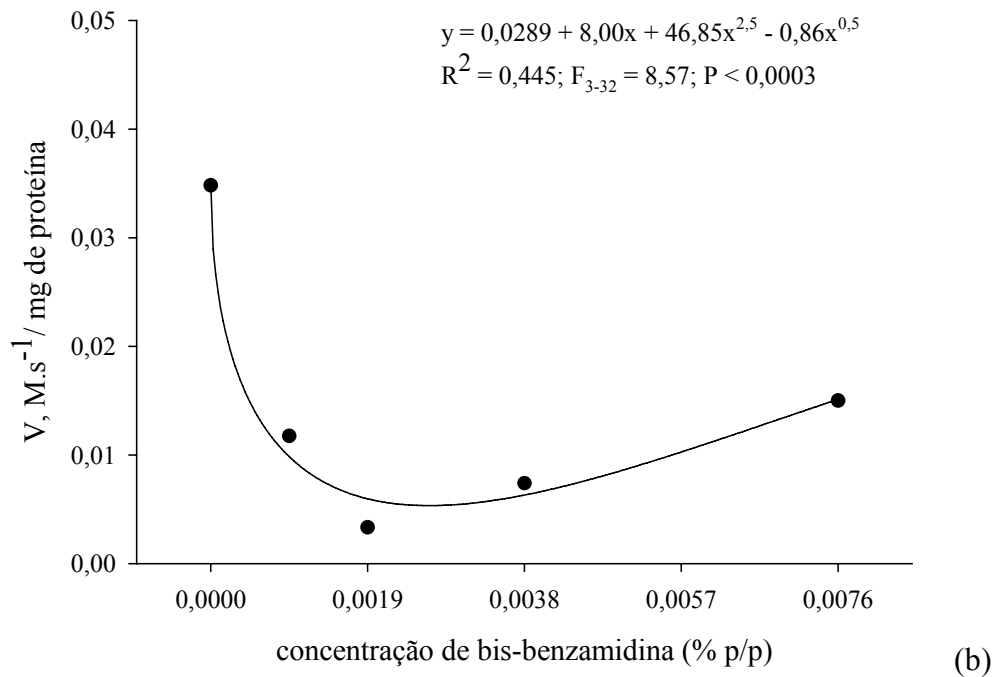
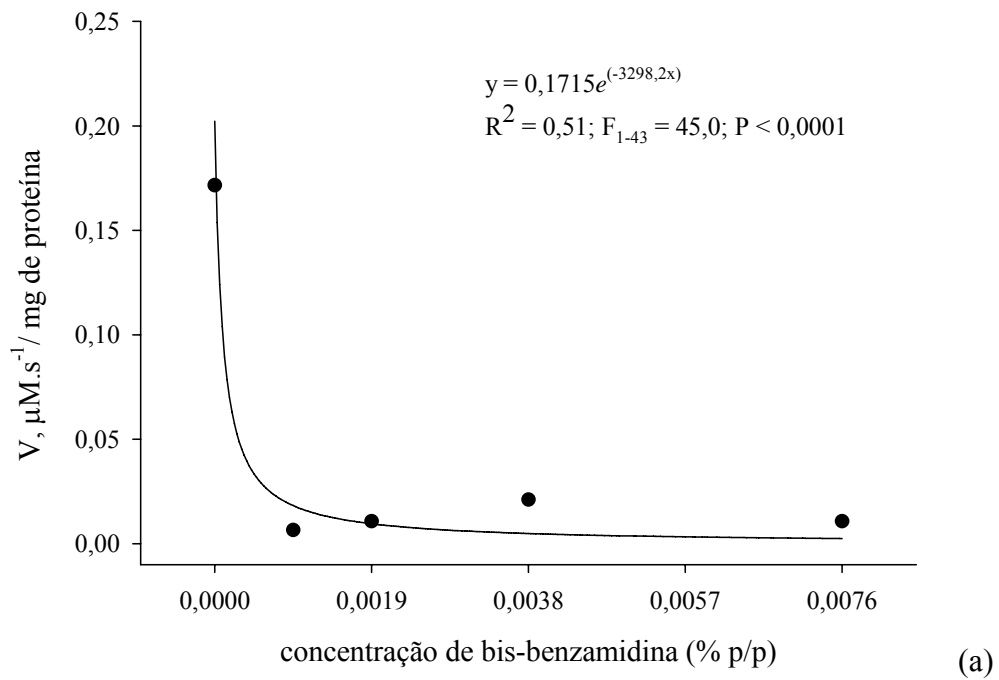


Figura 3. (a) Atividade específica da hidrólise do substrato L-BAPNA, e (b) L-TAME pelas enzimas tripsina-like no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil na dieta. (a) Pontos representam as médias de 8 a 9 repetições, (b) Pontos representam as médias de 5 a 8 repetições.

4. Referências bibliográficas

Ahn, J.-E., Lovingshimer, M.R., Salzman, R.A., Presnail, J.K., Lu, A.L., Koiwa, H., Zhu-Salzman, K., 2007. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* counteracts dietary protease inhibitors by modulating propeptides of major digestive enzymes. *Insect Molecular Biology* 16(3): 295–304.

Andrade, M.H.G., Silva, E., Mares-Guia, M., 1990. A plausible identification of secondary binding site in trypsin and trypsinogen. *Brazilian Journal Medical Biology Research* 23: 1223-1231.

Bown, D.P., Wilkinson, H.S., Jongsma, M.A., Gatehouse, J.A., 2004. Characterization of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in guts of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34: 305-320.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.

Brito, L.O., Lopes, A.R., Parra, J.P., Terra, W.R., Silva-Filho, M.C., 2001. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 128: 365-375.

Broadway, R.M., Duffey, S.S., 1986. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology* 32: 827-833.

Broadway, R.M., 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *Journal of Insect Physiology* 41(2): 107-116.

Chougule, N.P., Giri, A.P., Sainani, M.N., Gupta, V.S., 2005. Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35: 355-367.

Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 95: 271-278.

Ferreira, C.C.A., Oliveira, M.G.A., Oliveira, J.A., Almeida, F.T., Pires, C.V., Piovesan, N.D., Moreira, M.A., 2004. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à remoção dos primórdios florais. *Ciência e Agrotecnologia*, 28(2): 263-270.

Ferreira, C.C.A., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Guedes, R.N.C., Almeida, F.T., Silva, C.H.O., Moreira, M.A., 2005. Lack of seed lipoxigenases does not affect soybean defense against removal of reproductive tissue. *Bioscience Journal (UFU)* 21(1): 49-55.

Fortunato, F.S., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Silva, C.H.O., Guedes, R.N.C., Moreira, M.A.M., 2007. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). Journal of Pest Science. (Aceito para publicação)

Gorman, M.J., Paskewitz, S.M., 2001. Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. Insect Biochemistry and Molecular Biology 31: 257-262.

Haq, S.K., Atif, S.M., Khan, R.H., 2004. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. Archives of Biochemistry and Biophysics 431: 145-159.

Hoffmann-Campo, C.B., Oliveira, E.B., Moscardi, F., 1985. Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*). EMBRAPA, Serviço de produção de informação, Brasília. 23p.

Hummel, B.C.W., 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and trombin. Canadian Journal Biochemistry Physiology 37: 1393-1399.

Jandel Scientific, 1994. TableCurve 2D Windows v 2.0 user's manual. Jandel Scientific, San Rafael, Califórnia, 404p.

Jongsma, M.A., Bolter, C., 1997. The adaptation os insects to plant protease inhibitors. Journal of Insect Physiology 43(10): 885-895.

Mares-Guia, M., Shaw, E., 1965. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate side chain. Journal of Biological Chemistry 240: 1579-1585.

Mazumdar-Leighton, S., Broadway, R.M., 2001. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitors. Insect Biochemistry and Molecular Biology 31:645-657.

Monteiro, M.R.P., Costa, N.M.B., Oliveira, M.G.A., Pires, C.V., Moreira, M.A., 2004. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do inibidor de tripsina Kunitz e das isoenzimas lipoxigenases. Revista de Nutrição da PUCCAMP 17(2): 195-205.

Oliveira, M.G.A., Rogana, E., Rosa, J.C., Reinhold, B.B., Andrade, M.H., Greene, L.J. ; Mares-Guia, M., 1993. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site. Journal of Biological Chemistry 268(4): 26893-26903.

Oliveira, M.G.A., Simone, S.G.De., Xavier, L.P., Guedes, R.N.C., 2005 Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 140: 369-380.

Oppert, B., Morgan, T.D., Hartzer, K., Kramer, K.J., 2005. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium*

castaneum (Coleoptera: Tenebrionidae). Comparative Biochemistry and Physiology Part C 140 (1): 53-58.

Paulillo, L.C.M., Lopes, A.R., Cristofolletti, P.T., Parra, J.R.P., Terra, W.R., Silva-Filho, M.C., 2000. Changes in Midgut Endopeptidase Activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are Responsible for Adaptation to Soybean Proteinase Inhibitors. Journal of Economic Entomology 93(3): 892-896.

Pilon, A.M., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.C., 2006. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. Pesticide Biochemistry and Physiology 86(1): 23-29.

Silva, F.B., Oliveira, M.G.A., Batista, R.B, Pires, C.V., Xavier, L.P., Piovesan, N.D., Oliveira, J.A., Jose, I.C., Moreira, M.A., 2002. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). Arquivos do Instituto Biológico 69(1): 67-74.

Silva, F.B., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Pires, C.V., Oliveira, J.A., Pilon, A.M., Piovesan, N.D., Moreira, M.A., 2004. Função bioquímica da via das lipoxigenases em plantas de soja submetidas ao ataque de mosca branca (*Bemisia argentifolii*). Ciência e Agrotecnologia 28(2): 409-416.

Srinivasan, A., Giri, A.P., Gupta, V.S., 2006. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. Cellular and Molecular Biology Letters 11: 132-154.

SPSS Inc., 2000. SigmaPlot 2000 user's guide. Version 7.0 (Revised Edition). SPSS Inc., Chicago.

Talekar, N.S., Shelton, A.M., 1993. Biology, ecology and management of the diamondback moth. Annual Review of Entomology 38: 275-301.

Telang, M.A., Srinivasan, A., Patankar, A.G., Harsulkar, A.M., Joshi, V.V. Damle, A., Deshpande, V.V., Sainani, M.N., Ranjekar, P.K., Gupta, G.P., Birah, A., Rani, S., Kachole, M., Giri, A P., Gupta, V.S., 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. Phytochemistry 63: 643-652.

Terra, W.R., Ferreira, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comparative Biochemistry and Physiology Part B 109(1): 1-62.

Tomarelli, R.M., Charney, J., Harding, M.L. 1949. Journal Laboratory Clinical Medical 34: 428.

Ussuf, K.K., Laxmi, N.H., Mitra, R., 2001. Proteinase inhibitors: plant-derived genes os insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. Current Science 80(7): 847-853.

Volpicella, M., Cordewener, J., Jongsma, M.A., Gallerani, R., Ceci, L.R., Beekwilder, J., 2006. Identification and characterization of digestive serine proteases from inhibitor resistant *Helicoverpa zea* larval midgut. *Journal of Chromatography B* 833: 26-32.

Winterer, J., Bergelson, J., 2001. Diamondback moth compensatory consumption of protease inhibitor-transformed plants. *Molecular Ecology* 10: 1069-1074.

Xavier, L.P., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.C., Santos, A.V., Simone, S.G., 2005. Membrane-bound trypsin-like activity of midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Entomology* 102(2): 147-153.

Zhu-Salzman, K., Hoiwa, K., Salzman, R.A., Shade, R.E., Ahn, J.E., 2003. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine proteinase inhibitor. *Insect Molecular Biology* 12(2): 135-145.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho foi verificado que a adição do inibidor sintético de serino-proteases na dieta fornecida às lagartas de *A. gemmatalis* afetou negativamente todos os parâmetros avaliados da história de vida do inseto. Embora o inseto tenha respondido à ingestão de inibidor com o aumento do consumo da dieta, e tenha ocorrido um aumento nas digestibilidades total e protéica, não houve aumento nas atividades proteásica e triptica. Logo, não houve expressão ou síntese de outras proteases e dentre as possíveis explicações para o aumento do consumo alimentar poderia estar incluída a alimentação compensatória. No entanto, a baixa eficiência na conversão do alimento digerido e ingerido reforça os resultados de que o aumento no consumo de dieta não é suficiente para minimizar os efeitos deletérios da ingestão de inibidor. A justificativa mais provável para o aumento da digestibilidade pelas lagartas pode ter sido a ocorrência do fenômeno de ativação enzimática da tripsina. O inibidor se ligaria tanto ao sítio de especificidade da enzima quanto ao sítio secundário, o sítio de ativação da tripsina, possibilitando a formação de produto embora numa velocidade menor que na ausência do inibidor. Os resultados obtidos indicam que a utilização de berenil é uma estratégia promissora para o controle da lagarta da soja e possivelmente de outros insetos-praga que tenham a tripsina como principal enzima digestiva. Outros trabalhos fazem-se necessários para que o mapeamento da ligação desse inibidor no complexo enzima-substrato, possibilitando a síntese de peptídeos miméticos para a utilização direta no campo, no controle de insetos.

Anexos

Tabela 2A. Sumário das análises de regressão referentes aos parâmetros do consumo e assimilação do alimento e das características fenotípicas de *A. gemmatalis* em função da concentração do inibidor de proteases, berenil, na dieta.

Digestibilidade aproximada (%)	Equação	Parâmetros			F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
		a	b	c	Regressão	1	35,0309	35,0309	111,2270	<0,0001
	$y = a + bx^2$	97,67	28105,08	-	Resíduo	125	39,3687	0,3149		
					Total	126	74,3996			
		a	b	c	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Ingestão (mg)	$y = a + bx^2$	2823,93	85290490,42	-	Regressão	1	323547296,3802	323547296,3802	272,7701	<0,0001
					Resíduo	126	149455373,7478	1186153,7599		
					Total	127	473002670,1280	3724430,4734		
		a	b	c	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Fezes (mg)	$y = a + bx + cx^{1,5}$	54,51	22745,45	-278378,57	Regressão	2	17038,4015	8519,2008	35,6845	<0,0001
					Resíduo	126	29842,0840	238,7367		
					Total	127	46880,4855	369,1377		
		a	b	c	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Balanco ingestão - excreção (g)	$y = a + bx^2$	2,7532	85676,24	-	Regressão	1	326,4804	326,4804	275,0409	<0,0001
					Resíduo	126	149,5652	1,1870		
					Total	127	476,0456	3,7484		
		a	b	c	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Eficiência na conversão do alimento ingerido (%)	$y = (a.b)/(b + x)$	9,515	0,0030	-	Regressão	1	574,6349	574,6349	208,5466	<0,0001
					Resíduo	125	344,4283	2,7554		
					Total	126	919,0632	7,2942		
		a	b	c	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Eficiência na conversão do alimento digerido (%)	$y = (a.b)/(b + x)$	9,7322	0,0030	-	Regressão	1	603,7970	603,7970	204,5771	<0,0001
					Resíduo	125	368,9299	2,9514		
					Total	126	972,7270	7,7201		
		a	b	c	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Taxa de consumo relativa (mg/mg.dia)	$y = a + bx^2 + cx^{0,5}$	39,09	1203807,03	-606,29	Regressão	2	22937,9755	11468,9878	217,5125	<0,0001
					Resíduo	125	6590,9941	52,7280		
					Total	127	29528,9696	232,5116		
		a	b	c	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Taxa de crescimento relativa	$y = (a.b)/(b + x)$	3,7472	0,0008	-	Regressão	1	122,3079	122,3079	724,0199	<0,0001
					Resíduo	126	21,2851	0,1689		

(mg/mg.dia)					Total	127	143,5930	1,1307		
		a	b	c	F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Duração da fase larval (dias)	$y = a + bx^{0,5}$				Regressão	1	2642,5101	2642,5101		
		26,84	184,45	-	Resíduo	102	1177,4803	11,5439	228,9092	<0,0001
					Total	103	3819,9904	37,0873		
Duração do ciclo de vida (dias)	$y = a + bx + cx^2$				Regressão	1	2249,7312	1124,8606		
		30,44	4647,58	-393761,46	Resíduo	101	1497,1154	14,8229	75,8865	<0,0001
					Total	103	3746,8365	36,3771		
Peso das pupas (g)	$y = a + bx$				Regressão	1	122,3079	122,3079		
		0,204	-8,192	-	Resíduo	126	21,2851	0,1689	724,0199	<0,0001
					Total	127	143,5930	1,1307		
Peso dos adultos (g)	$y = a - bx^3$				Regressão	1	122,3079	122,3079		
		0,0252	-21802,27	-	Resíduo	126	21,2851	0,1689	724,0199	<0,0001
					Total	127	143,5930	1,1307		
Tamanho dos adultos (mm)	$y = a - bx^3$				Regressão	1	122,3079	122,3079		
		15,9489	-4336537,87	-	Resíduo	126	21,2851	0,1689	724,0199	<0,0001
					Total	127	143,5930	1,1307		
Comprimento da asa anterior direita (mm)	$y = a + bx + cx^2$				Regressão	1	122,3079	122,3079		
		19,03	-516,7	30277,02	Resíduo	126	21,2851	0,1689	724,0199	<0,0001
					Total	127	143,5930	1,1307		
Comprimento da asa posterior direita (mm)	$y = a + bx + cx^2$				Regressão	1	122,3079	122,3079		
		14,1371	-599,03	46436,66	Resíduo	126	21,2851	0,1689	724,0199	<0,0001
					Total	127	143,5930	1,1307		
Tempo médio de sobrevivência (dias)	$y = (a + bx)^{0,5}$				Regressão	1	161,3306	161,3306		
		328,4176	113634,6115	-	Resíduo	3	10,8694	3,6231	44,5281	<0,0069
					Total	4	172,2000	43,0500		

Tabela 2B. Sumário das análises de regressão referentes aos parâmetros do consumo, desenvolvimento larval, digestibilidade protéica e atividade enzimática de *A. gemmatalis* em função da concentração do inibidor de proteases, berenil, na dieta.

	Equação	Parâmetros					F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
		a	b	c	d	x ₀						
Consumo individual total (g)	$y = a/(1 + ((x - x_0)/b)^2)$						Regressão	2	337,5431	168,7716	67,945	<0,0001
		57,106	0,0061			0,0082	Resíduo	232	576,2716	2,4839		
							Total	234	913,8147	3,9052		
Duração da fase larval (dias)	$y = (a.b)/(b + x)$						F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
		26,2156	0,1257				Regressão	1	4224,3234	4224,3234	843,1124	<0,0001
							Resíduo	255	1277,6500	5,0104		
						Total	256	5501,9734	21,4921			
Digestibilidade protéica (%)	$y = a + (b.c)/(c + x)$						F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
		71,8238	19,0349	0,0004			Regressão	2	4587,0242	2293,5121	113,9762	<0,0001
							Resíduo	123	2475,0949	20,1227		
						Total	125	7062,1191	56,4970			
Ativ. proteásica específica total (Abs440nm/mg de proteína)	$y = (a.b)/(b + x)$						F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
		0,8423	0,0002				Regressão	1	3,2508	3,2508	49,3411	<0,0001
							Resíduo	40	2,6353	0,0659		
						Total	41	5,8861	0,1436			
Ativ. amidásica específica (V, μM ⁻¹ /mg de proteína)	$y = a.e^{(-bx)}$						F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
		0,1715	3298,2055				Regressão	1	0,1776	0,1776	45,0009	<0,0001
							Resíduo	43	0,1697	0,0039		
						Total	44	0,3474	0,0079			
Ativ. esterásica específica (V, M ⁻¹ /mg de proteína)	$y = a + bx + cx^{2,5} + dx^{0,5}$						F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
		0,0289	8,0062	46,8583	-0,8589		Regressão	3	0,0028	0,0009	8,5678	<0,0003
							Resíduo	32	0,0034	0,0001		
						Total	35	0,0062	0,0002			