

**GILSON PETRÔNIO DA PAIXÃO**

**EFEITO DE BERENIL, UM INIBIDOR DE PROTEASES DO TIPO BIS-BENZAMIDINA, NAS RESPOSTAS BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DE LAGARTA DA SOJA *Anticarsia gemmatalis***

**Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.**

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2010**

**GILSON PETRÔNIO DA PAIXÃO**

**EFEITO DE BERENIL, UM INIBIDOR DE PROTEASES DO TIPO BIS-BENZAMIDINA, NAS RESPOSTAS BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA E COMPORTAMENTAL DE LAGARTA DA SOJA *Anticarsia gemmatalis*.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 21 de outubro de 2010.

---

Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes  
(Co-orientador)

---

Prof. Joel Antônio de Oliveira  
(Co-orientador)

---

Prof. Tiago Rennó dos Mares Guia

---

Prof. Nilson Penha Silva

---

Prof<sup>a</sup>. Maria Goreti de Almeida Oliveira  
(Orientadora)

O espírito daqueles que temem a Deus será procurado,  
será abençoado quando Deus olhar para eles.  
Com efeito, sua esperança está posta naquele que os salva,  
E os olhos de Deus estão voltados para aqueles que o amam.  
Aquele que teme ao Senhor não tremerá;  
de nada terá medo, pois o próprio Senhor é sua esperança.  
Feliz a alma do que teme ao Senhor.  
Para quem olha ela, e quem é a sua força?  
Os olhos do Senhor estão voltados para aqueles que o temem;  
ele é um poderoso protetor, um sólido apoio,  
um abrigo contra o calor, uma tela contra o ardor do meio-dia,  
um sustentáculo contra os choques, um amparo contra a queda.  
Ele eleva a alma, ilumina os olhos;  
dá saúde, vida e bênção.  
Eclo 34, 14 a 20.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos derramadas durante todas as etapas do meu doutorado. Bênçãos estas, sem as quais não conseguiria celebrar qualquer vitória em minha vida;

À poderosa intercessão de Maria, mãe de Jesus e nossa, que a todo o momento cuidou do meu doutorado;

À Universidade Federal de Viçosa, à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização deste curso

À minha esposa linda, maravilhosa e muito especial Andréa, com quem sempre pude contar, nos momentos bons e nos momentos difíceis;

Aos meus filhos Samuel, Júlia e Marcela, que são e sempre serão estímulo para eu lutar e nunca desistir dos desafios da vida;

A todos os meus familiares, por terem sido sustento e apoio na conquista desta vitória, a conclusão do meu doutorado;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto de pesquisa;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, pelo ensino, pela disposição e pelas oportunidades;

À professora Maria Goreti Almeida de Oliveira, pela orientação do trabalho, pela atenção dispensada quando precisei, pela amizade, carinho e confiança;

Ao professor Raul Narciso Carvalho Guedes, pela colaboração, pela disposição e aconselhamento durante a execução deste trabalho;

Ao pesquisador doutor André Luiz Lourenção, pelos materiais experimentais fornecidos e pelas sugestões na execução dos trabalhos;

Aos doutores Anderson Martins Pilon e Camila Rocha, por todo o auxílio e sugestões na confecção da tese.

Ao professor Joel Antônio de Oliveira, pelas correções e sugestões ao projeto de tese;

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, com os quais tive uma agradável convivência;

Aos amigos do laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do BIOAGRO - Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da UFV, por toda a ajuda e apoio durante a execução dos meus experimentos;

Às amigas Lílian Fernandes, Patrícia Fontes e Zaira Bruna pelo companheirismo, carinho e auxílio na realização dos meus experimentos;

Aos amigos Elisa, Anderson e Jeferson do laboratório de Bioquímica Animal do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV;

Ao amigo Eduardo Monteiro, secretário da pós-graduação do departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela boa vontade em ajudar e disponibilidade sempre demonstradas.

## BIOGRAFIA

Gilson Petrônio da Paixão, filho de Vicente da Paixão Filho e Maria Souza da Paixão, nasceu em Viçosa, estado de Minas Gerais, no dia 23 de setembro de 1970. Em março de 1990, iniciou o curso de Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa – MG), graduando-se em janeiro de 1995. Em Março de 1995, ingressou-se no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Departamento Fitotecnia da UFRV, obtendo o título de *Magister Scientiae* em Fevereiro de 1998. Em Agosto de 2007, iniciou o doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da UFRV, defendendo tese em 21 de outubro de 2010.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1-INTRODUÇÃO GERAL .....	1
2-REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27
CAPÍTULO 1. Efeitos de berenil no comportamento, desenvolvimento e atividade enzimática de <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner (Lepidoptera: Noctuidae).....	42
Resumo .....	43
Abstract .....	45
1. Introdução .....	46
2. Material e métodos .....	48
2.1. Criação da lagarta da soja ( <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner) ..	48
2.2. Preparo da dieta artificial .....	49
2.3. Obtenção das mudas.....	51
2.4. Aplicação do inibidor nas plantas .....	51
2.5. Ataque da lagarta da soja .....	52
2.6. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio das lagartas .....	52
2.7. Determinação da concentração de proteína no extrato enzimático.....	53
2.8. Determinação da atividade proteásica do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> .....	53
2.9. Determinação da atividade amidásica tripsina- <i>like</i> do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> .....	53
2.10. Determinação da atividade esterásica de tripsina- <i>like</i> do	

intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> .....	54
2.11. Determinação da atividade cisteíno protease do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> .....	54
2.12. Obtenção do extrato foliar .....	55
2.13. Determinação da atividade de lipoxigenases .....	55
2.14. Determinação de inibidores de proteases .....	56
2.15. Estudo da biologia de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .....	57
2.16. Teste de preferência das lagartas por plantas com ou sem o inibidor de protease berenil .....	57
2.17. Teste de preferência de oviposição em plantas com ou sem o inibidor de protease berenil .....	59
3. Análises estatísticas.....	60
4. Resultados e discussão .....	60
5. Referências bibliográficas .....	78
CAPÍTULO 2. Avaliação dos parâmetros bioquímicos da resposta de <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner em diferentes cultivares de soja submetidas a tratamentos com o inibidor de serino protease berenil.....	85
Resumo .....	86
Abstract .....	88
1. Introdução .....	89
2. Material e métodos .....	92
2.1. Criação da lagarta da soja ( <i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner) ..	92
2.2. Preparo da dieta artificial .....	93
2.3. Obtenção das mudas.....	94
2.4. Aplicação do inibidor nas plantas .....	94
2.5. Ataque da lagarta da soja .....	95
2.6. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio das lagartas .....	96
2.7. Determinação da concentração de proteína .....	96
2.8. Determinação da atividade proteásica do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> .....	96

2.9. Determinação da atividade amidásica tripsina- <i>like</i> do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> .....	97
2.10. Determinação da atividade esterásica de tripsina- <i>like</i> do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> .....	97
2.11. Determinação da atividade cisteíno protease do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i> .....	98
2.12. Obtenção do extrato foliar .....	98
2.13. Determinação da atividade de lipoxigenases .....	98
2.14. Determinação de inibidores de proteases .....	99
3. Análises estatística .....	100
4. Resultados e discussão .....	100
5. Referências bibliográficas .....	114
CONCLUSÕES GERAIS .....	122
APÊNDICE.....	123

## LISTA DE FIGURAS

Página

### Revisão de literatura

1	Estádios de desenvolvimento de <i>A. gemmatalis</i> . A) ovos esféricos; B) lagartas de segundo ínstar; C) lagartas de quinto ínstar; D) pupas.....	5
2	Interações entre plantas e insetos.....	8
3	Representação esquemática dos compartimentos do intestino dos insetos.....	12
4	Representação de uma molécula de tripsina com moléculas de benzamidina, seu inibidor competitivo, devidamente posicionadas nos sítios ativos desta enzima.....	13
5	Estruturas da benzamidina (A) e do berenil (B).....	17
6	Rota da degradação do berenil por catálise ácida.....	18
7	Modelo proposto para a sinalização que regula a expressão de genes inibidores de proteases induzidas por fermento em folhas de tomate. PK = Proteína Quinase.....	22
8	Via bioquímica das lipoxigenases mostrando parte das reações em cascata a partir do ácido linolênico. FI: fator de isomerização.....	25

### Capítulo 1

1	Foto das gaiolas com as plantas de soja.....	52
2	Esquema da disposição da arena para o teste de preferência alimentar das lagartas.....	58
3	(A) Atividade específica de lipoxigenases e (B) Determinação dos níveis de inibidores de proteases em folhas de soja da variedade IAC-PL-1 antes e após a presença do inseto.....	62

4	Correlação entre os aumentos na expressão de enzimas lipoxigenases e de inibidores de proteases como mecanismo de defesa das plantas contra ataque de pragas e doenças.....	63
5	Atividade proteolítica do extrato do intestino de lagartas <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com plantas de soja IAC-PL-1 pulverizadas com inibidor de protease berenil nas concentrações de 0,0; 0,008; 0,010; 0,2; 0,60 e 1,0 % (p/v).....	65
6	(a) Atividade específica da hidrólise do substrato L-BApNA, e (b) L-TAME pelas enzimas tripsina- <i>like</i> no intestino médio de lagartas de <i>A. gemmatalis</i> em função da concentração de berenil pulverizado sobre plantas de soja da variedade IAC-PL-1.....	67
7	Atividade cisteíno protease do extrato do intestino de lagartas <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com plantas de soja IAC-PL-1 pulverizadas com inibidor de protease berenil nas concentrações de 0,0; 0,008; 0,010; 0,2; 0,60 e 1,0 % (p/v).....	69
8	Avaliação do ganho de peso de lagartas <i>A. gemmatalis</i> alimentadas com folhas de soja da variedade IAC-PL-1, pulverizadas com diferentes concentrações do inibidor de protease berenil. Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão linear com duas variáveis independentes (concentração de berenil e o tempo) obtendo-se as equações $y_{0,0\%}=0,19044x-0,3286$ ( $F_{1,3}=44,86$ ; $R^2=0,9573$ ; $p<0,0001$ ), ( $y_{0,008\%}=0,1189x-0,1716$ ( $F_{1,3}=104,24$ ; $R^2=0,9812$ ; $p=0,0095$ ) e $y_{0,01\%}=0,1092x-0,1829$ ( $F_{1,3}=149,72$ ; $R^2=0,9868$ ; $p=0,0001$ ).....	70
9	Curvas de sobrevivência estimadas pelo método não-paramétrico de Kaplan-Meier para os tempos de vida da lagarta da soja em função das concentrações de Berenil.....	72
10	Preferência alimentar de <i>Anticarsia gemmatalis</i> por plantas de soja IAC - PL -1 pulverizadas com o inibidor de protease berenil em diferentes concentrações.....	74
11	Avaliação da preferência de oviposição de mariposas de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em plantas de soja IAC-PL-1 pulverizadas com o inibidor de protease berenil em diferentes concentrações.....	76

Capítulo 2	
1	Foto das gaiolas com as plantas de soja..... 95
2	Histograma da atividade específica de enzimas lipoxigenases em folhas de soja das variedades IAC-24, IAC-18 e Foscarin-31 antes e após a presença do inseto..... 101
3	Determinação dos níveis de inibidores de proteases em folhas de soja das variedades IAC-24, IAC-18 e Foscarin-31 antes e depois da presença do inseto..... 102

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 1

- 1 Composição da dieta artificial utilizada no experimento com lagartas (g/100g de mistura)..... 54
- 2 Valores de probabilidade (P-valor) referentes ao teste *Logrank*, considerando-se a hipótese das curvas de sobrevivência estimadas serem iguais..... 77

### Capítulo 2

- 1 Composição da dieta artificial utilizada no experimento com lagartas..... 98
- 2 Valores médios  $\pm$  desvio-padrão para atividade proteolítica (Abs 440 nm/mg de proteína) do intestino médio de lagartas *Anticarsia gemmatalis* após ataque a plantas de três variedades de soja pulverizadas com diferentes concentrações do inibidor de protease berenil..... 110
- 3 Valores médios  $\pm$  desvio-padrão para atividade esterásica (V, Micromolar.s<sup>-1</sup>/mg de proteína) do intestino médio de lagartas *Anticarsia gemmatalis* após ataque a plantas de três variedades de soja pulverizadas com diferentes concentrações do inibidor de protease berenil..... 114
- 4 Valores médios  $\pm$  desvio-padrão para atividade amidásica (V, Micromolar.s<sup>-1</sup>/mg de proteína) do intestino médio de lagartas *Anticarsia gemmatalis* após ataque a plantas de três variedades de soja tratadas com diferentes concentrações do inibidor de protease berenil..... 116

## RESUMO

PAIXÃO, Gilson Petrônio da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro, 2010. **Efeito de berenil, um inibidor de proteases do tipo bis-benzamidina, nas respostas bioquímica, fisiológica e comportamental de lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis*.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-orientadores: Raul Narciso Carvalho Guedes, André Luiz Lourenção, Joel Antônio de Oliveira e Wellington Garcia Campos.

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, por ser considerada uma das principais pragas da cultura da soja, tem sido alvo de estudos visando a busca de alternativas para o seu controle. A utilização de inibidores de proteases (IPs) como alternativa para o controle de pragas tem sido amplamente estudada. Sabe-se que uma rota de defesa vegetal, talvez a mais conhecida, é denominada rota octadecanóide (ou via das lipoxigenases), a qual culmina com a produção do ácido jasmônico: um hormônio vegetal que ativa genes que expressam inibidores de proteases, tidos como agentes anti-metabólicos, pois levam os insetos a uma deficiência protéica. Os IPs atuam no intestino médio dos herbívoros, inibindo a ação das proteases sobre as proteínas provindas da alimentação, havendo, portanto, uma redução na disponibilidade de aminoácidos ao inseto, podendo resultar no atraso do crescimento e reprodução desses herbívoros e, conseqüentemente, na sua morte. Este trabalho teve por objetivos avaliar a capacidade da planta da soja de responder ao ataque de *A. gemmatalis* através da via das lipoxigenases e as respostas bioquímica, comportamental e fisiológica da lagarta da soja a concentrações crescentes do inibidor sintético de serino-proteases, berenil. Para tal, as lagartas foram alimentadas com plantas de soja da variedade IAC-PL-1, pulverizadas com berenil nas doses 0,0; 0,008; 0,01; 0,20; 0,60; e 1,0% (p/v) e com plantas de soja das variedades IAC-18, IAC-24 e FOSCARIN-31 contendo 0,0; 0,60; e 1,0% (p/v) de berenil. Nas quatro cultivares testadas, observou-se que após o ataque da lagarta da soja ocorreu um aumento no *pool* de lipoxigenases nas folhas, o que levou a uma alta produção de inibidores de protease. Nas lagartas que foram alimentadas com plantas da variedade IAC-PL-1, observou-se interferência de berenil na resposta comportamental desses insetos, que

tiveram preferência por plantas que não receberam pulverizações com o inibidor, o mesmo não sendo observado para as mariposas com relação à preferência para oviposição. Com relação ao desenvolvimento pós-embriônico, ocorreu uma redução significativa no ganho de peso. Foi observada também uma significativa redução na sobrevivência e no tempo de vida das larvas alimentadas com as maiores doses do inibidor. Além disso, houve inibição das atividades proteolítica e trípica do intestino das lagartas nas quatro cultivares de soja. 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.

## ABSTRACT

PAIXÃO, Gilson Petrônio da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2010. **Effect of berenil, a protease inhibitor bis-benzamidine, the answers biochemical, physiological and behavioral soybean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-advisers: Raul Narciso Carvalho Guedes, André Luiz Lourenção, Joel Antônio de Oliveira and Wellington Garcia Campos.

The caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, for being considered a pest of soybean, has been the target of studies aimed at finding alternatives to its control. The use of protease inhibitors (PIs) as an alternative for pest control has been widely studied. It is known that a plant defense route, perhaps the best known is called octadecanóide route (or lipoxygenase pathway), which culminates with the production of jasmonic acid: a plant hormone that activates genes expressing protease inhibitor, taken as anti-metabolic agents, since they bring the insects to a protein deficiency. IPs work in the midgut of herbivores, inhibiting the action of proteases on proteins originated from food, therefore there is a reduction in the availability of amino acids to the insect, which can result in delayed growth and reproduction of herbivores and hence in its death. This study aimed to evaluate the ability of the soybean plant to respond to the attack of *A. gemmatalis* through the lipoxygenase pathway and biochemical responses, behavioral and physiological soybean caterpillar to increasing concentrations of synthetic inhibitor of serine proteases, berenil. To this end, the larvae were fed with soybean variety IAC PL-1, treated with berenil doses 0.0, 0.008, 0.01, 0.20, 0.60, and 1.0% (w/v) and the soybean variety IAC-18, IAC-24 and Foscarin-31 containing 0.0, 0.60, and 1.0% (w/v) of berenil. In the four cultivars tested, it was observed that after the attack of soybean caterpillar was an increase in the pool of lipoxygenase in the leaves leading to a high production of protease inhibitors. In the caterpillars that were fed on plants of the variety IAC PAL-1, there was interference from berenil behavioral response of these insects, which had no preference for plants that received the inhibitor sprays, but these were not observed for moths in relation to oviposition

preference. Regarding the post-embryonic development, there was a significant reduction in weight gain. There was also a significant reduction in the survival and life span of larvae fed the highest doses of the inhibitor. Furthermore, there was inhibition of the proteolytic and tryptic activities of the gut of caterpillars in the four cultivars. The results indicate that the use of berenil is a promising strategy for control of soybean caterpillar and possibly other insect pests that have the main digestive enzyme trypsin.

## 1 - INTRODUÇÃO GERAL

No âmbito do agronegócio mundial, a produção de soja está entre as atividades econômicas que, nas últimas décadas, apresentou crescimento dos mais expressivos. Este fato pode ser atribuído a diversos fatores, tais como: estruturação de um grande mercado internacional relacionado com o comércio de produtos do complexo soja; consolidação da oleaginosa como importante fonte de proteína vegetal, especialmente para atender demandas crescentes dos setores ligados à produção de produtos de origem animal, e maior desenvolvimento e oferta de tecnologias, que viabilizaram a expansão da exploração sojícola para diversas regiões do mundo (Dall’Agnol *et al.*, 2010).

No Brasil, a soja é cultivada praticamente em todo território nacional, se destacando como fonte de proteína e de óleo vegetal, para consumo interno ou como gerador de divisas, através das exportações. Os países maiores produtores de soja são também os maiores exportadores, sendo o principal os Estados Unidos, seguido pelo Brasil e Argentina. No Brasil, o levantamento da safra prevista para 2010 realizado pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) prevê que a área cultivada com soja será de 23,06 milhões hectares com uma produção de 64,5 milhões de toneladas e uma produtividade de 2.629 kg/ha (CONAB, 2010). Estima-se que essa produtividade representará cerca de 30 % da produção global de soja (IBGE, 2010).

A soja apresenta potencial para aumentar a sua produtividade, mas seus cultivos são afetados por diversos fatores dentre os quais se destacam os insetos desfolhadores, que podem reduzir a produção e a qualidade dos grãos ou sementes dessa cultura. Entre os insetos que trazem conseqüências econômicas mais significativas para a soja, destaca-se a *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta da soja, uma das principais pragas desfolhadoras da cultura no Hemisfério Ocidental, que causa perdas consideráveis na produção (Macrae *et al.*, 2005; Praça *et al.*, 2006; Dumas *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2009). Uma maior incidência desse inseto ocorre entre o período vegetativo e a floração, o que requer atenção e controle rápido para não causar prejuízos econômicos (Sávio & Pinotti, 2008). Os maiores danos são observados na fase larval, quando as lagartas inicialmente raspam as folhas da soja, causando prejuízos consideráveis à medida que

crecem. Alimentam-se tanto do limbo como das nervuras, podendo ocasionar 100% do desfolhamento da planta até atingirem seu desenvolvimento máximo, tornando-se pupa. Até completar o seu desenvolvimento larval, cada lagarta pode consumir em média 90 cm<sup>2</sup> de folhas, ou seja, o equivalente a 2,1 vezes a sua própria massa, a cada 24h (Andrade *et al.*, 2004).

O controle dos insetos-praga tem sido realizado, essencialmente, mediante a aplicação de produtos químicos, como os piretróides e carbamatos (SOSBAI, 2005). Considerando os problemas relacionados à ação desses inseticidas sobre organismos não-alvo, a contaminação de águas e resíduos em alimentos (Kamel *et al.*, 2007), tornam-se necessários estudos que propiciem métodos alternativos de controle, os quais podem ser aplicados no manejo integrado de pragas (MIP) (Xavier *et al.*, 2005; Pilon *et al.*, 2006; Mendonça, 2008; Pilon *et al.*, 2009; Reis, 2009; Scott *et al.*, 2010). A presença de metabólitos secundários com a função de defesa em plantas é um fato muito conhecido na natureza (Silva *et al.*, 2004; Pilon *et al.*, 2006; Marinho *et al.*, 2008; Pilon *et al.*, 2009; Velloso *et al.*, 2009; Duke, 2010). Dessa forma, é interessante realizar estudos com essas moléculas de defesa presentes nas plantas, pois posteriormente poderiam ser utilizadas no controle de pragas e doenças que afetam a produção agrícola.

Sabe-se que uma rota de defesa de plantas conhecida como via das lipoxigenases culmina com a produção do ácido jasmônico, um hormônio vegetal que ativa genes que expressam inibidores de proteases, tidos como agentes anti-metabólicos, pois levam os insetos a uma deficiência protéica através da diminuição da atividade das enzimas digestivas no intestino médio (Pilon *et al.*, 2006; Soares & Machado, 2007; Wasternack, 2007; Marinho *et al.*, 2008; Schaller, 2008; Pilon *et al.*, 2009).

Os inibidores de protease (IPs) representam uma estratégia de controle de insetos e, por isso, a identificação e caracterização desses inibidores são etapas muito importantes para que novas formas de controle de pragas sejam desenvolvidas (Pilon *et al.*, 2006; Srinivasan *et al.*, 2006; Mendonça, 2008; Pilon *et al.*, 2009; Chevreuil *et al.*, 2009; Reis, 2009; Rossi *et al.*, 2010). O papel fisiológico dos IPs tem sido claramente estabelecido e têm-se proposto que eles integram o sistema de defesa natural das plantas contra o ataque de insetos. Ao serem ingeridos, os IPs inibem a atividade das enzimas

proteolíticas no intestino médio do inseto, induzindo à hiperprodução das enzimas digestivas, o que resulta no comprometimento do desenvolvimento do inseto, pois grande parte dos aminoácidos essenciais deixa de ser utilizada na síntese protéica para ser gasta na produção de enzimas digestivas (Oliveira *et al.*, 2005; Pilon *et al.*, 2006; Marinho *et al.*, 2008; Ahmad *et al.*, 2008; Lingaraju & Gowda, 2008; Konarev *et al.*, 2008; Wititsuwannakul *et al.*, 2008; Pilon *et al.*, 2009; Rossi *et al.*, 2010).

A maioria dos Lepidópteros possui as serinoproteinases como as principais enzimas digestivas, particularmente tripsinas (Haq *et al.*; 2004 Oliveira *et al.*, 2005; Terra & Ferreira, 1994; Terra *et al.*, 1996). As enzimas do tipo tripsina clivam cadeias protéicas, preferencialmente, na região próxima a aminoácidos básicos como lisina ou arginina. Essas enzimas foram caracterizadas em diversas ordens de insetos de interesse econômico como Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera e Thysanura (Terra & Ferreira, 1994; Oliveira *et al.*, 2005; Xavier *et al.*, 2005; Reis, 2009).

Neste contexto, este trabalho visa realizar estudos investigativos dos efeitos bioquímicos, fisiológicos e comportamentais em *Anticarsia gemmatalis*, quando alimentadas com folhas de soja pulverizadas com o inibidor de proteases berenil.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)

A *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) mais conhecida como lagarta da soja, é um inseto da ordem Lepidoptera, nativa de áreas tropicais e subtropicais das Américas, descrita pela primeira vez na Flórida em 1903 (Bárbara, 2010). No Brasil é encontrada em todos os locais de produção de soja representando um risco à produção e à qualidade dos cultivos brasileiros (Macrae *et al.*, 2005; Praça *et al.*, 2006; Savio & Pinotti, 2008). Por se tratar de um inseto desfolhador, a lagarta da soja começa a se alimentar da epiderme inferior e do mesófilo de folhas jovens e a partir do segundo ínstar já é capaz de se alimentar da folha inteira chegando a promover a completa desfolhação da planta. Quando a folhagem é removida, esta passa a atacar outras partes da planta; e o desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com conseqüente redução da produção de grãos. A soja é capaz de suportar uma desfolha de até 30% antes da floração e de até 15% na fase entre a floração e o desenvolvimento das vagens (Gallo *et al.*, 2002). O ciclo de vida da lagarta da soja se completa em cerca de quatro semanas durante o verão, tendo sua duração aumentada no outono.

Porém, em ataques severos, os danos são geralmente elevados, pois as lagartas chegam a desfolhar completamente a planta. Apesar de ser considerada primariamente uma praga de leguminosas (Ford *et al.*, 1975), a lagarta da soja pode causar prejuízos em outras culturas como alfafa, amendoim, arroz, ervilha, feijão, feijão-vagem e trigo, atacando durante a fase vegetativa e, em alguns casos, até no período da floração (Fugi *et al.*, 2005; Batista *et al.*, 2005).

Dependendo das condições ambientais, a lagarta da soja pode apresentar um ciclo biológico de aproximadamente 30 dias (Gallo *et al.*, 2002). Os ovos (Figura 1A) esféricos desse inseto medem aproximadamente 0,5 mm de diâmetro e apresentam coloração branca esverdeada e tendem a escurecer, devido ao seu desenvolvimento, até a coloração marrom avermelhada (Bárbara, 2010). O seu período de incubação é geralmente de três a cinco dias

(Schmidt *et al.*, 2001). A oviposição de *A. gemmatalis* é realizada durante a noite de forma agrupada ou isolada, na face inferior das folhas, nas hastes, pecíolos e caules (Greene *et al.*, 1973; Gallo *et al.*, 2002).

As lagartas recém eclodidas apresentam coloração verde, variando do verde claro ao escuro, com cinco estrias brancas longitudinais sobre o dorso (Gallo *et al.*, 2002; Praça *et al.*, 2006). A temperatura e as condições climáticas podem exercer influência sobre o número de ínstaes, assim, o período larval de *A. gemmatalis* apresenta, normalmente, de cinco a seis ínstaes (Gazzoni & Yoriniori, 1995). Essas lagartas, nos ínstaes iniciais (Figura 1B), comportam-se como a lagarta mede-palmo (Gallo *et al.*, 2002), no entanto em ínstaes mais avançados (Figura 1C) são muito ativas e dotadas de grande agilidade.

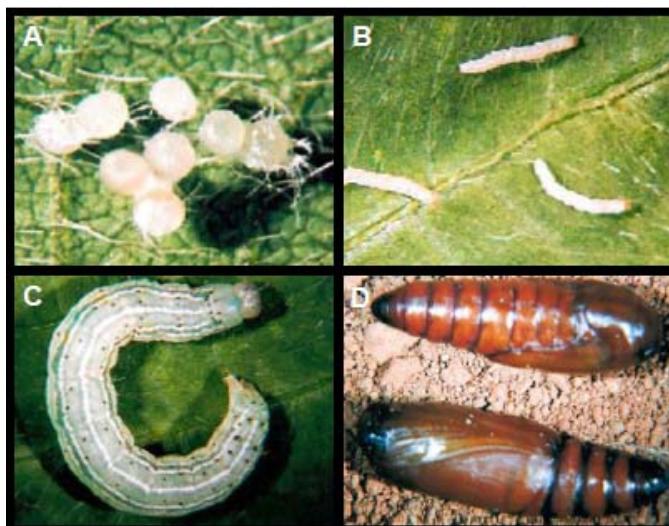


Figura 1. - Estádios de desenvolvimento da *A. gemmatalis*. A) ovos esféricos; B) lagartas de segundo ínstar; C) lagartas de quinto ínstar; D) pupas (Fonte: Praça *et al.*, 2006).

A fase de pré-pupa dura em torno de dois dias (Praça *et al.*, 2006). Nesta fase, a lagarta para de se alimentar, fica encolhida com aspecto umedecido e coloração rósea no dorso. Nessa fase, as lagartas são encontradas formando um casulo e unindo partículas de fezes por uma espécie de teia (Praça *et al.*, 2006). Em seguida, inicia-se a fase de pupa (Figura 1D), que ocorre a pouca profundidade do solo (Costilla, 1988). Inicialmente, a pupa apresenta coloração verde-clara e em seguida torna-se marrom avermelhada e brilhante. Perto da emergência do adulto, a pupa adquire uma coloração quase

preta e pode medir em torno de 17 a 20 mm. A duração do período pupal é inversamente proporcional à temperatura, isto é, quanto maior a temperatura, menor será a quantidade de dias dessa fase (Reid, 1975; Silva, 1981). De acordo com Gazzoni & Yoriniori (1995), a fase de pupa pode durar em torno de sete a nove dias.

O adulto é uma mariposa de coloração variada e hábito noturno. Nessa fase, o inseto geralmente possui uma coloração pardo-acinzentada e mede em torno de 40 mm (Schmidt *et al.*, 2001). De acordo com Gallo *et al.* (2002), essas mariposas pousam de asas abertas e possuem uma listra transversal escura, que une as pontas das asas. Durante o dia, essas mariposas são encontradas em locais sombreados, porém todo o processo reprodutivo ocorre durante o período noturno (Schmidt *et al.*, 2001; Gallo *et al.*, 2002). Em condições de dieta artificial, Moscardi *et al.* (1981a) obtiveram 11,2 dias de longevidade dos adultos a 32,2 °C e 24,8 dias de longevidade dos adultos a 21,1 °C. Em condições de dieta natural (folhas de soja), a longevidade média das fêmeas acasaladas variou de 14,1 dias, quando alimentadas com folhas de plantas senescentes, até 17,5 dias, quando alimentadas com plantas em florescimento (Moscardi *et al.*, 1981b).

## **2.2. Interação planta-inseto**

Plantas e insetos coexistem no ambiente terrestre numa interação complexa e dinâmica (Erich & Raven, 1964; Kant & Baldwin, 2007). As plantas dependem dos insetos para dispersão de sementes, reprodução (Fleming *et al.*, 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.

O processo de herbivoria foliar representa um dos processos funcionais mais importantes em ecossistemas vegetais (Dirzo & Dominguez, 1995; Coley & Barone, 1996; Mello, 2007). O herbívoro interfere no desempenho da planta através da redução da área de captura de luz, remoção de nutrientes e

aumento da incidência de patógenos, ou até mesmo provocando a sua morte (Dirzo, 1984; Dirzo & Dominguez, 1995; Eutrópio & Silva, 2009).

Nos ecossistemas naturais a grande variedade de estratégias pelas quais os insetos herbívoros obtêm o alimento e o alto grau de especialização que essa relação pode atingir, são aspectos muito importantes segundo Schoonhoven *et al.* (2005). Os insetos herbívoros podem explorar suas plantas hospedeiras de diversas formas; por exemplo, alguns se alimentam externamente, cortando e mastigando os tecidos, outros retiram o alimento por sucção em células individuais ou no sistema vascular das plantas, já outras espécies abrigam-se dentro de estruturas das plantas e consomem tecidos internos, como por exemplo, os minadores e galhadores (Sibio, 2008).

Diversos mecanismos de defesa e adaptações são freqüentemente encontrados nos seres vivos. Estes mecanismos químicos, físicos ou comportamentais atuam diminuindo a chance de encontro com um inimigo natural, ou aumentando a probabilidade de sobrevivência a este encontro (Begon *et al.*, 2007).

As plantas apresentam diferentes mecanismos de defesa e com base nestes mecanismos os insetos também desenvolveram estratégias de defesa que permitem aos mesmos metabolizar e utilizar as substâncias tóxicas para se protegerem de inimigos naturais (Figura 2) (Opitz & Müller, 2009). Dois processos diferentes estão envolvidos na indução das defesas de plantas a herbívoros e patógenos. Um processo envolve o reconhecimento gene-a-gene. Genes expressos de resistência de plantas reconhecem compostos liberados por insetos ou patógenos e ativam respostas de defesa e resistência específicas para o organismo invasor. O segundo processo envolve o reconhecimento de dano nos tecidos da planta provocado pelo agressor.



capazes de desintoxicar ou seqüestrar as toxinas vegetais (Gullan & Cranston, 2007; Zhu-Salzman *et al.*, 2008).

A arquitetura da planta (barreiras físicas) e sua composição química (metabólitos secundários) são grandes obstáculos à herbivoria, mas não é a única forma de defesa que uma planta pode utilizar. O ataque herbívoro e injúria mecânica podem induzir diversas espécies de plantas a emitir compostos orgânicos voláteis (COV) que sinalizariam esse estado de ataque. Já foram identificados mais de 1000 tipos de compostos orgânicos voláteis lançados das flores das plantas, das partes vegetativas ou raízes. Esta alta forma dinâmica de imunidade é iniciada pelo reconhecimento da secreção oral do inseto e sinais de células de plantas injuriadas (Howe & Jander, 2008; Zhu-Salzman & Zeng, 2008), sendo os voláteis “green leaf” os compostos mais amplamente estudados (Schaller, 2008). Este tipo de defesa age sobre os herbívoros por promover a efetividade do terceiro nível trófico, ou seja, dos seus inimigos naturais. A ação desses mecanismos sobre os inimigos naturais pode se dar através da liberação de compostos voláteis, que os atraem para as plantas (Matos *et al.*, 2006). Esses compostos voláteis emitidos podem também afetar diretamente a fisiologia e o comportamento do herbívoro devido ao seu potencial tóxico, repelente ou propriedades deterrentes (Schaller, 2008).

Os compostos voláteis podem afetar outros organismos como simbioses fixadores de nitrogênio, herbívoros, polinizadores, plantas e plantas-parasitas. Esta sinalização ocorre também entre plantas parasitadas e plantas saudáveis, induzindo estas últimas a desencadarem seus sistemas de defesa, antes mesmo de serem atacadas (*priming*) (Frost *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2008). Quando brocas de besouros ou lagartas começam a comer as folhas, estas plantas passam a emitir uma mistura precisa de compostos orgânicos voláteis que atraem insetos carnívoros para se alimentarem dos besouros e lagartas. Mudando-se a espécie da lagarta, a planta altera a composição da fragrância, atraindo agora o entomófago específico da nova lagarta (Menezes, 2009).

Portanto, a interação inseto-planta pode ser considerada uma relação contínua entre consumidor e organismo consumido, em que a evolução de um depende da evolução do outro, envolvendo duas espécies co-adaptadas em

uma corrida permanente pela sobrevivência (Maffei *et al.*, 2007; Begon *et al.*, 2007).

### 2.3. Enzimas digestivas de insetos

As enzimas digestivas dos insetos são conhecidas como hidrolases e classificadas de acordo com o substrato que degradam. As proteases digestivas catalisam a quebra de proteínas ingeridas através do processo de hidrólise, garantindo assim o melhor aproveitamento e a absorção dessas macromoléculas na forma de peptídeos e aminoácidos, que serão destinados para muitos outros eventos fisiológicos. Essas enzimas são amplamente distribuídas em quase todas as plantas, animais e microorganismos (Valueva & Mosolov, 2004; Haq *et al.*, 2004; Mosolov & Valueva, 2005; Christeller, 2005; Joanitti *et al.*, 2006). Nos insetos são encontradas abundantemente na região do intestino médio e estão subdivididas em endopeptidases, que clivam ligações peptídicas internas e exopeptidases que removem aminoácidos da região C-terminal ou N-terminal (Jongsma & Bolter, 1997; Fan & Wu, 2005). As endopeptidases são conhecidas também por proteases.

Proteases contabilizam cerca de 2% do genoma humano, e estão envolvidas em várias funções biológicas, participando de numerosos processos bioquímicos e fisiológicos, tais como digestão de alimentos, coagulação sangüínea e fibrinólise, ativação de proenzimas, liberação de peptídeos fisiologicamente ativos, controle do tamanho de proteínas, resposta imune e apoptose (Leung-Toung *et al.*, 2002; Chou & Cai, 2006).

Quase um terço de todas as proteases é classificado como serino proteases (E.C. 3.4.21), assim nomeadas por apresentarem o resíduo nucleofílico serina no sítio ativo. Essa classe de proteases foi originalmente distinguida pela presença do sistema “relê de cargas” ou “tríade catalítica” Asp-His-Ser. Mais recentemente, serino-proteases com outras tríades e díades catalíticas foram descobertas, incluindo Ser-His-Glu, Ser-Lys/His, His-Ser-His (Hendstrom, 2002).

Os principais grupos de enzimas digestivas dos insetos são constituídos pelas lipases, carboidrases e proteases, sendo este último grupo bem mais caracterizado. Uma determinada espécie de inseto muitas vezes possui

múltiplas proteases digestivas em seu trato intestinal, pertencentes a diferentes ou ao mesmo grupo mecanístico, embora normalmente utilize um tipo principal no seu papel digestivo (Zhu-Salzman *et al.*, 2008; Ahn & Zhu-Salzman, 2009). 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 e estão envolvidas em vários processos fisiológicos incluindo ativação de proteínas, respostas imune, produção de peptídios bioativos além da digestão etc. (Terra & Ferreira, 2000; Kanost & Clarke, 2005).

As serino-proteases são as enzimas mais bem estudadas, tanto em eucariotos quanto em procariotos e em vírus. Seus representantes mais conhecidos são a tripsina e a quimotripsina (Page & Di Cera, 2008).

Em insetos, as serino-proteases participam de processos fisiológicos que incluem a digestão e a resposta à defesa de plantas, bem como a resposta imune dos insetos; a sinalização e amplificação de sinal; a ativação de cascatas; a indução de peptídeos antimicrobianos; a atividade antimicrobiana e a ativação de mecanismos específicos de melanização e coagulação (Levy *et al.*, 2004; Herrero *et al.*, 2005; Page & Di Cera, 2008).

O intestino médio das larvas de lepidópteros hospeda um complexo ambiente proteolítico de várias especificidades com atividades do tipo das quimotripsina, tripsina, elastase, catepsina-B, aminopeptidases e carboxipeptidases, dentre outras, todas responsáveis pela digestão protéica. Serino-proteases são conhecidas por dominar o ambiente intestinal das larvas e contribuem com cerca de 95% da atividade proteolítica total (Srinivasan *et al.*, 2006). Além da complexidade de múltiplas especificidades das proteases, usualmente existe uma gama de isoformas diferentes. Essa multiplicidade de isoformas parece desnecessária, especialmente quando umas poucas delas, por exemplo, a tripsina, contribuem significativamente para a digestão.

A maioria das moléculas de alimento a serem digeridas são polímeros e, neste caso, proteínas. Estas são digeridas em três etapas. A digestão inicial ou primária, a qual freqüentemente ocorre no interior da membrana peritrófica (Figura 3), consiste da dispersão e redução do tamanho dos polipeptídeos. Esta etapa da digestão é realizada por endopeptidases, resultando em oligopeptídeos. Para a digestão das proteínas de diversas fontes de alimento são necessárias endopeptidases de diferentes especialidades, sendo que em

insetos, endopeptidases das classes serina, cisteína e aspartil proteases já foram descritas como envolvidas no processo digestivo. Durante a digestão intermediária, a qual freqüentemente ocorre no espaço ectoperitrófico (Figura 3), estas moléculas são novamente reduzidas, agora a dímeros, os quais serão reduzidos a monômeros na digestão final, que ocorre na superfície das células do intestino médio.

A digestão intermediária de proteínas ocorre pela atividade de amino e carboxipeptidases, enquanto a digestão final ocorre por ação de dipeptidases.

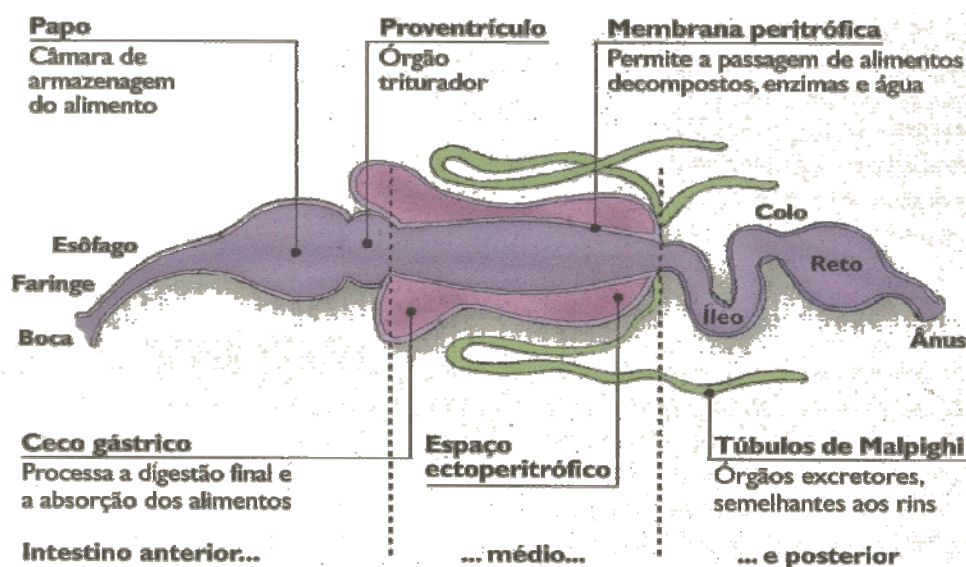


Figura 3 - Representação esquemática dos compartimentos do intestino dos insetos (Fonte: Terra *et al.*, 2000).

Dentre as endopeptidases envolvidas na digestão em insetos, as enzimas da classe das serino-endopeptidases são as enzimas que ocorrem no intestino médio de quase todas as ordens de insetos com exceção dos Hemiptera e de alguns grupos da série Cucujiformia, como os *Curculionidae* (Coleoptera) (Terra & Ferreira, 1996b). Entretanto, alguns Hemiptera apresentam serinoendopeptidases nas glândulas salivares.

As enzimas atravessam a membrana peritrófica e chegam ao espaço ectoperitrófico acompanhando os alimentos à medida que são fracionados. Depois, voltam para o interior da membrana peritrófica, na porção inicial do

intestino médio. A água passa pelo espaço ectoperitrófico até chegar aos cecos, nos quais é absorvida (Figura 3) (Terra *et al.*, 2000).

A tripsina (Figura 4) é sintetizada nas células do intestino médio na sua forma ativa, mas está associada com as membranas das vesículas pequenas. Estas vesículas, então, migram para o ápice celular e os precursores de tripsina são processados a uma forma solúvel antes de serem secretadas. Parece que os insetos controlam a atividade de suas proteases digestivas não usando formas inativas ou zimógenos, mas através da ligação das proteases a membranas, onde permanecem até serem liberadas no lúmen do intestino médio (Terra e Ferreira, 1994).

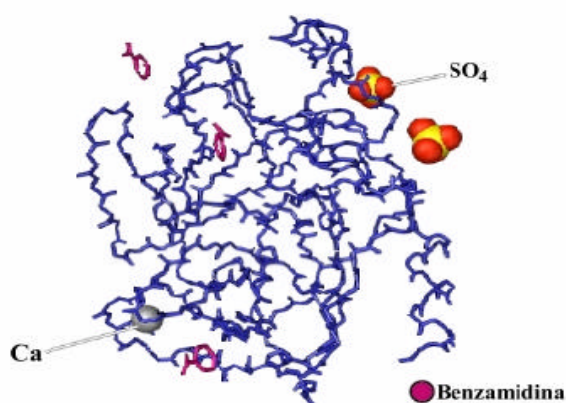


Figura 4 - Representação de uma molécula de tripsina com moléculas de benzamidina, seu inibidor competitivo, devidamente posicionadas nos sítios ativos desta enzima (Lehninger & Cox, 2000).

Enzimas tripsina-*like* do intestino médio de insetos têm sido encontradas, estudadas e caracterizadas em várias espécies de lepidóptera: *Anticarsia gemmatalis* (Oliveira *et al.*, 2005; Xavier *et al.*, 2005; Reis, 2009), *Alabama argillacea* (Vidal *et al.*, 2005), *Anagasta kuehniella* (Ramos *et al.*, 2009), *Plodia interpunctella* (Amorin *et al.*, 2008), *Spodoptera litura* (Bhattacharyya *et al.*, 2007), *Mamestra brassicae* (Chougule *et al.*, 2008). Entretanto, tripsinas com maior massa molecular também são encontradas, como apresentado por Wagner *et al.* (2002) em estudos com proteases tripsina-*like* de *Melolontha melolontha* (Coleoptera) com massas moleculares de 56 e 63 kDa e por Ahmad *et al.* (1980) em estudos com tripsinas com massa de 53 kDa de *Spodoptera litura* (Lepidoptera).

## 2.4. Inibidores de protease

A proteólise é um processo chave em todos os organismos vivos, sendo dessa forma extremamente controlado. Por esta razão, não surpreende o extensivo estudo de uma inúmera quantidade de inibidores de proteases, com intuito de elucidar suas propriedades estruturais e funcionais (Pilon *et al.*, 2006; Amorin *et al.*, 2008; Marinho *et al.*, 2008; Pilon *et al.*, 2009; Sumikawa *et al.*, 2010).

As plantas sintetizam proteínas de defesa que interrompem a aquisição de nutrientes e outros aspectos da fisiologia digestiva do inseto. Inibidores de protease (PIs) que prejudicam a atividade de proteases digestivas são talvez o melhor exemplo desse tipo de defesa pós-ingestiva. Pelo fato dos PIs não serem degradados, sua capacidade para diminuir o crescimento do inseto é dependente de seu acúmulo em altas concentrações no interior do lúmen do intestino (Chen *et al.*, 2007). Frequentemente estão presentes nas sementes e induzidos em certos tecidos da planta por herbivoria (Koiwa *et al.*, 1997; Ryan, 2000; Bruinsma *et al.*, 2007).

Os inibidores de serino proteases são o tipo mais abundante e amplamente distribuído em animais, microorganismos e plantas, além de serem os mais estudados (Gomes *et al.*, 2005). Nas plantas, são encontrados quase todos os tipos de inibidores de enzimas proteolíticas (Fan & Wu, 2005; Gatehouse & Gatehouse, 2010).

O provável papel dos inibidores de proteases na defesa vegetal foi investigado já em 1947, quando Mickel e Standish observaram que as larvas de certos insetos não eram capazes de se desenvolverem normalmente sobre produtos de soja (Migliolo *et al.*, 2010). Os IPs são usados para aumentar a resistência das plantas a insetos pragas, devido a sua abundância, estabilidade e alta especificidade a uma classe particular das enzimas digestivas de insetos (Abdeen *et al.*, 2005). Os inibidores têm como características o fato de serem extremamente resistentes à proteólise e permanecerem ativos em condições diversas de pH intestinal. Já foram identificados inibidores contra praticamente todas as classes de proteases descritas (Jongsma & Boulter, 1997).

Os inibidores de proteases são proteínas relativamente pequenas (ou domínios de proteínas, no caso de inibidores multidomínios) de 29 a 190

resíduos de aminoácidos e podem ser agrupados em pelo menos 16 famílias diferentes baseando-se na similaridade de sequência, similaridade topológica e mecanismo de ligação à enzima. A especificidade é uma característica marcante no estudo das interações entre enzima e inibidor. Ela é determinada pela natureza das interações envolvidas e pela estrutura nativa do inibidor e da enzima (Richardson, 1991).

No caso de inibidores de proteases, seu mecanismo de ação ocorre por inibição competitiva. Atuam bloqueando a ligação do substrato à enzima através da ligação de um segmento peptídico diretamente no sítio catalítico, de maneira semelhante ao substrato ou ao produto. A seletividade da inibição normalmente ocorre através da utilização de sítios de reconhecimento do substrato pela enzima. O complexo enzima-inibidor formado é termodinamicamente e cineticamente muito estável, apresentando constante de dissociação muito baixa ( $10^{-7}$  a  $10^{-14}$  M), de maneira que a inibição estequiométrica da enzima é alcançada (Gatehouse & Gatehouse, 2010). Existem relatos sobre inibidores de serino proteases que também são ativos contra enzimas de outras classes, como por exemplo, inibidores de tripsina que também inibem papaína (uma cisteína protease) (Souza *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007; Macedo *et al.* 2004), e também aqueles que apresentam uma atividade inibitória sobre  $\alpha$ -amilase (Koiwa *et al.*, 1997, Belitz & Grosch, 1997).

Os níveis mais altos de IP's foram encontrados em folhas jovens de plantas (Haq *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2005) ou em folhas de plantas jovens maduras (Broadway & 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 produzidas que se acumulam distante ou no local da injúria em resposta ao estresse sofrido pela planta, 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 horas após a injúria, os níveis de *mRNA* 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 12h. Após a tradução do *mRNA*, os inibidores de proteases são acumulados no vacúolo central das células vegetais, persistindo por até 1 semana (Karban e Baldwin, 1997).

A família de inibidores Kunitz inclui o inibidor de tripsina da soja (SBTI), que é o mais estudado em plantas e que dá nome à família. É comum em *Leguminosae*, mas também é encontrado em *Mimosoideae*, *Papilionidae*, *Celastrales*, dentre outras. Trabalhos realizados com o inibidor de tripsina Kunitz (SKTI) em lagarta do repolho (*Mamestra brassicae*) mostraram que a ingestão do inibidor inibiu fortemente a atividade tripsina-like no intestino médio do inseto e induziu atividade tripsina-like insensível ao inibidor (Chougule *et al.*, 2008). Entretanto, larvas do lepidóptera *Plodia interpunctella* não tiveram sua mortalidade e ganho de peso afetados pelo inibidor de soja SBTI, devido provavelmente a uma fraca associação do inibidor com as enzimas digestivas alvo (Amorim *et al.*, 2008).

A família de inibidor de soja Bowman–Birk (BBI) é típica de *Leguminosae* podendo ser encontrada também em *Fabaceae*, *Phaseolaceae*, *Glycinaceae* e *Viciae* (Xavier-Filho & Campos, 1989). O BBI possui uma massa molecular de 8 kDa e é considerado como um potencial agente anticarcinogênico e quimiopreventivo de alguns tipos de cânceres humanos, possivelmente por inibir a atividade de um antígeno específico na próstata; o seu uso em tratamento de pacientes com câncer neste órgão está sendo avaliado (Zhang *et al.*, 1999; Wan *et al.*, 1999). O BBI pode simultaneamente inibir tripsina e quimotripsina em sítios reativos independentes (Xavier-Filho, 1992). O BBI de sementes de soja é único, porque possui um sítio inibidor de quimotripsina mais ativo relativo à atividade do sítio de inibição da tripsina (Kennedy, 1998; Sessa & Wolf, 2001).

Pereira *et al.* (2006), após testarem os efeitos do inibidor BBI em proteases do intestino de *Hypothenemus hampei*, verificaram uma alta atividade inibitória do BBI contra enzimas tripsina-like desse inseto.

A benzamidina é uma amida aromática (Figura 5A), 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 & 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 5B). 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  $\mu\text{M}$  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).

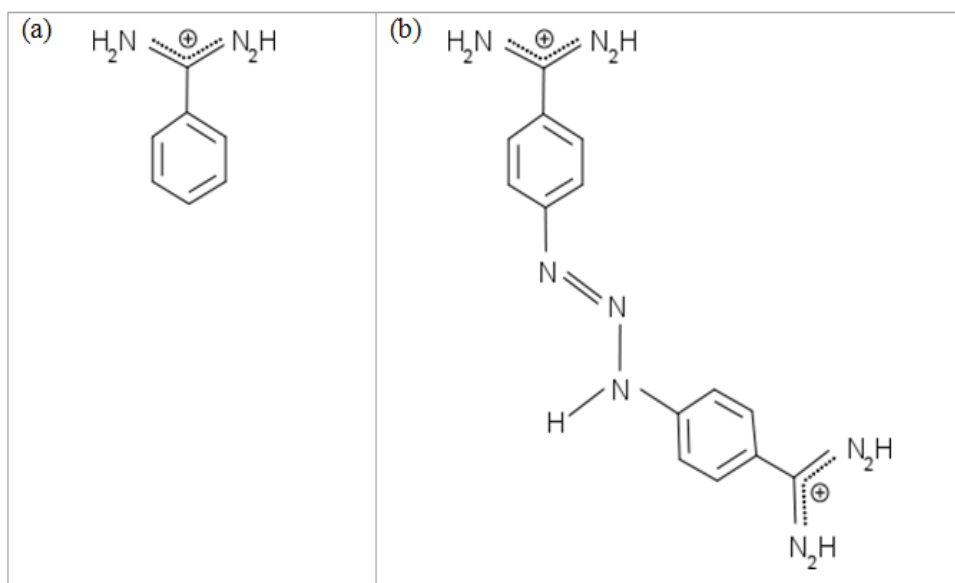


Figura 5 - Estruturas da benzamidina (A) e do berenil (B).

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 administrado por injeção intramuscular (Hutchinson & Watson, 1962; Abaru & 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 6), limitando a quantidade de ingrediente ativo absorvido para a circulação sanguínea.

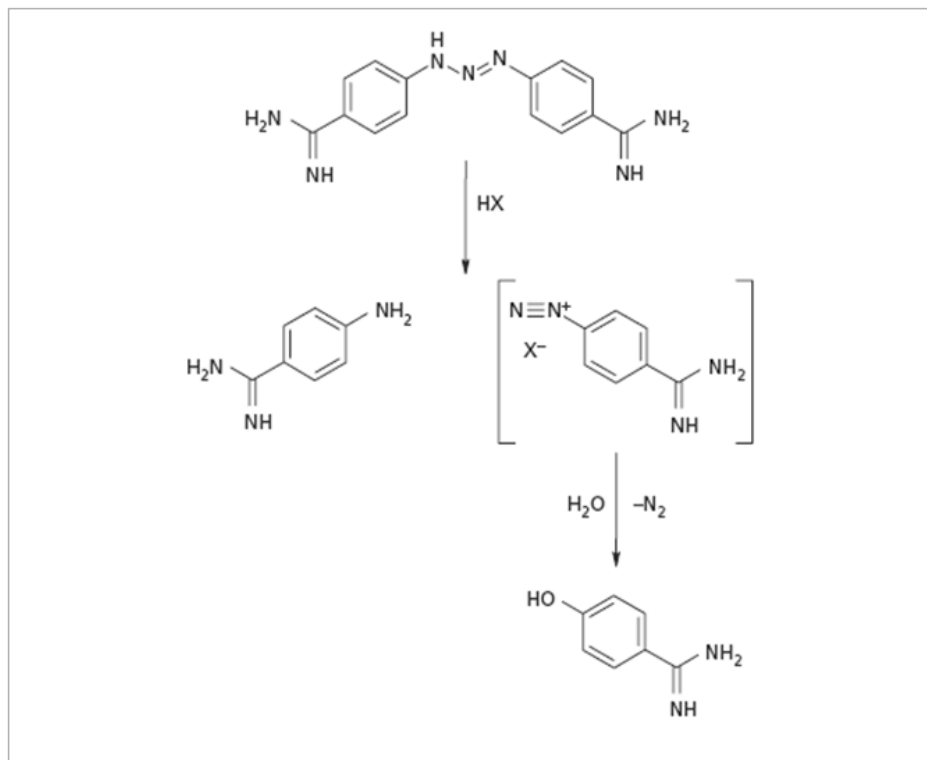


Figura 6 - Rota da degradação do berenil por catálise ácida.

## 2.5. Efeito de inibidores de proteases em insetos

Trabalhos testando o efeito de inibidores sintéticos de proteases em lagarta da soja (*Anticarsia gemmatilis*) foram realizados. Foram utilizadas plantas tratadas com inibidores de proteases do tipo benzamidinas, a fim de determinar o seu efeito sobre os parâmetros biológicos, bioquímicos e comportamentais de *A. gemmatilis*. Os resultados encontrados foram satisfatórios, demonstrando que a lagarta da soja sofre comprometimento do seu desenvolvimento quando tratada com inibidores de proteases sintéticos e em alguns casos verificou-se a morte deste inseto durante o seu ciclo larval (Pilon *et al.*, 2006; Moreira, 2007; Pilon *et al.*, 2009).

Ramos *et al.* (2009), testaram os efeitos de um inibidor de tripsina de sementes de *Plathymentia foliolosa*, da família das fabáceas, sobre o desenvolvimento larval de *Anagasta kuehniella* (Lepidóptera), uma praga de grãos armazenados conhecida como mariposa mediterrânea da farinha. Os resultados mostraram diminuição na sobrevivência e no ganho de peso das larvas, redução na eficiência da conversão do alimento ingerido e alimento digerido e um aumento na digestibilidade e no custo metabólico. Os autores observaram também um decréscimo significativo nos níveis de tripsina no intestino médio das larvas e um aumento nas fezes das larvas alimentadas com a dieta contendo o inibidor.

Serino proteases digestivas tripsina e quimiotripsina presentes no intestino médio de *Spodoptera litura* sofreram influência do inibidor AeTI (inibidor de tripsina) de modo que a atividade tripsina-*like* diminuiu sete vezes enquanto a atividade quimiotripsina-*like* aumentou cinco vezes (Bhattacharyya *et al.*, 2007).

Combinações de proteínas antimetabólicas com diferentes modos de ação têm sido eficientes no aumento da toxicidade para numerosos insetos. A inibição de múltiplas proteases digestivas pode ser mais efetiva no controle das pragas que a inibição de uma única classe de enzimas. Trabalhos de Abdeen *et al.* (2005) e Brunelle *et al.* (2005) mostraram que o efeito de toxinas Bt foi sinergizado por inibidores de proteases, quitinases, lectinas e diferentes toxinas Bt. Esses autores verificaram ainda que combinação de diferentes inibidores de protease com inibidores de  $\alpha$ -amilase, ou inibidores com lecitinas, marcadamente resultou numa maior atividade inseticida quando comparada com a soma dos efeitos individuais dessas proteínas.

Amirhusin *et al.* (2007) estudaram a possibilidade de interação de três inibidores de protease, scN (inibidor de cisteíno proteases de soja), pepistatina A (inibidor de aspartil proteases) e KI (inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz) ingeridos por *Cowpea bruchids* em dieta artificial. Os inibidores scN e pepistatina A, quando aplicados individualmente, inibiram respectivamente importantes cisteíno e aspartil proteases, prolongando significativamente o tempo de desenvolvimento do inseto. Quando combinados, o efeito inibitório foi sinérgico, ou seja, a toxicidade da mistura foi marcadamente maior do que scN ou pepistatina A testados separadamente. O mesmo ocorreu com o inibidor

de tripsina de soja Kunitz (KI), que mesmo em altas concentrações, sozinho não gerou nenhum impacto no desenvolvimento da praga, por ter sido degradado parcialmente pelo trato digestivo do inseto. Mas, quando associado com os outros dois inibidores, o efeito inibitório de KI foi aparente. Segundo os autores, a proteção de KI da proteólise no trato digestivo do inseto pelos outros dois inibidores poderia ser a base para o efeito sinérgico.

## 2.6. Enzimas lipoxigenases

As lipoxigenases (linoleato: oxigênio oxidoredutases; EC 1.13.11.12) constituem uma família heterogênea de enzimas de peroxidação lipídica amplamente distribuídas em plantas e no reino animal, além de também serem encontradas em organismos marinhos inferiores como algas, ouriços, estrelas-do-mar, conchas e corais. São proteínas longas, de cadeia simples com peso molecular de até 103 kDa, com comprimento variando de 923 a 661 resíduos contendo um único átomo de ferro não-heme por mol. São categorizadas como tipo 1 ou tipo 2, dependendo do seu substrato e especificidade dos produtos assim como o seu pH ótimo. A lipoxigenase tipo-1 (incluindo a LOX 1 da soja) tem sua atividade ótima em pH 9 e a lipoxigenase tipo 2 (incluindo a LOX2 e LOX3 da soja) tem geralmente seu pH ótimo mais ácido (pH 5-7) sendo menos específicas para seus substratos e produtos (Baysal & Demirdoven, 2007; Serpen & Gokmen, 2007; Holkova *et al.*, 2009).

As LOX formam derivados hidroperóxidos catalisando a dioxigenação de ácidos graxos poliênicos contendo o sistema cis, cis-1,4-pentadieno, como por exemplo o ácido linoléico (LA),  $\alpha$ -linolênico ou araquidônico. Os ácidos linolênico e linoléico e seus derivados são considerados os principais substratos das lipoxigenases da célula da planta, e o ácido araquidônico e seus ésteres são os principais substratos para as lipoxigenases encontradas em células animais (Acosta *et al.*, 2009). Considerando que o ácido araquidônico é apenas um ácido graxo polinsaturado (PUFA) secundário no reino vegetal, as LOXs das plantas são classificadas com respeito a sua especificidade quanto à posição da oxigenação do LA, que ocorre no carbono 9 ou no carbono 13 formando dois grupos de hidroperóxidos: 9-HPOD (ácido 9-hidroperóxi-10, 12-octadecadienóico) e 13-HPOD (ácido 13-hidroperóxi-9, 11-octadecadienóico

(Acosta *et al.*, 2009). Um estudo recente de Coffa *et al.* (2005) demonstrou que uma mutação no resíduo Ala<sup>542</sup> para Gly no sítio ativo do íon de Ferro na molécula da LOX é responsável pela alteração da proporção dos produtos 9-HPOD e 13-HPOD.

No sistema animal o papel das lipoxigenases é bem estabelecido. Em mamíferos, o ácido araquidônico é convertido em ácido hidroperoxieicosatetrânico. Nos vegetais, o produto imediato da dioxigenação dos ácidos graxos insaturados pelas lipoxigenases são os hidroperóxidos, os quais são transformados em um espectro de compostos com atividade biológica pronunciada tais como ácido jasmônico, ácido traumático, alquenos, aldeídos e álcoois em plantas (Axelrod *et al.*, 1981; Mack *et al.*, 1987; Vick & Zimmerman, 1987).

Existe uma ampla evidência que as lipoxigenases são elementos cruciais na estratégia de defesa das plantas. A remoção de lipoxigenases específicas de folhas de tabaco, pela engenharia genética, converteu plantas de tabaco resistentes a *Phytophthora parasítica* var. *nicotiana* em plantas suscetíveis (Baysal & Demirdoven, 2007). Embora o mecanismo de resistência seja desconhecido, as lipoxigenases são parte essencial desse processo de resistência. Muitas plantas respondem ao ataque de insetos ou injúria pela produção de jasmonato, e a ativação de genes de inibidores de protease em folhas injuriadas e não injuriadas (Guimarães *et al.*, 2008; Scott *et al.*, 2010; Shivaji *et al.*, 2010). O modelo proposto por Farmer & Ryan (1992) para genes que codificam inibidores de proteases em plantas de tomate mostra que um sinal sistêmico é aparentemente necessário para a indução desses genes de defesa (Figura 7). Os autores postularam que o ácido jasmônico é parte integral de um sistema de transdução de sinal intracelular que regula genes de defesa (inibidores de proteases). Segundo esses autores, quando a planta é ferida por inseto, é produzido um sinal sistêmico: sistemina (um peptídeo constituído de dezoito resíduos de aminoácidos); ou quando a planta é injuriada por um patógeno, é produzida uma molécula-sinal: oligouronídeo (polissacarídeo presente na parede celular de plantas, liberado pela ação de patógenos). Rickauear *et al.* (1992) verificaram que oligogalacturonídeos e quitosanas (polissacarídeos liberados da parede celular de fungos) também atuam como moléculas-sinais. Wasternack & Partheir (1997) identificaram vários outros

compostos e proteínas envolvidos na via de sinalização, sendo um deles a prosistemina, uma proteína contendo 200 resíduos de aminoácidos que dá origem à sistemina.

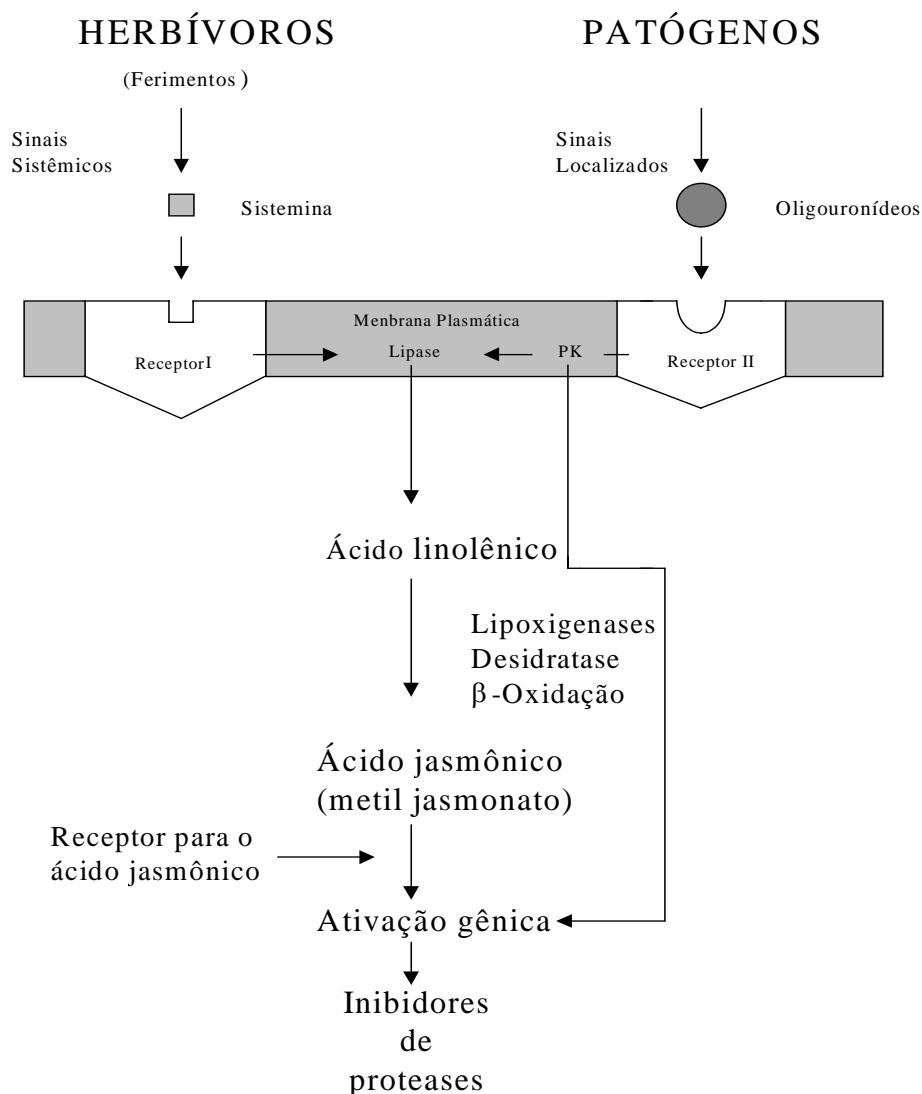


Figura 7 - Modelo proposto para a sinalização que regula a expressão de genes inibidores de proteases induzidas por ferimento em folhas de tomate. PK = Proteína Quinase (Fonte: Farmer & Ryan, 1992).

Inicialmente isolada das folhas de tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. (Solanaceae), a sistemina é um polipeptídeo com 18 resíduos de aminoácidos ativo em concentração muito baixa (fentomolar). Esse hormônio-peptídeo age na via sinalizadora octadecanóide que gera ácido jasmônico, um sinalizador chave para desencadear o processo genético de defesa (Bari & Jones, 2009). Quando

uma folha é ferida por herbivoria ou mecanicamente, os genes codificadores de sistemina são expressos, transcritos e rapidamente transportados via floema para outras partes da planta ainda intactas. De acordo com Matsubayashi e Sakagami (2006), a sistemina atua sobre a *mitogen activated protein* - MAP - cinase levando à ativação da fosfolipase e conseqüente liberação do ácido linoléico das membranas e aleno óxido-ciclase que gera o intermediário do ácido jasmônico, o ácido 12-oxo-fitodienólico - OPDA. Estes eventos culminam no aumento da produção de ácido jasmônico que regula, via *feedback* positivo, a expressão gênica da prosistemina. O ácido jasmônico produzido move-se através do sistema vascular onde alcança folhas intactas, desencadeando o processo de defesa no vegetal provocando a inibição da herbivoria (Picchi *et al.*, 2009; Shivaji *et al.*, 2010).

As plantas se defendem contra os diversos ataques de pragas e patógenos pela indução de defesas geral e específica (Bruce & Pickett, 2007; Kessler & Halitschke, 2007).

Halitschke e Baldwin (2005) observaram que durante o ataque de lagartas, a injúria no tecido das folhas da planta hospedeira induziu a biossíntese de fitohormônios oxilipinas, tais como ácido jasmônico (AJ), o qual resulta em resistência geral induzida dependente de octadecanóide. As plantas também atingem sua resposta de defesa especificamente contra os insetos herbívoros.

O estudo do efeito do tratamento com ácido jasmônico em plantas de repolho com relação a sua aceitabilidade para oviposição por duas espécies de mariposas, *Pieris rapae* e *P. brassicae*, mostrou uma menor oviposição nas folhas tratadas com ácido jasmônico comparado com o controle (Bruinsma *et al.*, 2007).

A produção de ácido jasmônico é um processo regulado e as concentrações desse ácido em tecidos normais (não estressados) da planta são, geralmente, muito baixas. Entretanto, o ácido jasmônico se acumula em plantas feridas ou em células de plantas tratadas com pragas e patógenos (Wang *et al.*, 2000; Guimarães *et al.*, 2008; Shivaji *et al.*, 2010). O papel dos jasmonatos na indução de genes de defesa contra estresse tem sido caracterizado com respeito à expressão de genes de inibidores de proteases induzidos por ferimento, os quais protegem a planta contra serino-proteases digestivas de insetos herbívoros (Farmer & Ryan, 1992).

Em trabalho com o tabaco, Halitschke & Baldwin (2007) verificaram que a remoção da atividade lipoxigenase induzida por injúria na planta, elimina a produção de jasmonato e/ou inibidores de protease em resposta a injúria, a qual levou ao aumento da suscetibilidade ao ataque do inseto. As lipoxigenases, em plantas, também têm sido implicadas em processos como germinação de sementes (Park *et al.*, 1994; Barros *et al.*, 2008), resposta a ferimento mecânico (Vieira *et al.*, 2001; Glauser *et al.*, 2008) e biossíntese de moléculas sinalizadoras e compostos regulatórios (Anderson *et al.*, 1989; Farmer & Ryan, 1992; Weech *et al.*, 2008).

Thorpe *et al.* (2007) demonstraram que o jasmonato move-se rapidamente por toda planta, tanto pelo xilema quanto pelo floema. Esta observação foi possível, pois utilizaram moléculas de ácido jasmônico, marcadas por radio isótopos ( $^{11}\text{C}$ ) no radical metil e detectados por cintilação na tomografia de emissão positrônica (PET). Estes autores acreditam que o metil jasmonato (MeJA), possivelmente, utilize os transportadores de sacarose, distribuindo-se mais rapidamente que os fotoassimilados, além de poder tramitar entre floema e xilema devido a volatilidade do MeJA. Isto aponta evidências de que o jasmonato pode ser um sinalizador na indução de resistência sistêmica.

Produtos da Via das Lipoxigenases como traumatina, ácido jasmônico, alquenos e aldeídos voláteis, são utilizados como mensageiros químicos na via de transdução de sinais da resposta a injúria, nas interações patógeno-hospedeiro e como reguladores do crescimento e desenvolvimento (Figura 8).

A liberação do ácido linolênico da membrana tem sido um importante passo no controle da síntese de ácido jasmônico. Estudos têm sugerido que a fosfolipase D (PLD) tem um importante papel na hidrólise de lipídios mediante o ferimento induzido.

A translocação intracelular da PLD do citosol para a membrana ocorre mediante o aumento intracelular da concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  (Ryu & Wang, 1995).

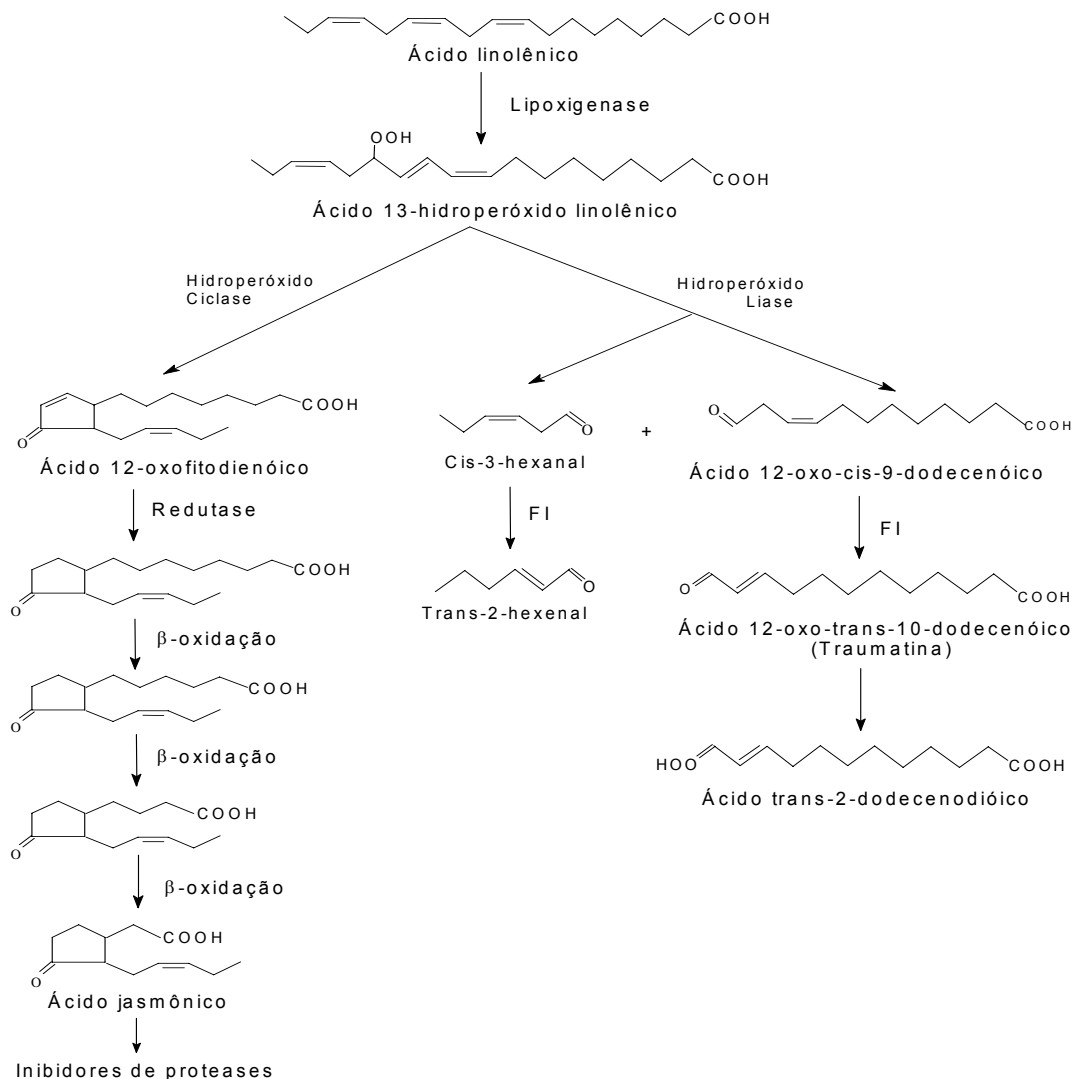


Figura 8 - Via bioquímica das lipoxigenases mostrando parte das reações em cascata a partir do ácido linolênico. FI: fator de isomerização (Fonte: Croft *et al.*, 1993; Gardner, 1991; Farmer e Ryan, 1992).

A PLD associada à membrana torna-se ativa e produz ácidos graxos polinsaturados livres da membrana fosfolipídica iniciando o processo lipolítico, o que leva à formação de ácido jasmônico e aldeídos voláteis de seis carbonos.

As lipoxigenases têm sua expressão aumentada em folhas, quando da ocorrência de ferimento (Fortunato *et al.*, 2007). A planta de soja tem sido destacada por conter altas concentrações de lipoxigenases sendo, por isso, o material biológico mais utilizado em estudos dessas enzimas. Nesta planta, estas enzimas encontram-se organizadas em uma grande família multigênica (Siedow, 1991) que pode resultar, em um dado tecido, na presença de um complexo de isoenzimas de lipoxigenases, que diferem na especificidade pelo

substrato, parâmetros cinéticos e estereoespecificidade na dioxigenação do substrato (León & Sanchez-Serrano, 1999).

### 3 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abaru, D.E., Liwo, D., Okori, E.E. 1984. Restrospective long-term study of effects of Berenil by follow-up of patients treated since 1965. *Tropenmed Parasitology*. 35:148-150.
- Abaru, D.E., Matovu, F.S. 1981. Berenil in the early stage human trypanosomiasis cases. In: Proceedings, 17th meeting, International Scientific Concil for Trypanosomiasis Research and Control, Arusha, Tanzania OAU STRC Publication 112 pp. 194-198.
- Abdeen, A., Virgos, A., Olivella, E., Villanueva, J., Aviles, X., Gabarra, R., Prat, S. 2005. Multiple insect resistance in transgenic tomato plant over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology*. 57:189-202.
- Acosta, I. F., Laparra, H., Romero, S. P., Schmelz, E., Hambeg, M., Mottinger, J. P., Moreno, M. A., Dellaporta, S. L. 2009. Tasselseed1 Is a Lipoxigenase Affecting Jasmonic Acid Signaling in Sex Determination of Maize. *Science*, 323-262.
- Ahmad, Z., Saleemuddin, M., Siddi, M. 1980. Purification and characterization of three alkaline proteases from the gut of the larva of armyworm *Spodoptera litura*. *Insect Biochemistry*. 10, 667–673.
- Ahmad, V.U., Lodhi, M.A.A., Abbasi, M.A., Choudhary, M.I. 2008. Kinetics study on a novel natural inhibitor of  $\alpha$ -chymotrypsin. *Fitoterapia*. 79(7-8):505-508.
- Ahn, J-E.; K. Zhu-Salzman. 2009. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. *Journal Insect Physiology*. 55:678-685
- Amirhusin, B., Shade, R. E., Koiwa, H. K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Murdock, L. L., Zhu-Salzman, K. 2007. Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Insect Physiology*. 53:734–740.
- Amorim, T.M.L., Macedo, L.L.P., Uchoa, A.F., Oliveira, A.S., Pitanga, J.C.M., Macedo, F.P., Santos, E.A., Sales, M.P. 2008. Proteolytic Digestive Enzymes and Peritrophic Membranes during the Development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Piralidae): Targets for the action of Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) and Chitin-Binding Vicilin (EvV). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:7738– 7745.
- Anderson, J.M., Silatro, S.R., Klauer, S.F., Franceschi, V.R. 1989. Jasmonic acid-dependent increases in the level of vegetative storage proteins in soybean. *Plant Science*, 62:45-52.

- Andrade, F.G., Negreiro, M.C.C., Falleiros, Â.M.F. 2004. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner,1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo. 71:391-398.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T.M., Laasko, S. 1981. Lipoxygenases from soybeans. Methods Enzymology. 71:441-451.
- Ausbel, F.M. 2005. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserve? Nature immunology. 6:973-979.
- Bailey, N.M. 1968. Oral Berenil in the treatment and prophylaxis of human trypanosomiasis. Trans. R. Soc.Trop.Med. Hyg. 62-122.
- Barbara, K.A. 2010. Velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepdoptera: Noctuidae). Disponível em: <<http://creatures.ifas.ufl.edu>>, acessado em 7 de julho de 2010.
- Bari, R., Jones, J. D. G. 2009. Role of plant hormones in plant defense responses. Plant Molecular Biology, Dordrecht. 69:473-488.
- Barros, J.G.A., Moraes, R.M.A., Piovesan, N.D., Barros, E.G., Maurilio Alves Moreira, M.A., 2008. Efeito do inibidor de protease kunitz sobre níveis de lipoxigenases em sementes de soja. Ciência e agrotecnologia., Lavras. 32(4):1126-1132.
- Batista, A.C.; Melatti, V.M.; Demo,C.; Martini, E.S.; Praça, L.B.; Gomes, A.C.M.M.; Falcão, R.; Brod, C.S.; Monnerat, R.G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas para o controle de *Anticarsia gemmatalis*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n.82, EMBRAPA, 2005.
- Baysal, T., Demirdoven, A. 2007. Lipoxygenase in fruits and vegetables: A review. Enzyme and Microbial Technology. 40: 491-496.
- Begon, M, Townsend, C. R, Harper, J. L. 2007. Ecologia de Indivíduos a Ecossistemas. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 740 p.
- Belitz,H.D., Grosch, W. Quimica de los alimentos. Espanha: Acribia, 1087, 1997.
- Bhattacharyya A., Leighton S. M., Babu C. R. 2007. Bioinsecticidal activity of Archidendron ellipticum trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. Comparative Biochemistry and Physiology. 145:669-677.
- Bouteille, B., Oukem, O., Bisser, S., Dumas, M. 2003. Treatment perspectives for human African trypanosomiasis. Fundamental & Clinical Pharmacology. 17(2): 171-81.
- Broadway, R.M., D.L. Missurelli. 1990. Regulatory mechanisms of tryptic inhibitory activity in cabbage plants. Phytochemistry. 29: 3721-3725.

- Bruce, T. J. A., Pickett, J. A. 2007. Plant defense signalling induced by biotic attacks. *Current Opinion in Plant Biology*. 10:387–392.
- Bruinsma, M., Van Dam, N. M., Van Loon, J. J. A., Dicke, M. 2007. Jasmonic Acid-Induced Changes in *Brassica oleracea* Affect Oviposition Preference of Two Specialist Herbivores. *Journal of Chemistry Ecology*. 33:655-668.
- Brunelle, F., Girard, C., Cloutier, C., Michaud, D., 2005. A hybrid, broad-spectrum inhibitor of Colorado potato beetle aspartate and cysteine digestive proteinases. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 60:20–31.
- Campos, W.G., Faria, A.P., Oliveira, M.G.A., Santos, H.L. 2008. Induced response against herbivory by chemical information transfer between plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 20(4): 257-266.
- Chen, H., Gonzales-Vigil, E., Wilkerson, C.G., Howe, G.A. 2007. Stability of plant defense proteins in the gut of insect herbivores. *Plant Physiology*. 143:1954-1967.
- Chevreuril, L.R., Gonçalves, J.F.C., Bariani, A., Rodrigues, J.V.F.C., Pando, S.C. 2009. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. *Acta Amazonica*. 39(1):199 – 206.
- Chou K.C., Cai, Y.D. 2006. Prediction of protease types in a hybridization space. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 339(3):1015-1020.
- Chougule, N.P., Doyle, E., Fitches, E., Gatehouse, J.A. 2008. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (Cabbage moth: Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *Journal of Insect Physiology*. 54:563-572.
- Christeller, J.T. 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS Journal*. 272:5710–5722.
- Coffa, G., Imber, A. N., Maguire, B. C., Gurunathan, L., Scheneider, C. J., Gaffney, B. J., Brash, A. R. 2005. On the relationships of substrate orientation, hydrogen abstraction, and product stereochemistry in single and double dioxygenations by soybean Lipoxygenase-1 and its Ala542Gly mutant. *Journal of Biological Chemistry*. 280(46):38756-38766.
- Coley, P.D., Barone, J.A. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27, 305-335.
- Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. Levantamento de grãos 2009/2010. [S.l.], 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 Abr. 2010.

- Costilla, M. 1988. Biología e importância de la oruga verde de la soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). Revista Industrial y Agrícola de Tucumán. 65(1-2):169-184.
- Dall'Agnol, A., Lazarotto, J.J., Hirakuri, M.H. 2010. Desenvolvimento, Mercado e Rentabilidade da Soja Brasileira. Circular Técnica, 74.
- Dirzo, R. 1984. Insect-plant interactions: some ecophysiological consequences of herbivory. Physiological ecology of plants of the wet tropics (eds. E. Medina, H.A. Mooney & C. Vázquez-Yanes). 209-224. Dr. Junk Publishers, The Hague.
- Dirzo, R., Domínguez, C.A. 1995. Plant-herbivore interactions in Mesoamerican tropical dry forests. Seasonally Dry Tropical Forests (eds. S.H. Bullock, E. Medina & H.A. Mooney), 304-325. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- 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.
- Duke, S. O. Natural pesticides from plants. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1990/v1-511.html>>. Acesso em: 06 julho 2010.
- Dumas, V.F., Goldenberg, C.S., Melo, F.R., Martins, E.S., Praça, L.B., Monnerat, R.G. 2007. Avaliação da atividade celulásica e quitinásica de estirpes de *Bacillus thuringiensis* ativas contra *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *Anthonomus grandis*. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Série Documento, 211).
- Ehrlich, P.R., Raven, P.H., 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. Evolution 18(4): 586–608.
- Eutrópio, F.J.; Silva, A.G. 2009. Análise comparada de perda por herbivoria de área em folhas jovens e adultas de *Croton* sp. (Euphorbiaceae) na REBIO de Duas Bocas, Cariacía, Espírito Santo, Sudeste do Brasil. Natureza on line. 7(1):27-30.
- Fan, S.G., Wu, G.J. 2005. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. Botanical Bulletin of Academia Sinica. 46:273-292.
- Farmer, E.E., Ryan, C.A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. The Plant Cell, 4: 129-134.
- 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 lipoxygenases does not affect soybean defense against removal of reproductive tissue. Bioscience Journal. 21: 49-55.

- 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.
- 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., 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.
- Frost, C.J., Mescher, M.C., Carlson, J.E., De Moraes, C. 2008. Plant defense priming against herbivores: getting ready for a different battle. Plant Physiology. 146:818-824.
- Fugi, C.G.Q., Lourenção, A.L., Parra, J.R.P. 2005. Biology of *Anticarsia gemmatilis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. Scientia Agrícola. 62(1):31-35.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, S. 2002. Entomologia Agrícola. Piracicaba: FEALQ. p.920.
- Gardner, W.H. 1991. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. Biochimica et Biophysica Acta., 1084: 221-239.
- Gatehouse, J.A., Gatehouse, A.M.R. Genetic engineering of plants for insect resistance. [http://silverserver.dur.ac.uk/Teaching/Rechcigl\\_Chapter/GM\\_Insect\\_Resistant\\_Plants](http://silverserver.dur.ac.uk/Teaching/Rechcigl_Chapter/GM_Insect_Resistant_Plants), acessado em 31 de janeiro de 2010.
- Gazzoni, D. L., Yoriniori, J. T. 1995. Manual de identificação de pragas e doenças da soja. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1995. 128p. (Manual de identificação de pragas e doenças, 1).
- Glauser, G., Grata, E., Dubugnon, L., Rudaz, S., Farmer, E.E., Wolfender, J.L. 2008. Spatial and Temporal Dynamics of Jasmonate Synthesis and Accumulation in *Arabidopsis* in Response to Wounding. Journal of Biological Chemistry. 283(24):16400-16407.
- Gomes, A.P.G., Dias, S.C., Bloch Jr, C., Melo, F.R., Furtado-Jr, J.R., Monnerat, R.G., Grossi-De-Sa, M.F., Franco, O.L. 2005. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. Comparative Biochemistry and Physiology. 140:313-319.

- Greene, G. L., Reid, J. C., Blount, V. N., Riddle, T. C. 1973. Mating and oviposition of the velvetbean caterpillar in soybeans. *Environmental Entomology*, College Park. 2(6):1113-1115.
- Guimarães, L.M.P., Pedrosa, E.M.R., Coelho, R.S.B., Chaves, A., Maranhão, S.R.V.L., Miranda, T.L. 2008. Efeito de metil jasmonato e silicato de potássio no parasitismo de meloidogyne incognita e *Pratylenchus zae* em Cana-de-Açúcar. *Nematologia Brasileira*. 32(1):50-55.
- Gullan, P. J, Cranston, P. S. 2007. Os insetos: um resumo de entomologia. 3. ed. São Paulo: Roca. 440 p.
- Halitschke, R., Baldwin, I. T. 2005. Jasmonates and related compounds in plant–insect interactions. *Journal of Plant Growth and Regulation*. 23:238–245.
- 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.
- Hedstrom, L. 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*. 102(12):4501-4523.
- Herrero, S., Combes, E., Van Oers, M.M., Vlak, J.M., Maagd, R.A., Beekwilder, J. 2005. Identificacion and rcombinat expression of a novel chymotrypsin from *Spodoptera exigua*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 35:1073-1082.
- Holkova, I., Bezakova, L., Vanko, M., Bilka, F., Oblozinsky, M. 2009. Lipoxygenases and Their Significance in Biochemical Processes in Plant Organisms. 103(6):487-495.
- Howe, G. A., Jander, G. 2008. Plant Immunity to Insect Herbivores. *Annual Review of Plant Biology*., 59:41-66.
- Hutchinson, M.P., Watson, H.J.C. 1962. Berenil in the treatment of Trypanosoma Gambiense infection in man. *Transactions of the Royal Society Tropical Medicine Hygiene*. 56. 227-230.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (online). <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_200912comentarios.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200912comentarios.pdf)> Acessado em 08 de junho de 2010.
- Joanitti, G.A., Freitas, S.M., Silva, L.P. 2006. Proteinaceous Protease Inhibitors: Structural Features and Multiple Functional Faces. *Current Enzyme Inhibition*. 2(3):199-217.
- Jongsma, M. A., Bolter, C. 1997. The Adaptation of Insects to Plant Protease Inhibitors. *Journal Insect Physiol*. 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.
- Kamel, F., Engel, L.S., Gladen, B.C., Hoppin, J.A., Alavanja, M.C.R., Sandler, D.P. 2007. Neurologic symptoms in licensed pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Human & Experimental Toxicology*. 26:243-250.
- Kanost, M.R., Clarke, T.E. 2005. Proteases. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, vol. 4. Pergamon, New York, 247–265.
- Kant, M. R., Baldwin, I. T. 2007. The ecogenetics and ecogenomics of plant–herbivore interactions: rapid progress on a slippery road. *Current Opinion in Genetics & Development*. 17:519–524.
- Karban, R., I.T. Baldwin. 1997. *Induce responses to herbivory*. Chicago, University of Chicago Press, 317p.
- Kennedy, A.R. 1998. Chemopreventive agents: Protease Inhibitors. *Pharmacol. Therapeutic*. 78(3):167-209.
- Kessler, A., Halitschke, R. 2007. Specificity and complexity: the impact of herbivore-induced plant responses on arthropod community structure. *Current Opinion in Plant Biology*. 10:409–414.
- Kim, J.-Y., Park, S.-C., Hwang, I., Cheong, H., Nah, J.-W., Hahm, K.-S., Park, Y. 2009. Protease Inhibitors from Plants with Antimicrobial Activity. *International Journal of Molecular Science*. 10:2860-2872.
- Koiwa, H., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends Plant Science*. 2:379–384.
- Konarev, A.V., Lovegrove, A., Shewry, P.R. 2008. Serine proteinase inhibitors in seeds of *Cycas siamensis* and other gymnosperms. *Phytochemistry*. 69 (13): 2482-2489.
- León, J., Sánchez-Serrano, J.J. 1999. Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. *Plant. Physiology Biochemistry*. 37:373-380.
- Leung-Toung; Li, W., Tam, T. F., Karimian, K. 2002. Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a Review. *Current Medicinal Chemistry*. 9(9):979-1002.
- Levy, F., Rabel, D., Charlet, M., Bulet, P., Hoffmann, J.A., Ehrersabatier, L., 2004. Peptidomic and proteomic analyses of the systemic immune response of *Drosophila*. *Biochimie*. 86, 607-616.
- Lehninger, N.D., Cox, M.M. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, Third Edition, New York.

- Lingaraju, M.H., Gowda, L.R. 2008. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfite bridge. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1784:850-855.
- Macedo, L. P. M., Cunha, U. S., Vendramim, J. D. 2007. Gossipol: fator de resistência a insetos-praga. *Campo Dig., Campo Mourão*. 2(1):34-42.
- Macedo, M. L. R., Sa, C. M., Freire, M. G. M., Parra, J. R. P. A. 2004. kunitz-type inhibitor of Coleopteran proteases, isolated from *Adenantha pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52:2533-2540.
- Macrae, T.C., Baur, M.E., Boethel, D.J., Fitzpatrick, B.J., Gao, A.G., Gamundi, J.C., Harrison, L.A., Kabuye, V.T., Mcpherson, R.M., Miklos, J.A., Paradise, M.S., Toedebusch, A.S., Viegas, A. 2005. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1A* gene for control of Lepidoptera. *Journal of Economic Entomology*. 98:577-587.
- Mack, A. J., Peterman, T. K., Siedow, J. N. 1987. Lipoxygenase isoenzymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. *Current Topics in Biological Medical Research*.13:127-54.
- Maffei, M.E., Mithofer, A., Boland, W. 2007. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*. 68(22):2946-29459.
- 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.
- Mares-Guia, M., Rogana, E., Amorin, A.F., Magalhães-Rocha, N.M. 1981. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. *The Journal of Biological Chemistry*. 256: 1661-1668.
- Maron, J.L., Crone, E. 2006. Herbivory: effects on plant abundance, distribution and population growth. *Proceedings of the Royal Society*. 273:2575-2584.
- Marinho, J.S., Oliveira, M.G.A., Guedes, R.N.C., Pallini, A., Oliveira, C.L. 2008. Inibidores de proteases de hospedeiros nativos e exóticos e sua ação em intestinos de lagartas de *Thyrinteina leucocearae*. *Revista Árvore, Viçosa, MG*, 32(6):1125-1135.
- Martins, G.L.M., Toscano, L.C., Tomquelski, G.V., Maruyama, W.I. 2009. Inseticidas no controle de *Anticarsa gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) e impacto sobre aranhas predadoras em soja. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias, Recife*. 4(2):128-132.
- 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.

- Matsubayashi, Y., Sakagami, Y. 2006. Peptide hormones in plants. Annual Review of Plant Biology. 57:649-674.
- Mello, M. 2007. Influence of herbivore attack patterns on reproductive success of the shrub *Piper hispidum* (Piperaceae). *Ecotropica*. 13(1): 1-6.
- Mello, M.O.; Silva-Filho, M.C. 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal Plant Physiology*. 14(2):71-81.
- Mendonça, E.G., Oliveira, M.G.A., Visôto, L. V., Guedes, R.N., Ribeiro, F.R., Oliveira, J. 2009. Determinação da atividade enzimática e do número de bactérias associadas ao intestino médio da lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis*, criada em diferentes dietas. *Revista Ceres*. 56(1): 018-024.
- Mendonça, E.G. 2008. Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de cisteíno-proteases do intestino médio da lagarta da soja. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 68p.
- Menezes, H. 2009. Imunidade inata e específica em plantas. Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, PR, 30(2):195-212.
- Migliolo, L., Oliveira, A.S., Santos, E.A., Franco, O.L., Sales, M.P. 2010. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine and cysteine-proteinases. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. 29(2):148-56.
- Mosolov, V.V.; Valueva, T.A. 2005. Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 41(3): 261-82.
- Moreira, F.L. 2007. Efeito do inibidor de serino-proteases, berenil, sobre a eficiência alimentar, atividade proteolítica e desenvolvimento pós-embrionário de *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal De Viçosa.
- Moscardi, F., Barfield, C. S., Allen, G. E. 1981a. Consumption and development of velvetbean caterpillar as influenced by soybean phenology. *Environmental Entomology*, College Park. 10(6):880-884.
- Moscardi, F., Barfield, C. S., Allen, G. E. 1981b. Effects of temperature on adult velvetbean caterpillar oviposition, egg hatch and longevity. *Annals of the Entomological Society of America*, Columbus. 74(2):167-171.
- 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., Xavier, L.P., Guedes, R.N.C. 2005. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140 (B):369-380.
- Oliveira, A. S., Migliolo, L., Aquino, R.O., Ribeiro, J.K.C., Macedo, L.L.P., Andrade, L.B.S., Bemquerer, M.P., Santos, E.A., Kiyota, S., Sales, M.P. 2007. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds and its *in vitro* effects towards digestive enzymes from insect pests. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45:858-865.
- Opitz, S. E. W., Müller, C. 2009. Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology, Switzerland*. (19)117-154.
- Page, M.J., Di Cera, E. 2008. Serine peptidases: classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65:1220-1236.
- Park, T.K, Holland, M.A, Laskey, J.G., Polacco, J.C. 1994. Germination-associated lipoxygenases transcripts persist in maturing soybean plants and are induced by jasmonate. *Plant Science*. 96:109-117.
- Peregrine, A. S., Mamman, M. 1993. Pharmacology of Dimmenazene: a review. *Acta Tropica Basel*. 54:185-203.
- Pereira, R., Nogueira, J.A., Brilhante, O., Zangrando, E.L., Valencia-Jimenez, A., Grossi, M.F. 2006. An  $\alpha$ -amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Phytochemistry*. 67:2009-2016.
- Picchi, D.G., Altei, W.F., Saito, M.S., Bolzani, V.S., Cilli, E.M. 2009. Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese e atividades biológicas. *Quimica Nova*. 32(5):1262-1277.
- 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* 86:23-29.
- Pilon, A.M., Oliveira, M.G.A., Pilon, F.M., Guedes, R.N.C., Oliveira, J.A., Fazollo, A. 2009. Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. *Ver. Ceres*. 56(6):744-748.
- Piubelli, G.C., C.B. Hoffmann-Campo, F. Moscardi, S.H. Miakubo, M.C.N. 2005. Are chemical compounds important for soybean resistance to *Anticarsia gemmatalis*? *Journal of Chemical Ecology*. 31:1509-1525.
- Praça, L.B., Silva Neto, S.P., Monnerat, R.G. 2006. *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae: Biologia, amostragem e métodos de controle. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Série Documento, 196).

- 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.
- Rakwal R. E., Agrawal G.K., Jwa N.S. 2001. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2 A inhibitors. *Gene.* 263:189-198.
- Ramos, V.S., Freire, M.G.M., Parra, J.R.P., Macedo, M.L.R. 2009. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology.* 152:255–261.
- Reis, D.T.C. 2009. Purificação e caracterização de proteases digestivas tripsina-like do intestino da lagarta da soja envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto. *Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 123p.*
- Reid, J. C. 1975. Larval development and consumption of soybean foliage by the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) in the laboratory. Gainesville, 118p. (MS – University of Florida).
- Richardson, M. 1991. Seed Storage Proteins: The enzyme Inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry.* 5:259-305.
- Rickauer, M., Brodschelm, W., Bottin, A., Esquerré-Tugayé, M.T. 1992. Regulation of proteinase production in tobacco cells by fungal elicitors and methyl jasmonate. *Plant Physiology Biochemistry.* 30(5):579-584.
- Rossi, G.D., Santos, C.D., Cardoso, M.G., Corrêa, A.D., Abreu, C.M.P., Paiva, L.V. 2010. Inibição da tripsina de bicho-mineiro do cafeeiro por um fator não-protéico presente em extratos de folhas de mamona. *Ciência e agrotecnologia.* 34(2): 361-366.
- Ryan, C.A. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta.* 7:112-121.
- Ryu, S.B., Wang, X. 1995. Expression of phospholipase D during castor bean leaf senescence. *Plant Physiology.* 108:713-719.
- Salvesen G, Nagase H. 1989. Inhibition of proteolytic enzymes. En: Beynon, RJ, Bond JS. (Eds) *Proteolytic enzymes a practical approach.* Oxford:IRL Press.
- Savio, G. M., Pinotti, E. B. 2008. Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*) por *baculovirus anticarsia*. *Revista científica eletrônica de Agronomia (FAEF).* Ano VII - Nº 13 - Jun/Periódicos Semestral.
- Schaller, A. 2008. *Induced plant resistance to herbivory.* Springer.

- Schmelz, E.A., Carroll, M.J., Leclere, S., Phipps, S.M., Meredith, J., chourey, P.S., Alborn, H.T., Teal, P.E. 2006. Fragments of ATP synthase mediate plant perception on insect attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 6:8894-8899.
- Schmidt, F. G. V., Monnerat, R., Borges, M., Carvalho, R. 2001. Criação de insetos para avaliação de agentes entomopatogênicos e semioquímicos. Brasília: 17 Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 11).
- Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A., Dicke, M. 2005. *Insect-Plant Biology*. 2nd edition. Oxford University Press Inc., New York.
- Scott, I.M., Thaler, J.S., Scott, J.G. 2010. Response of a Generalist Herbivore Trichoplusiani to Jasmonate-Mediated Induced Defense in Tomato *Journal of Chemical Ecology*. 36:490–499.
- Sessa, D.J., Wolf, W.J. 2001. Bowman-Birk inhibitors in soybean seed coats. *Industrial Crops and Productions*. 14:73-83.
- Serpen, A., Gokmen, V. 2007. Effects of  $\beta$ -carotene on soybean lipoxygenase activity: kinetic studies. *European Food Research and Technology*. 224:743–748.
- Shivaji , R., Camas, A., Ankala, A., Engelberth, J., Tumlinson, J.H., Williams, W.P., Wilkinson, J.R., Luthe, D.S. 2010. Plants on Constant Alert: Elevated Levels of Jasmonic Acid and Jasmonate-Induced Transcripts in Caterpillar-Resistant Maize. *Journal of Chemical Ecology*. 36:179–191.
- Siedow, J.N. 1991. Plant lipoxygenase: struture and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 42:145-188.
- Sibio, P.R. 2008. Aspectos Ecológicos de um Minador Foliar em *Erythroxyllum tortuosum* Mart. (Erythroxyllaceae): Qualidade da Planta, Anatomia das Minas e Variação Hierárquica de Traços Vegetais. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, SP, 91p.
- Silva, R. F. P. 1981. Aspectos biológicos e nutrição de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera – Noctuidae) em meios natural e artificial e influência da temperatura e fotoperíodo no seu desenvolvimento. Piracicaba. 130p. (Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/USP).
- 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.
- Smith, C.M., Boyko, E.V. 2007. The molecular bases of plant resistance and defense responses to aphid feeding: current status. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 122:1-16.

- Soares, A. M. S., Machado, O. L. T. 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Trópica-Ciências Agrárias e Biológicas, Chapadinha*. 1:(1) 9-19.
- SOSBAI (SOCIEDADE SUL-BRASILEIRA DE ARROZ IRRIGADO). 2005. Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil. Santa Maria, Editora Pallotti, 159 p.
- Souza, D.M.M., Amorin, T.M.L., Sales, A.M.P., Vidal, M.S. 2006. Identificação de genótipos de algodão (*Gossypium* spp.), quanto à presença de inibidores de protease. *Estudos de Biologia*. 28(65):97-103.
- Srinivasan, A., Giri, A.P., Gupta, V.S. 2006. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. *Cellular & Molecular Biology Letters*. 11:132-154.
- Sumikawa, J.T., Brito, M.V., Macedo, M.L.R., Uchoa, A.F., Miranda, A., Araújo, A.P.U., Silva-Lucca, R., Sampaio, M.U., Oliva, M.L.V. 2010. The defensive functions are not restricted to insect enzyme inhibition. *Phytochemistry*. 71:214-220.
- 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.R., Ferreira, C. 2000. A digestão dos insetos. In: Medeiros, M.A. As pragas também morrem pela boca. *Pesquisa Fapesp*. 54:20-27.
- 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. 206-235.
- Terra, W.R., Ferreira, C.A. 2000. digestão dos insetos. In: Medeiros, M.A. As pragas também morrem pela boca. *Pesquisa Fapesp*. 54: 20-27.
- Thorpe, MR., Ferrieri, A.P., Herth, M.M., Ferrieri, R.A. 2007. <sup>11</sup>C-imaging: methyl jasmonate moves in both phloem and xylem, Promotes transport of jasmonate, and of photoassimilate even after proton transport is decoupled. *Planta*. 226:541-551.
- Valueva T.A., Mosolov V.V. 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry*. 69(11): 1305-1309.
- Velloso, M.A.L., Abreu, I.N., Mazzafera, P. 2009. Indução de metabólitos secundários em plântulas de *Hypericum brasiliense* Choisy crescendo *in vitro*. *Acta Amazonica*. 39(2): 267-272.
- Vick, B., Zimmerman, D. C. 1987. Oxidative systems for modification of fatty acids: the lipoxygenase pathway. In: Stumpf, P. K., Conn, E. E. (Eds.). *The Biochemistry of Plants*. Orlando: Academic Press. 9:53-97.

- Vidal, M.S., Sales, M.P., Amorim, T.M.L., Sousa, D.M.M. 2005. Atividade Proteolítica do Tipo Tripsínica Durante o Desenvolvimento Larval de Curuquerê-do-Algodoeiro (*Alabama argillacea* Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). Circular Técnica 86.
- Vieira, A.A., Oliveira, M.G.A., José, I.C., Piovesan, N.D., Rezende, S.T., Moreira, M.A., Barros, E.G. 2001. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plant submitted to wounding. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 13(1):1-12.
- Wagner, W., Möhrle, F., Schnetter, W. 2002. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera:Scarabaeidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32(7):803-814.
- Wan, X.S., Ware, J.H., Zhang, L., Newberne, P.M., Evans, S.M., Clark, L.C., Kennedy, A.R. 1999. Treatment with soybean-derived Bowman Birk inhibitor increases serum prostate-specific antigen concentration while suppressing growth of human prostate cancer xenografts in nude mice. *Prostate*. 41(4):243-252.
- Wang, C., Zien, C.A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D.F. Wang, X. 2000. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 12:2237-2246.
- Wasternack, C. 2007. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany, Oxford*. 100:681- 697.
- Wasternack, C., Parthier, B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Sci*. 2:302-307.
- Weech, M.H.I., Chapleau, M., Pan, L., Ide, C., Bede, J.C. 2008. Caterpillar saliva interferes with induced Arabidopsis thaliana defence responses via the systemic acquired resistance pathway. *Journal of Experimental Botany*. 59(9):2437–2448.
- Wititsuwannakul, R., Pasitkul, P., Kanokwiroon, K., Wititsuwannakul, D. 2008. A role for a Hevea latex lectin-like protein in mediating rubber particle aggregation and latex coagulation. *Phytochemistry*, 69: 339 - 347.
- Xavier-Filho, J., Campos, F.A.P. 1989. Proteinase inhibitors. *In: CHEEK, P.R. Toxicants of plant origin*. Boca Raton : CRC Press. 3:1-27.
- Xavier-Filho, J. 1992. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitor in plants. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 4(1):1-6.
- 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.

- Zhang, L., Wan, X.S., Donahue, J.J., Ware, J.H., Kennedy, A.R. 1999. Effects of the Bowman-Birk inhibitor on clonogenic survival and cisplatin-or radiation-induced cytotoxicity in human breast, cervical and head and neck cancer cells. *Nutr. Cancer.* 33(92):165-173.
- Zhu-Salzman, K., Zeng, R.S. 2008. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant defense: Lessons learned from a Bruchid beetle *Keyan Insect Science.* 15 (6): 477- 481.
- Zhu-Salzman, K., Luthe, D.S., Felton, G.W. 2008. Arthropod-Inducible Proteins: Broad Spectrum Defenses against Multiple Herbivores. *Plant Physiology.* 146:852–858.

## CAPÍTULO 1

**Efeitos de berenil no comportamento, desenvolvimento e na atividade de proteases de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae)**

## RESUMO

Na coevolução entre plantas e insetos, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa contra o ataque de insetos. Dentre estes mecanismos, destaca-se a produção de inibidores de protease pela via das lipoxigenases. Os inibidores de proteases (IPs) são polipeptídios hábeis em se ligar às enzimas proteolíticas localizadas no intestino médio dos insetos, tornando-as inativas. Esse processo leva a uma redução da disponibilidade de aminoácidos para a síntese protéica, comprometendo, desta maneira, o crescimento e o desenvolvimento do inseto. A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, é uma das principais pragas da cultura da soja no Brasil. A predominância de enzimas digestivas do tipo serino-proteases em *Anticarsia gemmatalis* motivou a descoberta de IPs com a capacidade de reduzir seu processo digestivo. Este trabalho teve como objetivo verificar a capacidade de resposta das plantas de soja variedade IAC-PL-1 ao ataque de larvas de *A. gemmatalis* bem como analisar os efeitos do inibidor de serino proteases berenil no comportamento, desenvolvimento pós-embrionário e na atividade das proteases digestivas presentes no trato digestivo dessas lagartas. Elas foram alimentadas com folhas de soja da variedade IAC-PL-1 e pulverizadas com o inibidor em seis diferentes concentrações: 0,0; 0,0080; 0,010; 0,20; 0,60; e 1,0% (p/v). As plantas de soja responderam ao ataque das lagartas com um incremento na atividade de lipoxigenases, com conseqüente aumento na produção de inibidores de proteases nas folhas. A ingestão de berenil resultou em uma redução nas atividades proteolítica, amidásica e esterásica no intestino das lagartas, confirmando o efeito do inibidor nesse inseto. O berenil também causou uma diminuição significativa no ganho de peso e na sobrevivência das larvas de *Anticarsia gemmatalis*. Houve interferência do inibidor no comportamento alimentar das lagartas da soja, que tiveram preferência por plantas que não receberam pulverizações de berenil. No teste de preferência para oviposição, as mariposas fizeram a postura de seus ovos tanto nas plantas pulverizadas com o inibidor berenil quanto nas plantas controle. Com base nos resultados apresentados, verifica-se que o inibidor de protease berenil torna-se uma alternativa promissora no controle da lagarta da soja, uma vez que é um inibidor de proteases que ocupa os subsítios S1' e S2' do centro

ativo da enzima, lhe conferindo maior eficiência na diminuição da atividade das proteases digestivas dos insetos que têm a tripsina como principal enzima digestiva.

**Palavras-chave:** Berenil, Lepidoptera, serino-proteases, tripsina.

## ABSTRACT

In coevolution between plants and insects, plants have evolved defense mechanisms against insect attack. Of these mechanisms, there is the production of protease inhibitors for lipoxygenase pathway. The protease inhibitors (PIs) are polypeptides able to bind to proteolytic enzymes located in the midgut of insects, making them inactive. This process leads to a reduction in the availability of amino acids for protein synthesis, affecting, thus, growth and insect development. The caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, is a pest of soybean in Brazil. The prevalence of digestive enzymes like serine proteases in *Anticarsia* led to discovery of IPs with the ability to reduce their digestive process. This study aimed to determine the responsiveness of soybean variety IAC PL-1 to attack by larvae of *A. gemmatalis* and analyze the effects of the inhibitor of serine proteases berenil in behavior, post-embryonic development and activity of digestive proteases present in the gut of these caterpillars. They were fed leaves of soybean cultivar IAC PL-1 and treated with the inhibitor in six different concentrations: 0.0, 0.0080, 0.010, 0.20, 0.60 and 1.0% (w/v). Soybean plants responded to the attack of the caterpillars with an increase in lipoxygenase activity, with consequent increase in the production of protease inhibitors in leaves. Berenil intake resulted in a reduction in proteolytic activity, amidase and esterase in the gut of larvae, confirming the effect of the inhibitor in the insect. The berenil also caused a significant decrease in weight gain and survival of the larvae of *Anticarsia gemmatalis*. There was interference of the inhibitor on the feeding behavior of larvae of the soybean, which had a preference for plants that received no sprays berenil. In the preference test for oviposition, the moths have made the position of their eggs so the plants treated with the inhibitor as berenil in control plants. Based on the results, it appears that the protease inhibitor berenil becomes a promising alternative for the control of the soybean caterpillar, since it is a protease inhibitor that occupies subsites S1 'and S2' active site of the enzyme trypsin, seeking greater efficiency in reducing the activity of digestive proteases of insects that have the main digestive enzyme trypsin.

**Keywords:** Berenil, Lepidoptera, serine proteases, trypsin.

## 1 – INTRODUÇÃO

Entre os fatores que limitam o potencial de produtividade da soja estão as pragas, que atacam as plantas desde a emergência até a maturação fisiológica (Panizzi, 2006). Dentre as diferentes espécies de insetos-praga, *Anticarsia gemmatalis*, conhecida como lagarta da soja, é considerada uma das principais pragas da cultura da soja (Miklos *et al.*, 2007). A maior incidência da lagarta da soja ocorre desde o período vegetativo até o final da floração, exigindo atenção e controle rápido para não causar prejuízos econômicos (Sávio *et al.*, 2008). Por se tratar de um inseto desfolhador, a lagarta da soja começa a se alimentar da epiderme inferior e do mesófilo de folhas jovens e a partir do segundo ínstar já é capaz de se alimentar da folha inteira chegando a promover a completa desfolhação da planta. Quando a folhagem é removida, esta passa a atacar outras partes da planta como caule e pecíolo; e o desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com conseqüente redução da produção de grãos.

As plantas apresentam diferentes mecanismos de defesa, e com base nesses mecanismos, os insetos também desenvolveram estratégias de defesa que permitem aos mesmos metabolizar e utilizar substâncias tóxicas para se protegerem de inimigos naturais (Opitz & Müller, 2009). Dessa forma, uma corrida bioquímica coevolutiva é observada, onde uma planta desenvolve substâncias tóxicas para se defender de insetos fitófagos, e alguns desses conseguem superar essas defesas, tornando-se assim especialistas capazes de desintoxicar ou sequestrar as toxinas vegetais (Bruce & Pickett., 2007; Gullan & Cranston, 2007).

A exploração de mecanismos de resistência endógena das plantas ao ataque de insetos herbívoros tem servido de ferramenta para a aplicação nas estratégias alternativas de controle de pragas (Menezes, 2009; Scott *et al.*, 2010; Gatehouse & Gatehouse, 2010). Uma das principais formas diretas de defesa das plantas contra o ataque de insetos é mediada pela Via das Lipoxigenases, uma vez que por ela ocorre a produção de ácido jasmônico, que ativa os genes que expressam inibidores de proteases (Farmer & Ryan, 1992; Scott *et al.*, 2010; Shivaji *et al.*, 2010).

Inibidores de protease têm sido um promissor meio de defesa das plantas a insetos e patógenos (Senthilkumar *et al.*, 2010). Acredita-se que os inibidores co-evoluíram com o ataque herbívoro dos insetos, e funcionam bloqueando proteases digestivas no intestino das larvas, limitando a liberação de aminoácidos da dieta e conseqüentemente prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos (Oliveira *et al.*, 2005; Zhu-Salzman & Zeng, 2008).

Os inibidores de serino proteases são o tipo mais abundante e amplamente distribuído nas plantas, sendo os inibidores de tripsina o tipo mais comumente descrito (Lawrence & Koundal, 2002; Chevreul *et al.*, 2009; Gatehouse & Gatehouse, 2010). São proteínas relativamente pequenas de 29 a 190 resíduos de aminoácidos e podem ser agrupadas em pelo menos 16 famílias diferentes. Seu mecanismo de ação ocorre por inibição competitiva. Atuam bloqueando a ligação do substrato à enzima através da ligação de um segmento peptídico diretamente no sítio catalítico, de maneira semelhante ao substrato ou ao produto. A seletividade da inibição normalmente ocorre através da utilização de sítios de reconhecimento do substrato pela enzima. O complexo enzima-inibidor formado é termodinamicamente e cineticamente muito estável, apresentando constante de dissociação muito baixa (KI), de maneira que a inibição estequiométrica da enzima é alcançada (Bode & Huber, 1992; Lawrence & Koundal, 2002; Gatehouse & Gatehouse, 2010).

Os efeitos dos inibidores de proteases nos insetos já foram comprovados de diversas maneiras: incorporados na dieta do inseto (Pilon *et al.*, 2006; Ramos *et al.*, 2009), pulverizados diretamente sobre a planta (Marinho, 2006; Pilon *et al.*, 2009) e expressos em plantas transgênicas (Maheswaran *et al.*, 2007; Steppuhn & Baldwin, 2007; Jiménez, 2009; Luo *et al.*, 2009). Existem inibidores de proteases específicos para cada uma das quatro classes de enzimas proteolíticas - serino, cisteíno, aspartato e metalo-proteases.

O berenil é um inibidor sintético de enzimas do tipo tripsina. Além de se ligar ao centro ativo da tripsina como inibidor competitivo, liga-se ao sítio ativo secundário da enzima (Oliveira *et al.*, 1993). Moreira (2007) observou que o berenil adicionado à dieta artificial de *A. gemmatalis* afetou negativamente diversos parâmetros de vida do inseto, sendo ele uma alternativa promissora

para estudos que visam ao controle de herbívoros. Efeitos negativos de berenil também foram observados por Marinho (2010) em lagartas de *Thyrintea leucoceraea*. Este tipo de inibidor ocupa os sítios S1 e S2', respectivamente, sítio de especificidade e sítio secundário de ativação, do centro ativo de tripsina-*like*.

O presente trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do inibidor sintético berenil, que ocupa os sítios de especificidade e de ativação de tripsina-*like* presentes no intestino de *Anticarsia gemmatalis* sobre os seus parâmetros bioquímicos, biológicos e comportamentais. Os resultados advindos desse estudo além de aumentar o conhecimento sobre a interação inseto-planta poderá servir como complemento para a utilização de novos métodos direcionados ao controle de insetos que visam à produção de peptídeos, peptídeos miméticos ou plantas transgênicas resistentes a insetos-praga.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO e no laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos Prof. Marcos Luiz dos Mares Guia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

### 2.1. Criação da Lagarta da Soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner)

Ovos de *Anticarsia gemmatalis* foram obtidos do Centro Nacional de Pesquisa da Soja (CNPSo), Londrina, Paraná, e mantidos no Laboratório de Criação de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, a  $26 \pm 2$  °C de temperatura,  $70 \pm 10$  % de umidade relativa do ar. A lagarta da soja apresenta ciclo biológico com duração entre três e quatro semanas e suas formas adultas foram obtidas de pupas colocadas em placas de Petri no interior de gaiola telada de dimensões 50 x 50 cm, revestida internamente com folhas de papel sulfite, A4.

Após o quarto dia, as mariposas emergiram, e foram alimentadas com solução nutritiva composta de mel (10,5 g), cerveja (350 mL), sacarose (60 g),

ácido ascórbico (1,05 g), nipagin (1,05 g) e água (1000 mL), embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de Petri.

A postura de *A. gemmatalis* ocorreu após o terceiro dia, na superfície do papel que reveste internamente a gaiola. Estas folhas de papel foram retiradas e cortadas em tiras de 2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento e colocadas em copos plásticos de 500 mL com um orifício circular na tampa de aproximadamente 2 cm, onde foi acoplada uma tela de filó. Estes copos foram então transferidos para uma câmara climatizada a 25 °C, com umidade relativa do ar de  $60 \pm 10\%$  e fotoperíodo de 14 horas mantido por “timers” acoplados a lâmpadas tipo luz-do-dia.

No segundo ou terceiro dia após observar a eclosão dos ovos, iniciou-se a alimentação das larvas de *A. gemmatalis* baseada na metodologia de Hoffman-Campo *et al.* (1985), colocando-se um cilindro de dieta artificial em cada copo plástico.

## **2.2. Preparo da dieta artificial**

A dieta artificial foi preparada utilizando diversos ingredientes e sua composição está de acordo a apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição da dieta artificial utilizada no experimento com lagartas (g/100g de mistura)

<b>Ingredientes</b>	<b>Composição (g/100g de mistura)</b>
Feijão mulatinho (cozido) <sup>1</sup>	4,80
Levedo de cerveja <sup>1</sup>	2,40
Germe de trigo <sup>1</sup>	3,80
Proteína de soja <sup>1</sup>	3,80
Caseína <sup>2</sup>	1,90
Agar-agar <sup>3</sup>	1,34
Ácido ascórbico <sup>2</sup>	0,23
Ácido sórbico <sup>4</sup>	0,11
Solução vitamínica <sup>1</sup>	0,38
Nipagin <sup>4</sup>	0,19
Formol 40% <sup>1</sup>	0,23

<sup>1</sup> Obtido no comércio de Viçosa, MG

<sup>2</sup> Obtido da Sigma

<sup>3</sup> Obtido da Isofar- Indústria comércio de produtos químicos Ltda.

<sup>4</sup> Obtido da Synth- LabSynth produtos para laboratório Ltda

Todos os ingredientes, exceto ácido ascórbico, ácido sórbico, nipagin, formol e solução vitamínica, foram processados e misturados, nesta ordem, com o auxílio de um liquidificador industrial. A mistura foi autoclavada por 1 hora a pressão de 1,5 kgf/cm<sup>2</sup>, em seguida foi transferida novamente para o liquidificador, misturada e adicionada de ácido ascórbico (6 g), ácido sórbico (3 g), nipagin (metilparabeno) (5 g), formol 40% (6 mL) e 10 mL de solução vitamínica composta por niacinamida (1 mg), pantotenato de cálcio (1 mg), tiamina (0,25 mg), riboflavina (0,50 mg), piridoxina (0,25 mg), ácido fólico (0,25 mg), biotina (0,02 mg), inositol (20 mg) e água (1L), até formar uma pasta homogênea, que foi transferida ainda quente para recipientes plásticos com tampa. A pasta obtida foi resfriada em câmara germicida acondicionada com luz ultravioleta e conservada a 4 °C.

### **2.3. Obtenção das mudas de soja**

Foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) da variedade IAC-PL-1, considerada padrão de suscetibilidade a insetos desfolhadores e sugadores. As mudas foram cultivadas até o estágio V3 em um ambiente sem histórico de aplicação de qualquer produto foliar. Foram obtidas três plantas de soja em vaso com capacidade para 4,0 kg de solo, em condições de casa de vegetação. As mudas foram pulverizadas com berenil nas concentrações 0,0; 0,008; 0,010; 0,20; 0,60 e 1,0% (p/v). Os três primeiros trifólios de cada planta foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para a avaliação da atividade de lipoxigenases e da produção de inibidores de proteases.

### **2.4. Aplicação do inibidor nas plantas**

Foram utilizadas seis gaiolas com dimensões de 1m x 1m x 1m, recobertas com organza. Cada gaiola continha 6 vasos, cada vaso 3 plantas, portanto 18 mudas de soja, sendo cada gaiola correspondente a um tratamento (Figura 1). As plantas dos tratamentos testes foram pulverizadas com uma solução aquosa contendo Triton X-100 0,01% (v/v) e acrescentada do inibidor de protease berenil nas concentrações de 0,00, 0,0080, 0,010, 0,20, 0,60 e 1,0% (p/v). A pulverização das mudas de acordo com os tratamentos foi realizada com as lagartas nas folhas, como ocorre em uma aplicação no campo. As mudas foram pulverizadas utilizando-se um pulverizador plástico de pressão manual, contendo 150 mL da solução do inibidor.

De cada gaiola, depois de transcorridas 24 horas da pulverização, foram retiradas 18 lagartas dos 6 vasos testes. As mudas retiradas não retornaram às gaiolas. As lagartas retiradas tiveram os intestinos extraídos como descrito no item 2.6 para obtenção do extrato enzimático para posteriores análises.

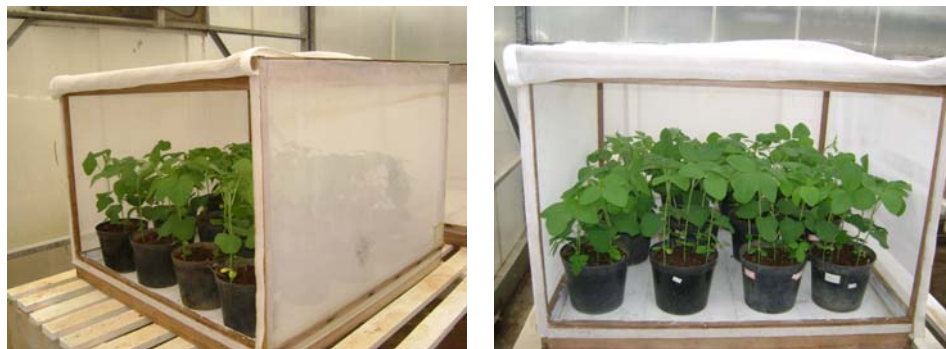


Figura 1 – Foto das gaiolas com as plantas de soja.

## 2.5. Ataque da lagarta da soja

Plantas de soja no estágio V3 de desenvolvimento foram submetidas ao ataque de lagartas de 4<sup>o</sup> ou 5<sup>o</sup> instar (instares em que a lagarta se alimenta mais vorazmente). Em cada vaso contendo 3 plantas de soja, foi colocada uma lagarta no primeiro trifólio de cada planta. Após 24 horas, o primeiro trifólio de cada planta foi coletado e as lagartas removidas nesse período para retirada do intestino médio para posteriores análises. As folhas atacadas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em – 80 °C para posterior obtenção dos extratos foliares.

## 2.6. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio das lagartas

Os intestinos médios foram extraídos após dissecação das lagartas em presença de 1 mL de HCl 10<sup>-3</sup> M a 4 °C e acondicionados em tubos plásticos de 2 mL. Os extratos enzimáticos foram obtidos pelo rompimento celular resultante de nove ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria 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.

## **2.7. Determinação da concentração de proteína nos extratos**

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).

## **2.8. Determinação da atividade protéica de proteases do intestino médio de *A. gemmatalis***

As atividades proteásicas foram determinadas 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, sendo 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 homogeneizadas em vortex e mantidas em repouso, no gelo, por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas 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 de ensaio contendo 280 µL de NaOH 1 M. A atividade foi determinada no sobrenadante com leituras de absorvâncias a 440 nm. O experimento foi realizado em uma série de três repetições e em triplicatas.

## **2.9. Determinação da atividade amidásica tripsina-like do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis***

A atividade amidásica foi realizada pelo método descrito por Erlanger *et al.* (1961), utilizando-se o substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil-p-nitroanilida (L-BApNA), substrato para enzimas tripsina-like na concentração final de 1,2 mM a 25 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl<sub>2</sub>. A mistura de reação consistiu de 0,5 mL do substrato, 0,5 mL do tampão e 10 µL do extrato enzimático. O branco foi composto de 0,5 mL do substrato e 0,5 mL do tampão.

As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, pela medida da absorvância a 410 nm em função do tempo (2,5 minutos), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 ( $M^{-1} \times cm^{-1}$ ) para o produto. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições e em triplicatas.

#### **2.10. Determinação da atividade esterásica de tripsina-like do intestino médio de *A. gemmatalis***

A atividade esterásica foi realizada pelo método descrito por Hummel (1959), utilizando-se o substrato N- $\alpha$ -p-tosil-L-arginina metil éster (L-TAME) na concentração final de 0,1 mM a 25 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM  $CaCl_2$ . O branco foi composto de 0,5mL do substrato e 0,5 mL do tampão.

As velocidades foram determinadas através da medida da absorvância a 247 nm em função do tempo (2,5 minutos), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 540  $M^{-1}.cm^{-1}$  para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições e em triplicatas.

#### **2.11. Determinação da atividade cisteíno protease do intestino médio de *A. gemmatalis***

A determinação da atividade de cisteino-proteases foi realizada adaptando-se o método de Erlanger *et al.* (1961) com adaptações de Mendonça *et al.* (2010). Foram pipetados 0,5 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M contendo Diltreitol 1mM, pH 8,0, 10  $\mu$ L do extrato enzimático do intestino e 0,1 mL do inibidor benzamidina 10 mM. Essa mistura reacional foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado 0,5 mL do substrato L-BApNA na concentração final de 1,2 mM. O branco foi composto de 0,5 mL do substrato, 0,5 mL do tampão e 0,1 mL do inibidor benzamidina.

As velocidades foram determinadas através da medida da absorvância a 410 nm em função do tempo (2,5 minutos), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800  $M^{-1}.cm^{-1}$  para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições e em triplicatas.

## **2.12. Obtenção do extrato foliar**

O preparo do extrato bruto foi realizado a 4 °C, de acordo com o método descrito por Ohta *et al.* (1986), modificado por Batista *et al.* (2002). As folhas de soja, após terem sido pesadas, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e trituradas em almofariz. O pó obtido foi macerado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, na proporção de 1:3 (p/v) e em seguida centrifugado a 17.200 g por 60 minutos a 4 °C. O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para as determinações da concentração de proteína total, avaliação da atividade de lipoxigenases e da concentração de inibidor de proteases.

## **2.13. Determinação da atividade de lipoxigenases**

A atividade de lipoxigenases sobre o ácido linoléico foi determinada de acordo com o método de Axelrod *et al.* (1981), determinando-se a formação do sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado através do aumento da absorvância a 234 nm. O substrato foi preparado a partir de uma solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM, utilizando-se ácido linoléico, aproximadamente 99 % (SIGMA), como se segue: a um erlemeyer envolvido por papel-alumínio contendo aproximadamente 10 mL de água desionizada, previamente fervida, foram adicionados 78 µL de ácido linoléico e 90 µL de Tween 20 (SIGMA). Em seguida, foi feita a homogeneização da solução com auxílio de uma pipeta automática para evitar a formação de bolhas. O clareamento da solução foi obtido adicionando-se gotas de solução de hidróxido de sódio 0,5 M. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, envolvido por papel-alumínio, e o volume foi completado com água deionizada fervida. A solução-estoque de linoleato de sódio foi armazenada a -20 °C em tubos de plástico de 1 mL, envolvidos em papel-alumínio.

A atividade de lipoxigenases foi avaliada na mistura de reação contendo uma solução de 1,0 µL do extrato bruto foliar e 4,0 µL da solução-estoque de linoleato de sódio em 1,0 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5. A absorvância da mistura de reação foi determinada de 30 em 30

segundos, a 234 nm, por períodos de 2,5 minutos. O branco consistiu das mesmas quantidades de substrato e tampão. As velocidades foram obtidas utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 25.000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para o produto formado.

#### 2.14. Determinação de inibidores de proteases

A presença de inibidores de proteases no extrato bruto foliar foi determinada utilizando-se tripsina bovina. A atividade tríptica, na presença de inibidores, consistiu no seguinte procedimento analítico: a) para a análise do teste: 50 µL do extrato; 500 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio, e 50 µL da solução de tripsina 4,7 x 10<sup>-5</sup> M foram adicionados em um tubo de ensaio; b) para o controle da enzima foram adicionados, em outro tubo de ensaio, 550 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 50 µL da solução de tripsina 4,7 x 10<sup>-5</sup> M. c) para o Branco: 600 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio.

Essa mistura contida em ambos os tubos (teste e controle da enzima, respectivamente) foi incubada por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após transcorrido o tempo de incubação, 500 µL da mistura de incubação, do teste e do controle, foram retirados e adicionados a outro tubo com 500 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20mM de cloreto de cálcio e 500 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM. A absorvância da solução foi determinada a 410 nm durante 2,5 minutos de reação. As análises foram feitas numa série de três repetições. Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{mg de tripsina inibida/grama de proteína} = \frac{A \times B}{C \times 1.000 \times P}, \text{ em que:}$$

A = absorvância a 410 nm do controle – absorvância a 410 nm da amostra;

B = diluição da amostra;

P = concentração, em g/mL, de proteína dos extratos; e

C = fator de tripsina, ou seja, o produto da atuação de 1 µg de tripsina ativa sobre o substrato L-BApNA tem uma leitura de absorvância de 0,019 a 410 nm (Kakade *et al.*, 1974).

## **2.15. Estudo da biologia de *Anticarsia gemmatalis***

Larvas de primeiro ínstar de *A. gemmatalis*, provenientes da criação-estoque, foram colocadas em potes plásticos de 400 mL, cada um contendo 5 lagartas. Cada tratamento correspondeu a um total de 12 potes, totalizando 60 lagartas/tratamento.

Os potes foram cobertos com uma tampa plástica contendo um orifício central de 1 cm de diâmetro, vedado por tecido de organza, e mantidos em câmara climatizada sob condições controladas de temperatura em torno de 25 °C

As larvas de *A. gemmatalis* foram alimentadas com folhas de soja pulverizadas com o inibidor de protease berenil nas concentrações de 0,0; 0,008; 0,0100; 0,20; 0,60 e 1,0% (p/v). As folhas foram fornecidas às lagartas de acordo com o tratamento, com os pecíolos envoltos em algodão umedecido em água para mantê-la túrgida, conforme a metodologia de Holtz (2001). Diariamente, por ocasião da substituição das folhas, os potes foram limpos, retirando-se fezes e resíduos alimentares. As lagartas foram alimentadas até o início do período de pré-pupa. Foram avaliados os pesos das lagartas a cada dois dias para posterior avaliação do ganho de peso e da mortalidade.

## **2.16. Teste de preferência das lagartas por plantas com ou sem o inibidor de protease berenil**

A solução contendo berenil foi preparada nas seguintes concentrações: 0,00; 0,10; 0,20; 0,60 e 1,0 % (p/v), solubilizada em água e adicionada de 0,01 % de Triton X-100. A aplicação das soluções contendo o inibidor de proteases foi feita através da pulverização em plantas de soja de estágio V3, plantadas em tubetes de 8 cm de diâmetro e 20 cm de profundidade.

Foram utilizadas lagartas de 4º e 5º instares da criação estoque de *Anticarsia gemmatalis*. As lagartas foram privadas de alimentação por 12 horas antes do início do experimento. As condições de temperatura ( $25 \pm 1$  °C), umidade relativa ( $75 \pm 10$  %) e fotoperíodo (LD 12:12) foram controladas durante todo o experimento.

Para o teste de preferência foram distribuídas 10 mudas de soja equidistantes entre si, sendo que para cada tratamento testado havia duas mudas por tratamento. Esse sistema foi denominado de arena. Cada arena constituiu de uma placa de isopor (Figura 2) com dimensões de 1m x 1m x 1m, recoberta com organza, coberta com um pedaço de isopor com furos equidistantes, onde foram encaixados os tubetes com as mudas de soja. Cada muda foi pulverizada com a solução de inibidor testada, utilizando-se um pulverizador plástico de pressão manual, até o ponto de escorrimento (aproximadamente 30 mL de solução por muda). Após secagem à sombra por aproximadamente 30 minutos as mudas foram encaixadas na arena.

No centro de uma arena as lagartas foram liberadas em três grupos 15 para facilitar a condução do experimento (Figura 2). Cada lagarta liberada correspondeu a uma repetição, totalizando 45 repetições. As observações do comportamento de preferência das lagartas foram avaliadas com 5, 15, 30 e 60 minutos após serem liberados no centro da arena. A cada observação, a lagarta que estava sobre alguma planta tinha sua escolha registrada e era retirada da arena. Depois de registradas as escolhas de todas as lagartas e tendo sido todas retiradas das mudas, as mesmas foram devolvidas ao centro da arena para observar a escolha após a primeira prova, deixando-as na arena por 24 horas. Depois de 24 horas, as lagartas de cada tratamento foram contadas.



Figura 2 – Esquema da disposição da arena para o teste de preferência alimentar das lagartas.

## **2.17. Teste de preferência de oviposição em plantas com ou sem o inibidor de protease berenil**

Para a realização deste teste foram utilizadas fêmeas adultas de *A. gemmatalis*, obtidas da criação estoque do laboratório. Antes do teste, as mariposas fêmeas foram deixadas junto com os machos numa pequena gaiola por 24 horas para que houvesse a cópula.

As soluções contendo berenil foram preparadas nas seguintes concentrações: 0,00; 0,10; 0,20; 0,60 e 1,0% (p/v), solubilizada em água e adicionada de 0,01% de Triton X-100. Cada muda foi pulverizada com a solução de inibidor testada, utilizando-se um pulverizador plástico de pressão manual, até o ponto de escorrimento (aproximadamente 30 mL de solução por muda). Após secagem à sombra por aproximadamente 30 minutos as mudas foram encaixadas na arena. A aplicação das soluções contendo o inibidor de proteases foi feita através da pulverização em plantas de soja de estágio V3, plantadas em tubetes de 8 cm de diâmetro e 20cm de profundidade. Em cada gaiola como descrita anteriormente no item 2.16, foram colocadas 10 plantas equidistantes de forma circular, sendo duas plantas para cada tratamento. Os tubetes foram encaixados em uma superfície de isopor perfurada. Os tratamentos foram distribuídos para que dois tratamentos iguais não ficassem próximos.

Na realização deste teste foram liberadas dez fêmeas e foram observadas em quais plantas elas estavam após 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 minutos. Foram feitas 3 repetições para cada observação. Como este lepidóptero é de hábito noturno estes testes foram realizados no período noturno e para visualizá-los foi utilizada uma lanterna envolvida em papel celofane, não afetando assim o comportamento destes insetos.

Após 24 horas da soltura das mariposas as plantas foram retiradas e as posturas foram contadas.

### 3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os modelos de regressão para atividade enzimática, ganho de peso e testes comportamentais foram testados desde os mais simples (linear e quadrática) para os modelos alternativos de complexidade crescente (modelos de pico não-linear). A escolha do modelo foi realizada com base no aumento do coeficiente de determinação ajustado (adj. R<sup>2</sup>) em relação à complexidade do modelo, relativa simplicidade e altos valores de F (e quadrados médios), utilizando 2DTableCurve (SPSS, 2000). As curvas de sobrevivência foram obtidas através de estimadores de Kaplan-Meier gerada a partir da proporção de lagartas sobreviventes a cada dia desde o início até a conclusão do experimento usando o LIFETEST procedimento do SAS (Instituto SAS, 2001). Os insetos sobreviventes até a emergência dos adultos foram tratados com dados censurados (Alisson, 1998).

### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a Figura 3(A), verificou-se uma diferença na atividade de lipoxigenases entre as plantas de soja que foram atacadas pelas lagartas e as que não foram atacadas. Foi observado um aumento de 80% na atividade das enzimas lipoxigenases nas folhas de soja após o ataque das lagartas, mostrando que as plantas submetidas ao ataque da praga responderam à injúria sofrida através da ativação da rota das lipoxigenases. Estudos bioquímicos têm indicado que os níveis de atividade de lipoxigenases são modulados em resposta a estresses bióticos e abióticos, tais como injúria mecânica (Galliard, 1978; Hildebrand *et al.*, 1988) e ataque de patógenos ou de pragas (Silva, 1999; Silva *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004; Fortunato *et al.*, 2007).

Em tecidos foliares, tem sido demonstrado o envolvimento de lipoxigenases na via de síntese de ácido jasmônico e metil jasmonatos que, por sua vez, atuam na indução da síntese de inibidores de proteases em resposta a ferimento e, portanto, atuam como uma reação à infestação por pragas e patógenos. Os níveis de ácido jasmônico aumentam rapidamente em resposta

a uma ampla extensão de sinais indutivos, incluindo a herbivoria (Shivaji *et al.*, 2010; Santner *et al.*, 2009; Browse e Howe, 2008; Farmer e Ryan, 1992). Bell *et al.* (1995) ao tratarem plantas com inibidores de lipoxigenases verificaram uma redução na síntese de ácido jasmônico. A planta de soja tem sido destacada por conter altas concentrações de lipoxigenases sendo, por isso, um dos materiais biológicos mais utilizado em estudos dessas enzimas.

O aumento na atividade de lipoxigenases consequentemente proporcionou um aumento na síntese de inibidores de proteases como demonstrado na Figura 3(B). Esse aumento na produção de inibidores de proteases, também em torno de 80%, nas folhas de soja após ataque das lagartas, vem confirmar o acionamento da via de defesa pela planta como resposta ao ataque da lagarta. Esses resultados indicam que o aumento observado para os níveis de inibidores de proteases provavelmente ocorreu devido a ativação da via de lipoxigenases, em resposta às injúrias provocadas pela lagarta da soja, como um possível mecanismo de defesa da planta ao ataque do inseto o que pode resultar no aumento de ácido jasmônico, aldeídos e inibidores de proteases. Fortunato *et al.* (2007) e Pilon (2008) também observaram um aumento significativo nos níveis de inibidores de proteases em folhas de soja após o ataque das plantas por lagartas *Anticarsia gemmatalis*. Silva *et al.* (2004) verificaram aumento da produção de inibidores de proteases em folhas de duas variedades de soja, após o ataque da mosca-branca (*Bemisia argentifolii*). De modo semelhante, Scott *et al.* (2010) ao alimentarem o inseto generalista *Trichoplusia ni* com plantas de tomate Def-1 (mutante deficiente de jasmonato) e plantas de tomate mutante superexpressor de jasmonato (Prosisteminina ou Prosis) verificaram que houve uma interferência pós-digestiva, correlacionada com uma diminuição de duas vezes na atividade das enzimas digestivas serino-proteases nos insetos que foram tratados com plantas do mutante Prosis comparadas com os que foram alimentados com o mutante Def-1. Marinho (2006) observou um aumento na produção de inibidores de proteases após transcorrido um tempo de 12 e 24 horas das plantas de eucalipto e goiaba serem atacadas por *Thyrinteina leucoceraea*.

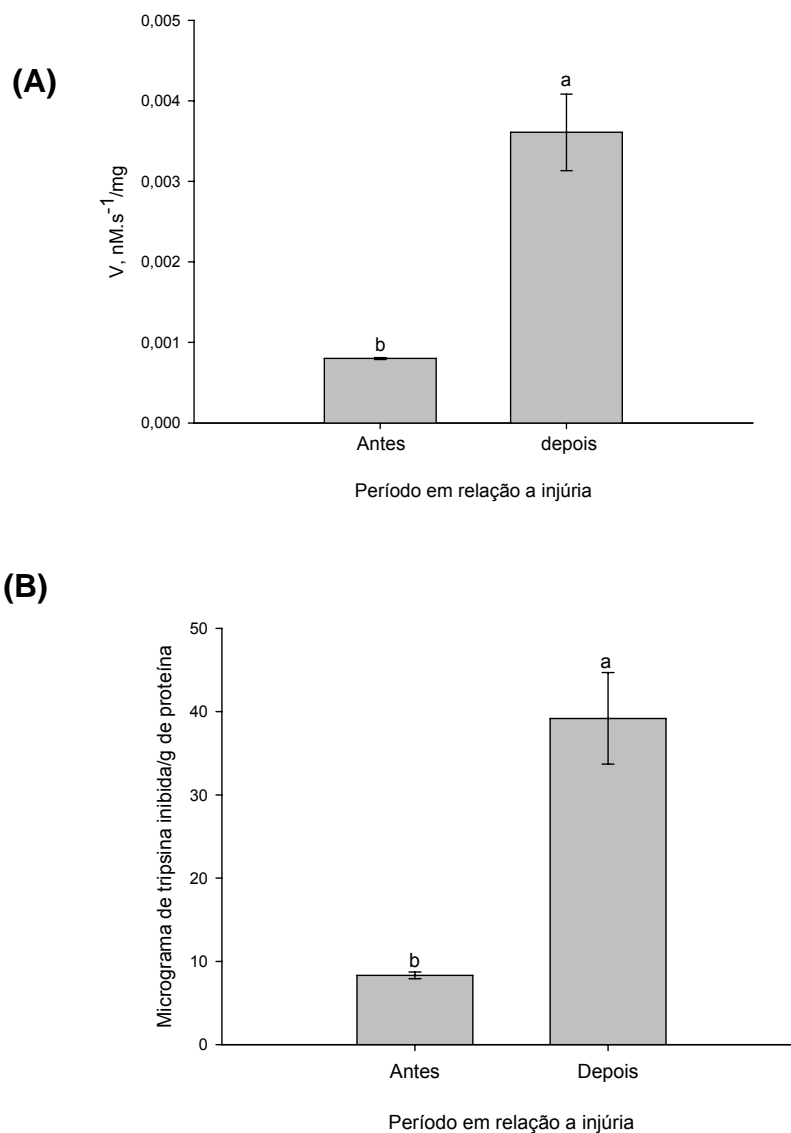


Figura 3 – (A) Atividade específica de lipoxigenases e (B) Determinação dos níveis de inibidores de proteases em folhas de soja da variedade IAC-PL-1 antes e após a presença do inseto.

De acordo com a Figura 4, verificou-se que há uma correlação positiva entre o aumento na atividade de lipoxigenases e o aumento na síntese de inibidores de protease na folha, ou seja, com o aumento da atividade de lipoxigenases, ocorre também uma elevação nos níveis de inibidores na folha. Esse aumento seria, portanto, uma resposta de defesa das plantas ao ataque de herbívoros, indicando o importante papel das lipoxigenases na via de ativação da produção de inibidores de proteases. Após submeterem ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner) plantas de soja de quatro variedades, Fortunato *et al.* (2007), também verificaram um aumento na

atividade específica de lipoxigenases foliares quando comparado com as plantas controle.

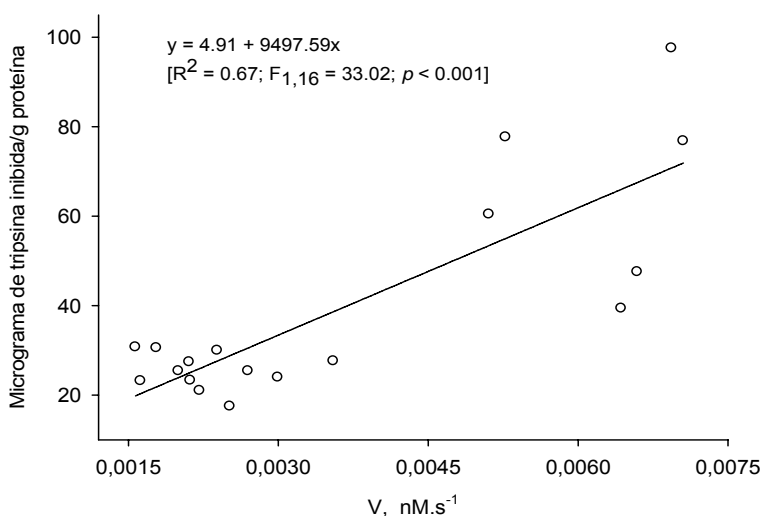


Figura 4 – Correlação entre os aumentos na expressão de enzimas lipoxigenases e de inibidores de proteases como mecanismo de defesa das plantas contra ataque de pragas e doenças.

Ferreira *et al.* (2005), em trabalhos com plantas de dois genótipos de soja, observaram, após a remoção dos tecidos reprodutivos das plantas, uma correlação entre o aumento das expressões de lipoxigenases e de inibidores de proteases.

Os resultados de aumento da atividade de lipoxigenases e de inibidores de proteases apresentados indicam um possível mecanismo de resposta da planta de soja ao ataque da lagarta da soja, passando pela Via das Lipoxigenases. Isso parece ocorrer pelo aumento da eficiência catalítica de lipoxigenases e, em seguida, pelo aumento da ação da hidroperóxido ciclase, levando à conversão dos hidroperóxidos formados em ácido 12-oxo-fitodienólico e, posteriormente, à produção de ácido jasmônico. Foi proposto que este último composto interage com um receptor de membrana, ativando a expressão de genes para inibidores de proteases (Shivaji *et al.* 2010; Farmer & Ryan, 1992). Dessa forma, com esses resultados reforça-se a hipótese de que as lipoxigenases são enzimas-chave no mecanismo de resposta de plantas de soja ao ataque de herbívoros e que o acúmulo de inibidores de proteases esteja envolvido nesse mecanismo.

O resultado da atividade proteolítica no intestino médio das lagartas da soja submetida a diferentes concentrações de berenil está demonstrado na Figura 5. Os resultados obtidos revelam que o intestino médio das larvas de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com folhas de soja tratadas com berenil 0,60 e 1,0% apresentou uma redução na atividade proteolítica próximo de 100% em comparação às larvas alimentadas com dieta controle (folhas não tratadas com berenil), mostrando que o inibidor foi eficaz na diminuição da atividade das proteases digestivas do intestino médio do inseto. As concentrações de berenil testadas provavelmente foram suficientes para inibir a atividade proteolítica sem provocar hiperprodução das enzimas digestivas, uma vez que os valores de atividade proteolítica apresentam-se próximos a zero (Figura 5). Pilon *et al.* (2006) observaram aumento da atividade proteásica em lagartas de *Anticarsia gemmatalis* quando estas ingeriram altas concentrações do inibidor de proteases benzamidina em dieta artificial. E esse aumento na atividade proteásica nas lagartas da soja tratadas com altas doses de benzamidina, como uma tentativa de adaptação visando contornar os efeitos do inibidor (Pilon *et al.*, 2006) indica que os inibidores de proteases que ocupam apenas o sítio S1' do centro ativo da enzima não têm a mesma eficiência inibitória que o berenil, que ocupa além do subsítio S1' (Oliveira, *et al.*, 1993), o subsítio de ativação secundária S2'. É conhecido que, ao serem ingeridos, os inibidores de proteases inibem a atividade das enzimas proteolíticas no intestino médio dos insetos, reduzindo assim a quantidade de proteína digerida, e induzindo à hiperprodução das enzimas digestivas, o que resulta em deficiência de aminoácidos no organismo (Shulke & Murdock, 1983, Oliveira *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2010). Moreira (2007), semelhantemente, verificou uma diminuição na atividade proteásica do intestino de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com dieta artificial contendo berenil. Marinho (2010), alimentando larvas de *Thyriniteina arnobia* com folhas de eucalipto tratadas com diferentes doses de berenil, verificou que a dose 0,09% foi suficiente para inibir a atividade proteolítica no intestino médio do inseto.

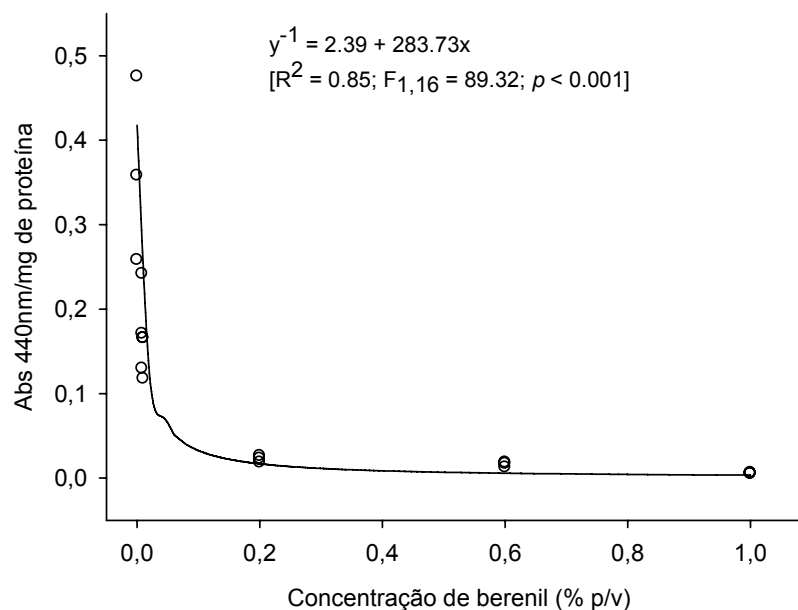


Figura 5 – Atividade proteolítica do extrato do intestino de lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com plantas de soja IAC-PL-1 pulverizadas com inibidor de protease berenil nas concentrações de 0,0; 0,008; 0,010; 0,2; 0,60 e 1,0 % (p/v)

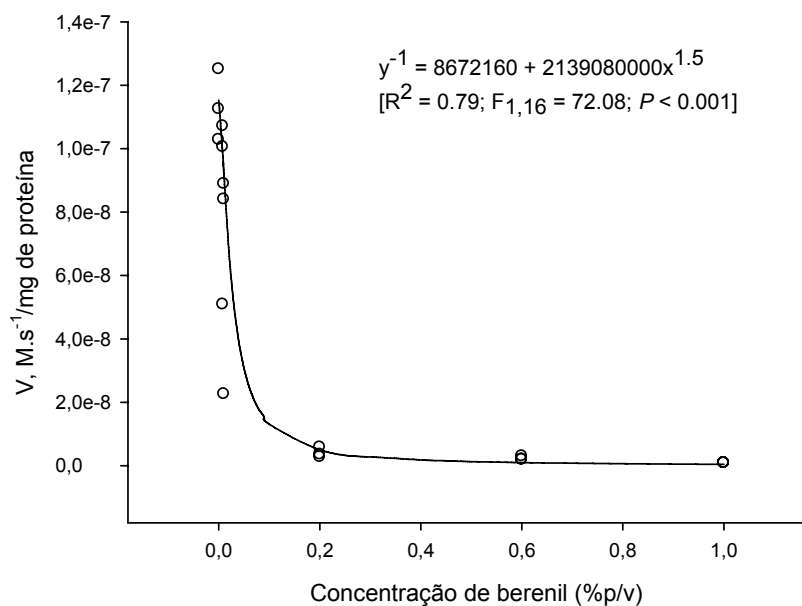
Portanto, a utilização do inibidor de protease berenil se mostrou eficiente na diminuição da atividade proteolítica da lagarta da soja, a qual não foi capaz de contornar os efeitos negativos desse inibidor. Este fato mostra que um inibidor protéico, um peptídeo, ou um peptídeo mimético que ocupe os subsítios S1 e S2' do centro ativo de tripsina-*like* pode se tornar eficiente num controle de pragas como via alternativa ao uso de agrotóxico. Fornece também indicativo da natureza química dos resíduos de aminoácido que devem ocupar estes subsítios do centro ativo de serino proteases no caso de produção de plantas geneticamente modificadas.

As enzimas tripsina-*like* possuem tanto atividade amidásica quanto atividade esterásica e seus resultados estão demonstrados na Figura 6 (A) e 6 (B), respectivamente. De acordo com os resultados, podemos verificar que houve uma inibição de aproximadamente 100% das atividades amidásica e esterásica. Sendo assim, a atividade tripsina-*like* também diminuiu em presença do inibidor, como pode ser observado nos perfis das atividades amidásica e esterásica (Figuras 6 (A) e (B)). Conforme observado para a

atividade proteolítica, o comportamento das curvas das atividades amidásica e esterásica também mostra que as doses de berenil testadas foram suficientes para inibir a atividade enzimática de enzimas tripsina-*like* presentes no intestino das lagartas sem provocar hiperprodução de enzimas. Portanto, as lagartas não foram capazes de acionar qualquer mecanismo de adaptação com força suficiente para contornar os efeitos de inibição tríptica provocados pelo berenil. 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 de inibidor competitivo parabólico com o substrato (Andrade *et al.*, 1990). Moreira (2007) relatou que ao alimentar lagartas *A. gemmatalis* com dieta artificial acrescida de doses crescentes do inibidor de serino proteases berenil, observou uma diminuição na atividade tríptica do intestino médio desse inseto. De modo semelhante, Pereira *et al.*, 2005 observaram diminuição na atividade tríptica no intestino da lagarta da soja ao alimentá-la com dieta contendo benzamidina. Pilon (2008), após alimentar lagartas *Anticarsia gemmatalis* com plantas pulverizadas com o inibidor de serino proteases benzamidina, verificou queda na atividade tríptica à medida que aumentava a concentração do inibidor. Larvas de quarto instar de *Diatraea saccharalis* (broca-da-cana) alimentadas com dieta contendo um inibidor de tripsina purificado das sementes de *Adenantha pavonina* – ApTI apresentaram uma diminuição na atividade tríptica de proteases do intestino e uma diminuição das fezes sugerindo que ApTI possui efeitos anti-metabólicos quando ingerido por esse inseto (Silva, 2008). A análise bioquímica realizada no intestino de larvas do bicudo da banana (*Cosmopolites sordidus*) alimentadas com o inibidor de soja STI mostrou uma redução na atividade tripsina-*like* deste inseto em comparação com as larvas que foram alimentadas com dieta sem o inibidor. Foi observado ainda que a diminuição da atividade tripsina-*like* foi compensada pela indução de enzimas catepsina B pelo inseto (Montesdeoca *et al.*, 2005).

**(A) Atividade**

amidásica



**(B) Atividade**

esterásica

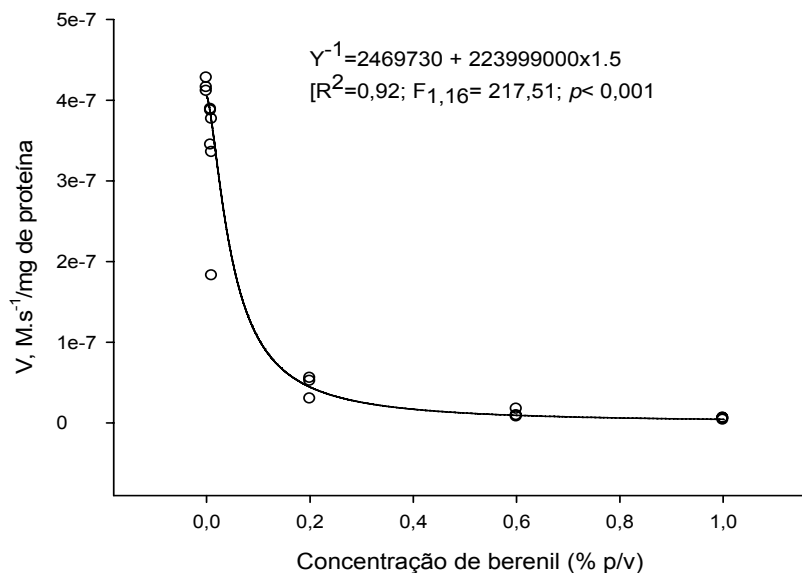


Figura 6 – (a) Atividade específica da hidrólise do substrato L-BApNA, e (b) L-TAME pelas enzimas tripsina-like no intestino médio de lagartas de *A. gemmatalis* em função da concentração de berenil pulverizado sobre plantas de soja da variedade IAC-PL-1.

Diferentes resultados foram encontrados por Marinho (2010) ao alimentar lagartas *Thyrinteina arnobia* com folhas de eucalipto tratadas com berenil na dose de 0,12%. Segundo Marinho, houve um aumento na atividade tripsina-like (amidásica e esterásica) no intestino médio do inseto, bem como

uma elevação da concentração total de proteases, o que prejudicou severamente a viabilidade das lagartas. O mesmo autor afirma que esse aumento da atividade tripsina-*like* observado no intestino das lagartas de *T. arnobia* indica uma tentativa de adaptação desses insetos à ingestão de berenil através da superprodução de enzimas que atuam na digestão do alimento ingerido. Ao adicionar o inibidor de tripsina Kunitz (SKTI) na dieta da lagarta do repolho (*Mamestra brassicae*) Chougule *et al.* (2008) verificaram que a ingestão do inibidor provocou a indução de atividade tripsina-*like* insensível ao inibidor no intestino do inseto. Entretanto, no presente trabalho não foi observada essa indução de atividade tripsina-*like* insensível ao inibidor em lagartas de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com folhas de soja pulverizadas com berenil.

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 S<sub>2</sub> (Oliveira *et al.*, 1993) podendo aumentar sua atividade através do fenômeno de ativação enzimática.

O resultado da atividade cisteíno protease está mostrado na Figura 7. De acordo com o gráfico, observa-se que não houve diferença na atividade de cisteíno proteases no intestino médio da lagarta da soja entre os tratamentos testados, isto é, a presença de berenil não induziu o aumento da atividade catalítica dessas enzimas, o que seria uma tentativa desse inseto de contornar a diminuição nas atividades proteolítica e trípica provocada pela ação desse inibidor. Esse resultado sugere que o berenil pode ter inibido a ação das cisteíno-proteases. Segundo Mendonça *et al.* (2010), uma vez que plantas de soja são particularmente ricas em inibidores de serino-proteases, particularmente inibidores de proteases tripsina-*like*, a expressão de cisteíno proteases no intestino médio da lagarta é uma adaptação potencial para contornar as defesas do hospedeiro. Trabalhos realizados com a lagarta-parda do eucalipto *Thyrintina arnobia* mostraram que houve uma diminuição na atividade específica de cisteíno-proteases em presença de berenil (Marinho, 2010).

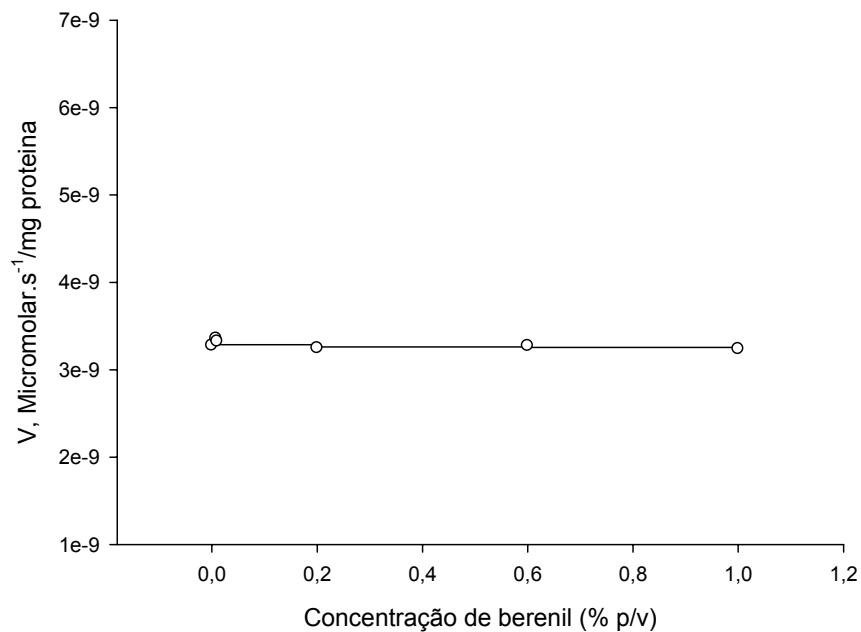


Figura 7 – Atividade cisteíno protease do extrato do intestino de lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com plantas de soja IAC-PL-1 pulverizadas com inibidor de protease berenil nas concentrações de 0,0; 0,008; 0,010; 0,2; 0,60 e 1,0 % (p/v)

De acordo com Marinho, este composto além de inibir tripsinas-*like*, inibe a ação de cisteíno-proteases que são produzidas como estratégia de defesa do inseto, uma vez que serino e cisteíno-proteases são as enzimas mais importantes na digestão de Lepidopteros. Por outro lado, Pilon (2008) verificou um aumento da atividade cisteíno-protease em intestino de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com folhas de soja pulverizadas com o inibidor de serino-proteases benzamidina. De acordo com esse autor, a lagarta da soja estaria provavelmente produzindo cisteíno-proteases em presença de inibidor de serino proteases benzamidina como forma de adaptação. Sendo inibidas as serino proteases do intestino, o inseto poderia estar produzindo mais serino proteases como também cisteíno proteases para realizar a digestão. Também Marinho (2006), trabalhando com lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* alimentadas com plantas de eucalipto e goiaba pulverizadas com benzamidina observou incremento na atividade cisteíno-proteases em resposta a inibição das enzimas tripsina-*like*.

Neste trabalho, pelas determinações de atividade enzimática, fica demonstrada a ocorrência de um efeito positivo no uso de um inibidor do tipo

bis-benzamidina, ou seja, um inibidor que ocupa o sítio de especificidade e o sítio secundário de ativação de tripsina-*like*. O berenil diminuiu a atividade de serino e cisteíno proteases mostrando sua eficiência numa possível produção de cisteíno proteases como mecanismo de defesa do inseto.

Os efeitos de berenil sobre o ganho de peso das lagartas *Anticarsia gemmatalis* também foi testado e o resultado está apresentado na Figura 8. Pode-se observar que houve uma redução no ganho de peso das lagartas alimentadas com folhas de soja pulverizadas com berenil quando comparado com o controle.

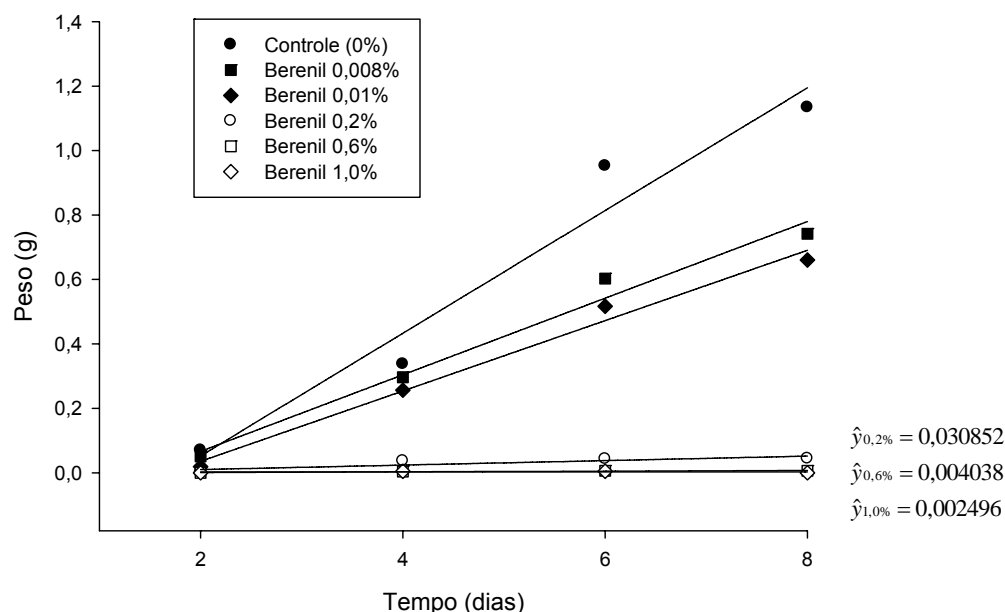


Figura 8 - Avaliação do ganho de peso de lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com folhas de soja da variedade IAC-PL-1, pulverizadas com diferentes concentrações do inibidor de protease berenil. Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão linear com duas variáveis independentes (concentração de berenil e o tempo) obtendo-se as equações  $y_{0,0\%}=0,19044x-0,3286$  ( $F_{1,3}=44,86$ ;  $R^2=0,9573$ ;  $p<0,0001$ ),  $(y_{0,008\%}=0,1189x-0,1716$  ( $F_{1,3}=104,24$ ;  $R^2=0,9812$ ;  $p=0,0095$ ) e  $y_{0,01\%}=0,1092x-0,1829$  ( $F_{1,3}=149,72$ ;  $R^2=0,9868$ ;  $p=0,0001$ ).

Ao oitavo dia do ciclo, verificou-se que as doses 0,20; 0,60 e 1,0%, de berenil testadas, diminuíram em mais de 90% o ganho de peso das lagartas da soja em comparação com o controle. No tratamento controle (folhas sem o inibidor), as larvas de *Anticarsia gemmatalis* tiveram um ganho de peso de aproximadamente 1,2 gramas no oitavo dia do ciclo, ao passo que as larvas

alimentadas com folhas pulverizadas com berenil nas maiores doses (0,20; 0,60 e 1,0% (p/v)), atingiram valores próximos de zero. Essa forte redução no crescimento e no ganho de peso das lagartas alimentadas com folhas tratadas com berenil nas doses 0,20; 0,60 e 1,0% foi observada já nos primeiros instares de desenvolvimento do inseto. Isto pode ter propiciado um menor ganho de peso na etapa final da fase larval. Com isso, uma fase larval prejudicada pode afetar o peso da pupa e prejudicar a performance dos adultos formados. Esse resultado pode ser explicado pelo efeito inibidor de berenil sobre as enzimas tripsina-*like* do intestino das lagartas, diminuindo assim a biodisponibilidade de aminoácidos essenciais à biossíntese de proteínas importantes para o seu crescimento e desenvolvimento (Macedo, 2007; Pilon, 2008). Os inibidores de protease atuam no intestino do inseto ligando-se fortemente ao sítio ativo da enzima, através da formação de um complexo bastante estável enzima-inibidor. A inabilidade para utilizar a proteína ingerida e para reciclar as enzimas digestivas resulta em uma deficiência crítica de aminoácidos, a qual afeta o crescimento, desenvolvimento e sobrevivência do herbívoro (Chougule *et al.*, 2008). Bhattacharyya *et al.* (2007), examinando os efeitos de dois inibidores de protease, o inibidor de tripsina de *Archidendron ellipticum* (AeTI) e o inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz (SBTI), adicionados na dieta do lepidóptero *Spodoptera litura*, verificaram uma diminuição no ganho de peso do inseto, sendo essa redução mais severa nos 6 primeiros dias do desenvolvimento larval. O mesmo foi observado por Silva (2008) em lagartas de *Diatraea saccharalis* tratadas com o inibidor de tripsina de *Adenantha pavonina* (ApTI). Srinivasna *et al.* (2005) mostraram que havia um decréscimo no peso médio das larvas de *Helicoverpa armigera*, bem como uma inibição das enzimas tripsinas deste inseto, quando as larvas eram alimentadas em dietas contendo o inibidor de tripsina de *Cicer arietinum*. A alimentação de *Helicoverpa armigera* por duas gerações sucessivas com dietas artificiais contendo várias doses de dois inibidores de extratos de folhas de *Capsicum annum* demonstrou alto potencial de inibição em relação ao peso e ao desenvolvimento larval desse inseto (Tamhane *et al.*, 2005).

Na avaliação do efeito do berenil na mortalidade das larvas de *A. gemmatilis*, verificou-se que as lagartas que foram alimentadas com folhas de soja pulverizadas com 0,20, 0,60 e 1,0 % (p/v) de berenil sofreram maior

mortalidade do que as lagartas alimentadas com folhas não pulverizadas com o inibidor (Figura 9), evidenciando, portanto, o efeito danoso de berenil na atividade das enzimas digestivas desse inseto, causando redução no desenvolvimento, aumentando, assim, a mortalidade das lagartas.

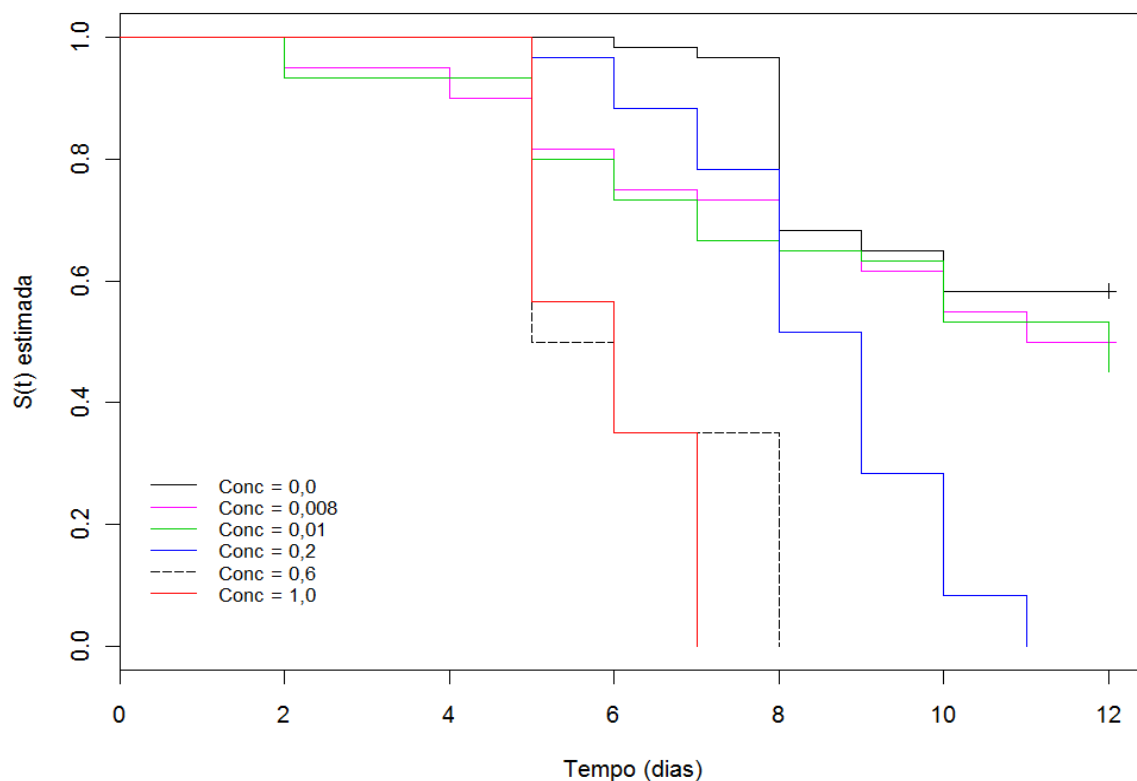


Figura 9 - Curvas de sobrevivência estimadas pelo método não-paramétrico de Kaplan-Meier para os tempos de vida da lagarta da soja em função das concentrações de Berenil.

Ainda de acordo com a Figura 9, observou-se que as lagartas que ingeriram dietas contendo 0,60 e 1,0% de berenil, chegaram a 100% de mortalidade no oitavo e sétimo dias de ciclo respectivamente. Esse resultado mostra o potencial do berenil na diminuição da sobrevivência da lagarta da soja. Na Tabela 2, observa-se que as doses de berenil testadas diferem significativamente entre si no tempo de vida das lagartas.

À exceção das doses 0,008 e 0,010% de berenil, as outras concentrações testadas diferiram do tratamento controle com relação ao tempo de vida das lagartas (Tabela 2). A ação de inibidores de enzimas digestivas pode prejudicar o crescimento do inseto, bem como sua sobrevivência e fertilidade, através da inibição da atividade das proteases no intestino do

inseto, a qual reduz a biodisponibilidade de aminoácidos essenciais (Broadway, 1995; Koiwa *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2005).

Tabela 2 - Valores de probabilidade (P-valor) referentes ao teste *Logrank*, considerando-se a hipótese das curvas de sobrevivência estimadas serem iguais

Comparação	P-valor	Comparação	P-valor	Comparação	P-valor
0 x 0,008	<b>0,1710</b>	0,008 x 0,01	<b>0,6980</b>	0,01 x 0,6	< 0,0001
0 x 0,01	<b>0,0643</b>	0,008 x 0,2	< 0,0001	0,01 x 1,0	< 0,0001
0 x 0,2	< 0,0001	0,008 x 0,6	< 0,0001	0,2 x 0,6	< 0,0001
0 x 0,6	< 0,0001	0,008 x 1,0	< 0,0001	0,2 x 1,0	< 0,0001
0 x 1,0	< 0,0001	0,01 x 0,2	< 0,0001	0,6 x 1,0	0,0084

Valores em negrito indicam que as comparações realizadas não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Outros trabalhos mostraram que os inibidores de proteases benzamidinas fornecidos em dieta artificial também aumentaram o período larval e a porcentagem de mortalidade das larvas de *A. gemmatalis* (Moreira, 2007; Pilon *et al.*, 2009). Marinho (2010) observou um efeito significativo de berenil no aumento da mortalidade de larvas de *Thyrinteina leucoceraea*. Segundo este autor, a dose de 0,09% de berenil em folhas de eucalipto causou a morte de mais da metade da população das lagartas de *T. arnobia*, segundo a curva obtida para viabilidade larval. Ramos *et al.* (2009A) testando o efeito do inibidor PFIT, um inibidor purificado das sementes de *Plathymenia foliolosa* (Mimosoideae), observaram uma redução significativa na sobrevivência de larvas do lepidoptero *Anagasta kuehniella*.

Telang *et al.*, (2009) ao testarem os efeitos de um inibidor de serino proteases em *Helicoverpa armigera* verificaram uma significativa redução na sobrevivência das larvas após terem sido alimentadas com o inibidor incorporado na dieta artificial. Larvas recém eclodidas do coleóptero bicudo da banana, *Cosmopolites sordidus*, alimentadas com dietas contendo 0,2% do inibidor de tripsina de soja STI apresentaram menores taxas de sobrevivência e reduções significativas no crescimento larval (Montesdeoca *et al.*, 2005).

O resultado do teste de preferência alimentar com chance de escolha estar mostrado na Figura 10. Pode-se verificar que as lagartas da soja tiveram

preferência pelas plantas que não receberam pulverização de berenil, e que a concentração de 0,20% causou um maior efeito de não-preferência.

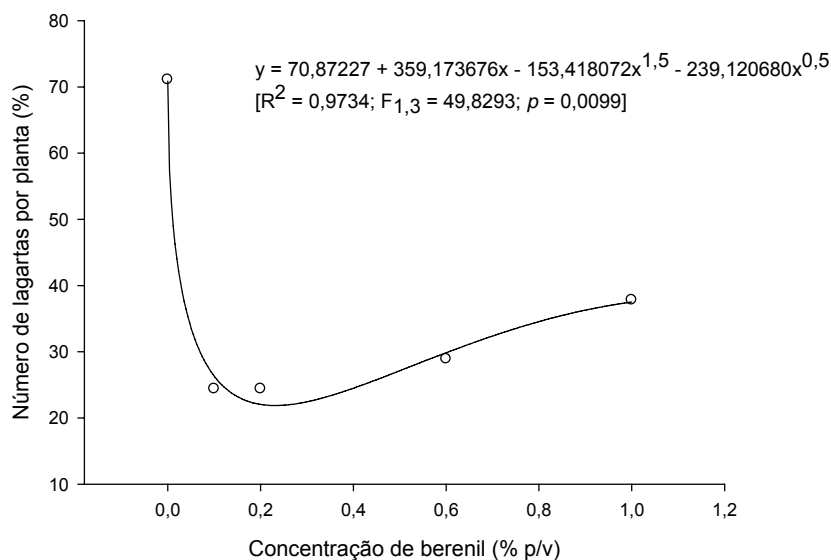


Figura 10 – Preferência alimentar de *Anticarsia gemmatalis* por plantas de soja IAC - PL -1 pulverizadas com o inibidor de protease berenil em diferentes concentrações.

A não-preferência é um tipo de resistência e ocorre quando uma planta é menos utilizada pelo inseto para alimentação, oviposição ou abrigo em relação à outra (Gallo *et al.*, 2002). Em relação à localização da planta, um ou mais compostos podem agir como repelentes, orientando o inseto em direção contrária à mesma; em relação à manutenção da alimentação ou oviposição, a ação pode ser deterrente, impedindo que o inseto continue a se alimentar ou ovipositar (Gallo *et al.*, 2002; Schoonhoven & van Loon, 2002). Quando oferecida a chance de escolha, as lagartas preferiram as plantas sem o inibidor. Berenil também se mostrou deterrente às lagartas da soja. Pilon (2008) também observou que lagartas de *A. gemmatalis* apresentaram uma não-preferência por plantas de soja que receberam aplicações de inibidores benzamidinas, sendo esse efeito mais acentuado na concentração de 0,45% do inibidor testado. De forma semelhante, o inibidor berenil mostrou ação repelente a larvas de *Thyrintaina arnobia* (Marinho, 2010). Segundo o autor, quando oferecida a chance de escolha às lagartas, essas preferiram as plantas contendo menores doses de berenil ou plantas sem o inibidor. O berenil também se mostrou deterrente a lagartas de *T. arnobia*. Em teste com chance

de escolha, as lagartas consumiram mais folhas da planta de eucalipto sem berenil, evitando as plantas que foram pulverizadas com o inibidor.

Lin e Fischer (1990) avaliaram o efeito sobre a preferência alimentar do coleóptero *Epilachna varivestis* por plantas de soja sadias e plantas atacadas pelo lepidóptero *Pseudoplusia includens*. Estes autores observaram que as plantas injuriadas por *P. includens* foram rejeitadas pelo coleóptero. Sendo assim, atribuíram que esse efeito poderia ser decorrente do acúmulo de metabólitos secundários em plantas atacadas. Veloso (2010) avaliou a atratividade e a não-preferência alimentar, com e sem chance de escolha, de lagartas recém-eclodidas de *Spodoptera frugiperda*, conhecida como lagarta-do-cartucho, em folhas de dez cultivares de soja. O autor observou que algumas das variedades testadas foram mais atrativas e de maior preferência para alimentação em teste com e sem chance de escolha, enquanto que outras apresentaram menor atratividade e não-preferência em função da presença de possíveis substâncias químicas conferindo a esta variedade resistência do tipo não-preferência. Verificou-se ainda no citado trabalho que uma das variedades testadas apresentou antibiose como mecanismo de resistência a *S. frugiperda*.

Com relação ao efeito do berenil na preferência das mariposas de *A. gemmatalis* para oviposição nas plantas de soja (Figura 11), verificou-se que a postura dos ovos ocorreu tanto nas plantas pulverizadas com o inibidor quanto nas plantas que não foram pulverizadas. De acordo com gráfico (Figura 11), as plantas pulverizadas com a maior concentração de berenil (1,0%), tiveram uma maior postura de ovos pelas mariposas. Portanto, a presença de berenil nas folhas de soja não alterou o comportamento do inseto adulto com relação à preferência por oviposição, apesar da literatura relatar que fêmeas de herbívoros lepidópteros podem escolher hospedeiros através de substâncias voláteis, nutrientes, fago-inibidores e fagoestimulantes (Joachim-Bravo et al., 2004; Eisemann e Rice, 1985; Mc Innis, 1989; Oi e Mau, 1989; Messina, 1990). Resultados semelhantes foram observados em trabalho com adultos de *Helicoverpa armigera*, que não conseguiram diferenciar entre plantas tóxicas e não tóxicas à prole ao ovipositarem (Cotter & Edwards, 2006). Testes de preferência de pouso e oviposição com insetos adultos de *Thyrinteina arnobia* mostraram que as mariposas não tiveram preferência por nenhum dos tratamentos (Marinho, 2010). Ao avaliarem o efeito do ácido pirolenhoso

extraído de três espécies arbóreas em relação à sobrevivência larval, preferência alimentar das larvas e oviposição de adultos do inseto *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: *Gelechiidae*), Bogorni *et al.* (2008) constataram que o ácido pirolenhoso não afetou o desenvolvimento, alimentação e oviposição de *Tuta absoluta*. Entretanto, Pilon (2008) observou uma rejeição das mariposas de *Anticarsia gemmatalis* para ovipositarem em plantas de soja tratadas com diferentes doses do inibidor de protease benzamidina em comparação com as plantas não tratadas.

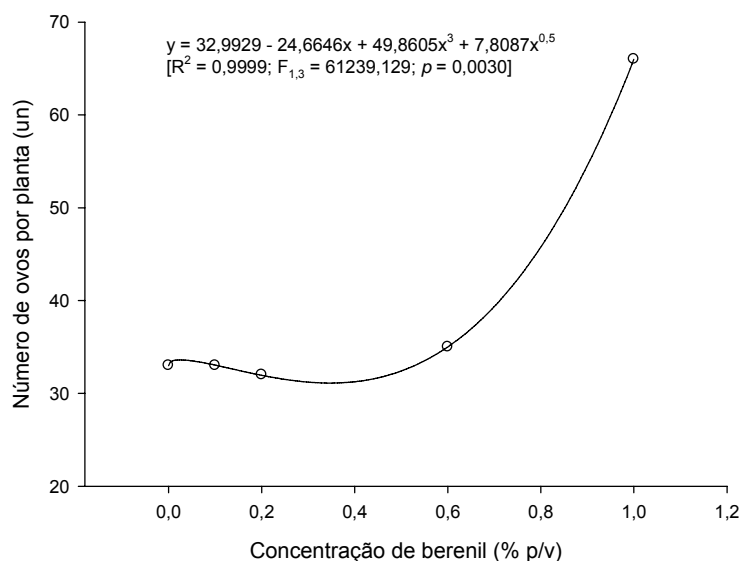


Figura 11 - Avaliação da preferência de oviposição de mariposas de *Anticarsia gemmatalis* em plantas de soja IAC-PL-1 pulverizadas com o inibidor de protease berenil em diferentes concentrações.

Segundo Pilon (2008), as fêmeas de *A. gemmatalis* podem ter detectado a presença do inibidor benzamidina sobre as folhas das plantas, não realizando a postura, uma vez que inibidores de proteases podem reduzir o desenvolvimento e performance de seus descendentes. Também Oliveira (2006) verificou que a maioria das fêmeas adultas do lepidóptero *T. leucoceraea* ovipositou em plantas de eucalipto e goiaba sem o inibidor benzamidina. Após avaliarem o efeito de extratos botânicos sobre a oviposição da mosca-branca (*Bemisia tabaci*), Quintela e Pinheiro (2009) observaram que todos os extratos botânicos testados reduziram significativamente a oviposição em relação à testemunha exceto o extrato comercial de folhas de nim (*Azadirachta indica* A. Juss). O número de ovos nas folhas diminuiu com o

aumento da concentração dos extratos botânicos. Os autores verificaram ainda que quando pulverizado na face inferior das folhas em concentrações iguais ou maiores que 1,0 %, o óleo de nim reduziu a oviposição da mosca-branca acima de 80%.

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 possibilitar 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.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T.M., Laasko, S. 1981. Lipoxygenases from soybeans. *Methods Enzymology*. 71:441-451.
- Batista, R. B.; Oliveira, M. G. A.; Pires, C. V.; Piovesan, N. D.; Rezende, S. T. & Moreira, M. A. 2002. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37(11):1517-1524.
- Bell, E., Creelman, R.A., Mullet, J.E. 1995. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92:8675-79.
- Bhattacharyya A., Leighton S. M., Babu C. R. 2007c. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 145:669–677.
- Bode, W., Huber, R. 1992. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinase. *European Journal of Biochemistry*. 204: 433-451.
- Bogorni, P. C., Pansiera, V. C., Vendramim, J. D., Ribeiro, L. P., Gonçalves-Gervásio, R. C. R., Brito, J. O. 2008. Avaliação do efeito do ácido pirolenoso de três espécies arbóreas sobre *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Bioikos, Campinas*, 22(2):109-115.
- 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.
- Browse, J., Howe, G.A. 2008. New Weapons and a Rapid Response against Insect Attack. *Plant Physiology*. 146:832–838.
- Broadway, R .M. 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *Journal of Insect Physiology*. 41(2): 107-116.
- Bruce, T. J. A., Pickett, J. A. 2007. Plant defense signalling induced by biotic attacks. *Current Opinion in Plant Biology*. 10:387–392.
- Chevreuril, L.R., Gonçalves, J.F.C., Bariani, A., Rodrigues, J.V.F.C., Pando, S.C. 2009. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. *Acta Amazonica*. 39(1):199–206.

- Chougule, N. P., Doyle, E., Fitches, E., Gatehouse, J. A. 2008. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *Journal of Insect Physiology*, 54:563–572.
- Cotter, S.C.; Edwards, O.R. 2006. Quantitative genetics of preference and performance in the noctuid moth, *Helicoverpa armigera*. *Heredity*. 96: 396-402.
- Eisemann, Ch.; Rice, Mj. 1985. Oviposition behaviour of *Dacus tryoni*: the effects of some sugars and salts. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 39:61-71.
- 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.
- Farmer, E.E., Ryan, C.A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell*, 4: 129-134.
- 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 lipoxygenases does not affect soybean defense against removal of reproductive tissue. *Bioscience Journal*. 21: 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*. 80:241-247.
- Galliard, T. 1978. Lipolytik and Lipoxygenase enzymes in plants and their action in wounded tissues. In: KAHL, G. (ed.). *Biochemistry of wounded plant tissues*. Berlin: Walter de Gruyter. 155-201.
- Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Baptista, G.C., Berti Filho, E., Parra, J.R.P., Zucchi, R.A., Alves, S.B., Vendramim, J.D., Marchini, L.C., Lopes, J.R.S., Omoto, S. 2002. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: FEALQ. 920p.
- Gatehouse, J.A.; Gatehouse, A.M.R. 2010. Genetic engineering of plants for insect resistance. [http://silver-server.dur.ac.uk/Teaching/Rehcgigl\\_Chapter/GM\\_InsectResistant\\_Plants\\_](http://silver-server.dur.ac.uk/Teaching/Rehcgigl_Chapter/GM_InsectResistant_Plants_), acessado em 25 de julho de 2010.
- Gullan, P.J., Cranston, P.S. 2007. *Os insetos: um resumo de entomologia*. 3. ed. São Paulo: Roca. 440 p.
- Hildebrand, D.F., Hamilton-Kemp, T.R., Legg, C.S., Bookjans, G. 1988. Plant lipoxygenase: occurrence, properties and possible functions. *Current Topics in Plants Biochemistry and Physiology*. 7:201-219.

- Hoffman-Campo, C.B.; Oliveira, E.B.; Moscardi, F. 1985. Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina, EMBRAPA-CNPSo, 10, Documentos, 23p.
- Holtz, A.M. 2001. Interações tritróficas afetando os surtos de pragas em Myrtaceae. 104p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- 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.
- Jimenez, A.V., 2009. As enzimas presentes no trato digestivo dos insetos: Um alvo susceptível de inibição. UnB. 99p. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular)-Universidade de Brasília.
- Joachim-Bravo, I.S., Silva-Neto, A.M. 2004. Aceitação e preferência de frutos para oviposição em duas populações de *Ceratitis capitata* (Diptera, Tephritidae). Iheringia, Zoologia. 94, n.2. Porto Alegre.
- Koiwa, H., Shade, R.E., Zhu-Salzman, K., Subramanian, L., Murdock, L.L., Nielsen, S.S., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M., 1997. Phage display can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. Plant Journal. 14:371–380.
- Lawrence, P.K., Koundal, K.R. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. Electronic Journal of Biotechnology. 5: 93-109.
- Lin, H. M., Fischer, D. 1990. Induced resistance in soybean to the Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae): comparisons of inducing factors. Environmental Entomology.19:1852-1857.
- Luo, M., Wang, Z., Li, H., Xia, K-F., Cai, Y., Xu, Z-F. 2009. Overexpression of a Weed (*Solanum americanum*) Proteinase Inhibitor in Transgenic Tobacco Results in Increased Glandular Trichome Density and Enhanced Resistance to *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. International Journal of Molecular Sciences. 10:1896-1910.
- Macedo, L. P. M., Cunha, U. S., Vendramim, J. D. 2007. Gossipol: fator de resistência a insetos-praga. Campo Dig., Campo Mourão. 2(1):34-42.
- Maheswaran, G., Pridmore, L., Franz, P., Anderson, M.A. 2007. A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants. Plant Cell Reports. 26:773–782.
- Marinho, J.S. 2010. Bioatividade de berenil, um inibidor de proteases do tipo bis-benzamidina, sobre *Thyrinteina arnobia*. UFV. 96p. Dissertação (Doutorado em Entomologia)-Universidade Federal de Viçosa.

- Marinho, J.S. 2006. Viçosa: Resposta Bioquímica de Lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* (Lepidoptera: Geometridae), Submetidas ao Inibidor de Serino-Proteases Benzamidina. UFV. 62p. Dissertação (Mestrado em Entomologia)-Universidade Federal de Viçosa.
- Mc Innis, D. O. 1989. Artificial oviposition sphere for Mediterranean fruit flies (Diptera: Tephritidae) in field cages. *Journal of Economic Entomology*, Lanham. 82(5):1382-1385.
- Mendonça, E., Oliveira, M.G.A., Visotto, L., Guedes, R.N. 2010. Midgut cysteine-proteinase activity in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* (Hübner)). *Journal Insect Science*. Aceito para publicação.
- Menezes, H. 2009. Imunidade inata e específica em plantas. Seminário: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina, PR, 30(2):195-212.
- Messina, F. J. 1990. Components of host choice by two *Rhagoletis* species (Diptera: Tephritidae) in Utah. *Journal of the Kansas Entomological Society*, Lawrence. 63(1):80-87.
- Miklos, J.A., Paradise, M.S., Toedebusch, A.S., Viegas, A. 2007. Laboratory and field evaluations of transgenic soybean exhibiting high-dose expression of a synthetic *Bacillus thuringiensis cry1A* gene for control of Lepidoptera. *Journal of Economic Entomology*. (98):577-587.
- Montesdeoca, M., Lobo, M. G., Casanas, N., Camero, A., Castanera, P., Ortego, F. 2005. Partial characterization of the proteolytic enzymes in the gut of the banana weevil, *Cosmopolites sordidus*, and effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on larval performance. *Entomologia experimentalis et applicata*. 116(3):227-236.
- Moreira, L.F. 2007. Efeito do inibidor de serino-proteases, berenil, sobre a eficiência alimentar, atividade proteolítica e desenvolvimento pós-embrionário de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). UFV. 105 p. Dissertação. (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal De Viçosa.
- Ohta, H., Ida, S., Mikami, B., Morita, Y. 1986. Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination. *Plant Cell Physiology*. 22(5): 911-918.
- Oi, D. H. & Mau, R. F. L. 1989. Relationship of fruit ripeness to infestation in "Sharwil" avocados by the Mediterranean fruit fly and oriental fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Journal of Economic Entomology*, Lanham, 82(2):556-56.
- 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, C.L. 2006. Efeito do inibidor de protease, benzamidina, no forrageamento de *Thyrinteina leucoceraea* e no seu predador *Podisus nigrispinus*. UFV. 51p. Dissertação (Mestrado em Entomologia)- Universidade Federal de Viçosa.
- Oliveira, M.G.A., Simone, S.G., Xavier, L.P., Guedes, R.N.C. 2005. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140 (B):369-380.
- Opitz, S.E.W., Müller, C. 2009. Plant chemistry and insect sequestration. *Chemoecology, Switzerland*. (19)117–154.
- Panizzi, A. R. 2006. O manejo integrado de pragas (MIP): o necessário revigoramento de uma tecnologia que deu certo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4., 200 Goiânia. Anais... Goiânia: [s.n.].
- Pereira, M.E., Dörr, F.A., Peixoto, N.C., Lima-Garcia, J.F., Dörr, F., Brito, G.G. 2005. Perspectives of digestive pest control with proteinase inhibitors that mainly affect the trypsin-like activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38:1633-1641.
- 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*. 86:23-29.
- Pilon, A.M., Oliveira, M.G.A., Pilon, F.M., Guedes, R.N.C., Oliveira, J.A., Fazollo, A. 2009. Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. *Revista Ceres*. 56(6):744-748.
- Pilon, F.M. 2008. Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de serino e cisteíno proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*. UFV, 115p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Quintela, E.D., Pinheiro, P.V. 2009. Redução da oviposição de *Bemisia tabaci* (Genn.) Biótipo B (Hemiptera: Aleyrodidae) em folhas de feijoeiro tratadas com extratos botânicos. *BioAssay*. 4:8.
- Ramos, V.S., Freire, M.G.M., Parra, J.R.P., Macedo, M.L.R. 2009a. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 152:255-261.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I.A., Estelle, M. 2009. Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*. 5(5):302-307.

- Savio, G. M., Pinotti, E. B. 2008. Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) por *baculovirus anticarsia*. Revista científica eletrônica de Agronomia (FAEF). Ano VII - Nº 13 - Jun/Periódicos Semestral.
- Schoonhoven, L.M., Van Loon, J.J.A. 2002. An inventory of taste in caterpillars: Each species its own key. Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae. 48(1): 215-263.
- Scott, I.M., Thaler, J.S., Scott, J.G. 2010. Response of a Generalist Herbivore *Trichoplusiani* to Jasmonate-Mediated Induced Defense in Tomato. Journal of Chemical Ecology. 36:490-499.
- Senthilkumar, R., Cheng, C.-P., Yeh, K.-W. 2010. Genetically pyramiding protease-inhibitor genes for dual broad-spectrum resistance against insect and phytopathogens in transgenic tobacco. Plant Biotechnology Journal. 8:65-75.
- Shivaji , R., Camas, A., Ankala, A., Engelberth, J., Tumlinson, J.H., Williams, W.P., Wilkinson, J.R., Luthe, D.S. 2010. Plants on Constant Alert: Elevated Levels of Jasmonic Acid and Jasmonate-Induced Transcripts in Caterpillar-Resistant Maize. Journal of Chemical Ecology. 36:179–191.
- Shulke, R.H., Murdock, L.L. 1983. Lipoxygenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). Environmental Entomology. 12:787-791.
- Silva, M.D. 1999. Avaliação bioquímica da Via das lipoxigenases em plantas de soja infectadas com cancro da haste. UFV. 55p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa.
- Silva, F.B., Oliveira, M.G.A., Batista, R.B., Pires, C.V., Xavier, L.P., Piovesan, N.D., Oliveira, J.A., José, I.C., Moreira, M.A. 2002. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* HUBNER.). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo. 69(1):67-74.
- Silva, F.B., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Pires, C.V., Almeida, F.T., Oliveira, J.A., Pilon, A.M., Silva, C.H.O., 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, Lavras. 28:(2)406-413.
- Silva, V. 2008. Estudo da ação do inibidor de protease de *Adenantha pavonina* sobre o desenvolvimento e atividade das proteases intestinais de lagartas de *Diatraea suchharalis* (FABR., 1794). Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, SP, 68p.

- Srinivasan, A., Giri, A. P., Harsulkar, A. M., Gatehouse J. A., Gupta, V. S. 2005. A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. *Plant Molecular Biology*. 57:359-374.
- Steppuhn, A., Baldwin, I.T. 2007. Resistance management in a native plant: nicotine prevents herbivores from compensating for plant protease inhibitors. *Ecology Letters*. 10:499-511.
- Tamhane, V. A., Chougule, N. P., Giri, A. P.; Dixit, A. R., Mohini N. Sainani, M. N., Gupta, V. S. 2005. *In vivo* and *in vitro* effect of *Capsicum annum* proteinase inhibitors on *Helicoverpa armigera* gut proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1722(2):156-167.
- Telang, M.A., Giri, A.P., Pyati, P.S., Gupta, V.S., Tegeder, M., Franceshi, V.R. 2009. Winged bean chymotrypsin inhibitors retard growth of *Helicoverpa armigera*. *Gene*. 431:80-85.
- Tomarelli, R.M., Charney, J., Harding, M.L. 1949. The use of azoalbumin as a substrate in the colorimetric determination of peptic and tryptic activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 34:428.
- Veloso, E.S. 2010. Resistência de cultivares de soja a *Spodoptera Frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). UNESP. 59p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista - São Paulo.
- Zhu-Salzman, K., Zeng, R.S. 2008. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant defense: Lessons learned from a Bruchid beetle Keyan. *Insect Science*. 15 (6): 477- 481.

## CAPÍTULO 2

**Avaliação dos aspectos bioquímicos da resposta de *Anticarsia gemmatalis*  
Hübner em diferentes cultivares de soja submetidas a tratamentos com o  
inibidor de serino protease berenil**

## RESUMO

A lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera) é considerada uma das principais pragas da cultura da soja, causando enormes prejuízos para o produtor. Os danos causados pelo ataque da lagarta associados à relevância econômica do cultivo da soja para o Brasil, motivam a busca por alternativas no controle deste inseto. 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. Devido à importância das proteases digestivas na fisiologia das larvas, o estudo de inibidores de proteases como agentes de controle dessas pragas tem recebido atenção contínua. A redução da atividade proteolítica através da ingestão de inibidores de proteases, seja por incorporação na dieta ou pelo uso de plantas geneticamente modificadas, compromete a digestão e reflete em efeitos não apenas no crescimento e desenvolvimento das larvas, mas também na fertilidade e fecundidade do adulto. Portanto, o presente trabalho teve por objetivo estudar os efeitos de inibidores de proteases sobre as proteases digestivas de larvas de *A. gemmatalis* alimentadas com plantas de soja das variedades IAC-18, padrão moderado de resistência ao ataque de insetos, IAC-24, padrão de resistência do tipo antibiose e Foscarin-31, padrão de suscetibilidade, pulverizadas com o inibidor de proteases berenil nas concentrações de 0,0; 0,60 e 1,0% (p/v). Objetivou-se também avaliar a capacidade de resposta de variedades de soja resistentes e suscetíveis ao ataque da lagarta da soja. As variedades de soja testadas responderam ao ataque da lagarta da soja com um aumento no *pool* de lipoxigenases nas folhas o que levou a uma alta produção de inibidores de protease. O berenil causou uma inibição significativa nas atividades proteolítica e triptica do intestino das lagartas nas três variedades de soja testadas. Foi observada uma diferença na atividade proteolítica das lagartas alimentadas com as três variedades tratadas com berenil, porém, todas apresentaram atividade menor que o controle. Portanto, esses dados sugerem que a utilização de inibidores de proteases possa ser uma estratégia promissora no controle de *Anticarsia gemmatalis* na

cultura da soja, devido à sua capacidade de reduzir a atividade de enzimas digestivas no intestino médio do inseto afetando o seu crescimento e desenvolvimento, podendo levá-lo à morte.

**Palavras-chave:** Lagarta da soja, trpsina-*like*, berenil, proteases, soja

## ABSTRACT

The soybean caterpillar *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera) is considered a pest of soybean, causing huge losses to the farmer. Damage caused by caterpillar attack linked to economic importance of soybean cultivation in Brazil, motivate the search for alternatives to control this insect. Soybeans respond to herbivore attack with the production of organic compounds that act on specific sites of the invading organism. By the lipoxygenase pathway, a biochemical pathway for defense of soybean to insects and pathogens, the production and release of jasmonic acid, which activates the plant defense genes that encode the production of protease inhibitors. Given the importance of digestive proteases in the physiology of the larvae, the study of protease inhibitors as agents to control these pests has received continuous attention. The reduction of proteolytic activity by the ingestion of protease inhibitors, whether by incorporation in the diet or the use of genetically modified plants, impairs digestion and reflects not only on effects on growth and development of larvae, but also on fertility and fecundity of adult. Therefore, this work aimed to study the effects of protease inhibitors on digestive proteases of larvae of *A. gemmatalis* fed soybean variety IAC-18, moderate pattern of resistance to insect attack, IAC-24, standard-type resistance and antibiosis Foscarin-31, susceptible control, treated with the protease inhibitor concentrations of berenil 0.0, 0.60 and 1.0% (w/v). We will also evaluate the responsiveness of soybean varieties resistant and susceptible to attack by the soybean caterpillar. The soybean varieties tested responded to the attack of soybean caterpillar with an increased pool of lipoxygenase in the leaves leading to a high production of protease inhibitors. The berenil caused a significant inhibition in proteolytic and tryptic activities of the gut of caterpillars in three soybean varieties tested. We observed a difference in the proteolytic activity of larvae fed on the three varieties treated with berenil, but all showed less activity than the control. Therefore, these data suggest that the use of protease inhibitors may be a promising strategy to control *Anticarsia gemmatalis* in soybean due to its ability to reduce the activity of digestive enzymes in the midgut of the insect affecting growth and development, may lead him to death.

**Keywords:** Velvet caterpillar, trypsin-like, berenil, proteases, soybean.

## 1 - INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max*) tem grande importância para o cenário econômico nacional, sendo a soja um dos principais produtos do agronegócio brasileiro, ocupando lugar de destaque na pauta de exportações do país (Sávio *et al.*, 2008; IBGE, 2010). A soja é plantada praticamente em todo território nacional e pelo levantamento da safra de 2009/2010 feito em março de 2010 pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) prevê uma produção nacional de soja de 64,56 milhões de toneladas, representando um incremento de 8,8 milhões de toneladas em relação à safra 2008/09 (CONAB, 2010).

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis*, é o principal inseto causador de danos para essa cultura. Ela atua como desfolhador, e geralmente, observa-se uma maior incidência entre o período vegetativo e o final da floração, exigindo atenção e controle rápido para não causar prejuízos econômicos (Sávio *et al.*, 2008). A *Anticarsia gemmatalis* é um inseto da ordem Lepidoptera, nativa de áreas tropicais e subtropicais das Américas, descrita pela primeira vez na Flórida em 1903 (Bárbara, 2010). No Brasil ela é encontrada em todos os locais de produção de soja e representa um risco à produção e à qualidade dos cultivos brasileiros (Praça *et al.*, 2006).

O uso mundial de agrotóxicos aumentou significativamente durante as últimas duas décadas, os quais são conhecidos por causarem uma série de problemas para o ambiente e para a saúde humana. Por isso, esforços recentes têm sido feitos na tentativa de reduzir o amplo espectro de efeitos tóxicos adicionado ao meio ambiente (Sávio *et al.*, 2008; Mills e Kean, 2010). Atualmente, o uso de proteínas entomotóxicas tem aumentado devido à crescente necessidade de se obter uma alimentação de melhor qualidade e uma maior proteção ao meio ambiente. As enzimas digestivas também têm sido selecionadas como alvo nos programas de controle de pragas, como já foi descrita na utilização eficaz dessas enzimas na ativação das endotoxinas do *Bacillus thuringiensis* em *Anticarsia gemmatalis* (Pereira *et al.*, 2005). As toxinas Bt foram utilizadas com sucesso contra uma série de ordens de insetos, tais como Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. Nos últimos anos, diversas investigações centraram-se em outros entomotóxicos potenciais, incluindo produtos à base de algumas proteínas de defesa presentes em plantas, tais

como inibidores de enzimas digestivas e lectinas (Kant e Baldwin, 2007; Jaber *et al.*, 2010). Os efeitos negativos dessas proteínas de defesa podem se manifestar de três formas: mudanças na ingestão do alimento, mudanças pós-ingestiva e mudanças pós-digestivas. Muitos estudos têm revelado uma diminuição no crescimento de insetos e/ou sobrevivência com a expressão de produtos químicos que interferem com os efeitos pós-digestivos tais como os efeitos dos inibidores de proteases (Scott *et al.*, 2010).

Pela via das lipoxigenases, uma via bioquímica de defesa da soja a insetos e patógenos, ocorre a produção e liberação de ácido jasmônico, sendo este um ativador dos genes de defesa da planta que codificam a produção de inibidores de proteases (IPs) (Silva *et al.*, 2004; Soares e Machado, 2007; Fortunato *et al.*, 2007; Schaller, 2008). Portanto, o conhecimento das enzimas digestivas da lagarta e sua sensibilidade aos inibidores são peças fundamentais para o desenvolvimento de novos programas de controle desta praga.

O mecanismo de ação de um inibidor de proteases (IPs) baseia-se na inibição de uma proteína, via bloqueio de sua atividade proteolítica. A ingestão de inibidores de proteases pelos insetos herbívoros interfere no processo de degradação de proteínas no intestino médio (mesêntero). Portanto, os inibidores são considerados agentes anti-metabólicos, pois levam a uma deficiência protéica nos insetos. A atividade antibiótica dos inibidores de proteases é atribuída à sua interferência na digestão protéica, o que diminui a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução (Broadway, 1995; Silva Filho, 2000; Macedo *et al.*, 2007; Migliolo *et al.*, 2010).

Outra hipótese, é que os inibidores afetem o desenvolvimento de forma indireta, via um mecanismo de “feedback”, que levaria a um aumento da produção de proteases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos disponíveis. Estes seriam deslocados para síntese de proteases em detrimento de outras proteínas essenciais (Broadway, 1995; Silva Filho, 2000; Macedo *et al.*, 2007). Os inibidores têm como características o fato de serem extremamente resistentes à proteólise e permanecerem ativos em condições diversas de pH intestinal, além de já terem sido identificados

inibidores contra praticamente todas as classes de proteases descritas (Jongsma e Boulter, 1997).

Evidências da função de defesa dos inibidores de proteases em plantas têm sido comprovadas em diversos experimentos, ressaltando a importância destes como candidatos ao uso nas estratégias de controle de insetos. A incorporação de inibidores de proteases na dieta foi capaz de retardar o crescimento de *Bruquídeos subfasciatus* e *Callosobruchus maculatus*; díptero *Ceratitis capitata*; lepidópteros *Interpunctella Plodia* e *Alabama argillacea*, com 74,5%, 70,0%, 70,3%, 48,7% e 13,6% de inibição, respectivamente (Oliveira *et al.*, 2007), de *Mamestra brassicae* (Chougule *et al.*, 2008) e de inibir em até 85% a atividade de serino proteases no intestino médio de *Trichoplusia ni*, *Lymantria dispar* e *Helicoverpa zea* (Broadway, 1995).

A benzamidina é uma amida aromática e um 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 S1) 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 S1 (Mares-Guia e Shaw, 1965; Mares-Guia *et al.*, 1981, Oliveira *et al.*, 1993). Estudos realizados com benzamidina em dieta artificial de *Anticarsia gemmatalis* e sobre folhas de eucalipto oferecidas a *Thyrinteina leucoceraea* indicaram rápida adaptação destas lagartas ao inibidor de proteases (Pilon *et al.*, 2006; Marinho, 2006). Existem inibidores que são capazes de ocupar outros sub-sítios do centro catalítico da tripsina, ao contrário da benzamidina que ocupa apenas o sub-sítio S1 (Mares-Guia *et al.*, 1981; Oliveira *et al.*, 1993), e desta forma, possivelmente esses IPs sejam mais promissores no controle de lagartas. O berenil apresenta uma ligação diazo-amino entre dois anéis benzamidínicos e comporta-se como um inibidor competitivo parabólico da tripsina (Junqueira *et al.*, 1992; Oliveira *et al.*, 1993). O inibidor bis-benzamidina, além de se ligar ao centro ativo da tripsina como inibidor competitivo, liga-se ao sítio ativo secundário da enzima causando um comportamento parcialmente competitivo com o substrato (Oliveira *et al.*, 1993).

Com base nestas informações, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os parâmetros bioquímicos de resposta de *A. gemmatalis* após serem alimentadas com plantas de três cultivares de soja pulverizadas com o inibidor de serino protease berenil bem como a capacidade de resposta de variedades soja resistentes e suscetíveis ao ataque dessa praga, com a finalidade de esclarecer o processo envolvido no mecanismo de interação bioquímica inseto-planta.

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos relatados nesta tese foram realizados no Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária – BIOAGRO e no laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos Prof. Marcos Luiz dos Mares Guia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa.

### 2.1. Criação da Lagarta da Soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner)

Ovos de *Anticarsia gemmatalis* foram obtidos do Centro Nacional de Pesquisa da Soja (CNPSo), Londrina, Paraná, e mantidos no Laboratório de Criação de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, a  $26 \pm 2$  °C de temperatura,  $70 \pm 10$  % de umidade relativa. A lagarta da soja apresenta ciclo biológico com duração entre três e quatro semanas e seus adultos foram obtidos de pupas colocadas em placas de Petri no interior de gaiola telada de dimensões 50 x 50 cm, revestida internamente com folhas de papel sulfite, A4.

Após o quarto dia, as mariposas emergiram, e foram alimentadas com solução nutritiva composta de mel (10,5 g), cerveja (350 mL), sacarose (60 g), ácido ascórbico (1,05 g), nipagin (1,05 g) e água (1000 mL), embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de Petri.

A postura de *A. gemmatalis* ocorreu após o terceiro dia, na superfície do papel que reveste internamente a gaiola. Estas folhas de papel foram retiradas e cortadas em tiras de 2,5 cm de largura x 10 cm de comprimento e

colocadas em copos plásticos de 500 mL com um orifício circular na tampa de, aproximadamente, 2 cm onde foi acoplada uma tela de filó. Estes copos foram então transferidos para uma câmara climatizada a 25 °C, com umidade relativa de 60 ± 10 % e fotoperíodo de 14 horas mantido por “timers” acoplados a lâmpadas tipo luz-do-dia.

Depois do segundo ou terceiro dia após observar a eclosão dos ovos, iniciou-se a alimentação das larvas de *A. gemmatalis* baseada na metodologia de Hoffman-Campo *et al.* (1985), colocando-se um cilindro de dieta artificial em cada copo plástico.

## 2.2. Preparo da dieta artificial

A dieta artificial foi preparada utilizando diversos ingredientes e sua composição está de acordo a apresentada no Quadro 1.

Tabela 1 – Composição da dieta artificial utilizada no experimento com lagartas (g/100g de mistura).

<b>Ingredientes</b>	<b>Composição (g/100g de mistura)</b>
Feijão mulatinho (cozido) <sup>1</sup>	4,80
Levedo de cerveja <sup>1</sup>	2,40
Germe de trigo <sup>1</sup>	3,80
Proteína de soja <sup>1</sup>	3,80
Caseína <sup>2</sup>	1,90
Agar-agar <sup>3</sup>	1,34
Ácido ascórbico <sup>2</sup>	0,23
Ácido sórbico <sup>4</sup>	0,11
Solução vitamínica <sup>1</sup>	0,38
Nipagin <sup>4</sup>	0,19
Formol 40% <sup>1</sup>	0,23

<sup>1</sup> Obtido no comércio de Viçosa, MG

<sup>2</sup> Obtido da Sigma

<sup>3</sup> Obtido da Isofar- Indústria comércio de produtos químicos Ltda

<sup>4</sup> Obtido da Synth- LabSynth produtos para laboratório Ltda

Todos os ingredientes, exceto ácido ascórbico, ácido sórbico, nipagin, formol e solução vitamínica, foram processados e misturados, nesta ordem, com o auxílio de um liquidificador industrial. A mistura foi autoclavada por 1 hora à pressão de 1,5 kgf/cm<sup>2</sup>, em seguida foi transferida novamente para o liquidificador, misturada e adicionada de ácido ascórbico (6 g), ácido sórbico (3 g), nipagin (metilparabeno) (5 g), formol 40% (6 mL) e 10 mL de solução vitamínica composta por niacinamida (1mg), pantoenato de cálcio (1mg), tiamina (0,25 mg), riboflavina (0,50 mg), piridoxina (0,25 mg), ácido fólico (0,25 mg), biotina (0,02 mg), inositol (20 mg), água (1 L); até formar uma pasta homogênea que foi transferida ainda quente para recipientes plásticos com tampa. A pasta obtida foi resfriada em câmara germicida acondicionada com luz ultravioleta e conservada a 4 °C.

### **2.3. Obtenção das mudas de soja**

Foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), das variedades Foscarin-31, padrão de suscetibilidade ao ataque de insetos, IAC-18, portadora de resistência moderada a insetos e IAC-24, portadora de resistência do tipo antibiose ao ataque de insetos, obtidas do Instituto Agrônomo de Campinas – IAC, São Paulo. As mudas foram cultivadas até o estágio V3 sem histórico de aplicação de qualquer produto foliar. Foram obtidas três plantas de soja em vaso com capacidade para 4,0 kg de solo, em condições de casa de vegetação. As mudas foram pulverizadas com berenil nas concentrações 0,0; 0,60 e 1,0 % (p/v). Os três primeiros trifólios de cada planta foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a – 80 °C, para a avaliação da atividade de lipoxigenases e da produção de inibidores de proteases.

### **2.4. Aplicação do inibidor nas plantas**

Foram utilizadas seis gaiolas com dimensões de 1m x 1m x 1m, recobertas com organza. Cada gaiola continha 6 vasos, cada vaso 3 plantas, portanto 18 mudas de soja, sendo cada gaiola correspondente a um tratamento (Figura 1). As plantas dos tratamentos testes foram pulverizadas com uma solução

aquosa contendo Triton X-100 0,01 % (v/v) e acrescentada do inibidor de proteases berenil nas concentrações de 0,00, 0,60 e 1,0 % (p/v). A pulverização das mudas de acordo com os tratamentos foi realizada com as lagartas nas folhas, como ocorre em uma aplicação no campo. As mudas foram pulverizadas, utilizando-se um pulverizador plástico de pressão manual, contendo 150 mL da solução do inibidor.

De cada gaiola, depois de transcorrido 24 h da pulverização, foram retiradas 18 lagartas dos 6 vasos testes. As mudas retiradas não retornaram às gaiolas. As lagartas retiradas tiveram os intestinos extraídos como descrito no item 2.6 para obtenção do extrato enzimático para posteriores análises.

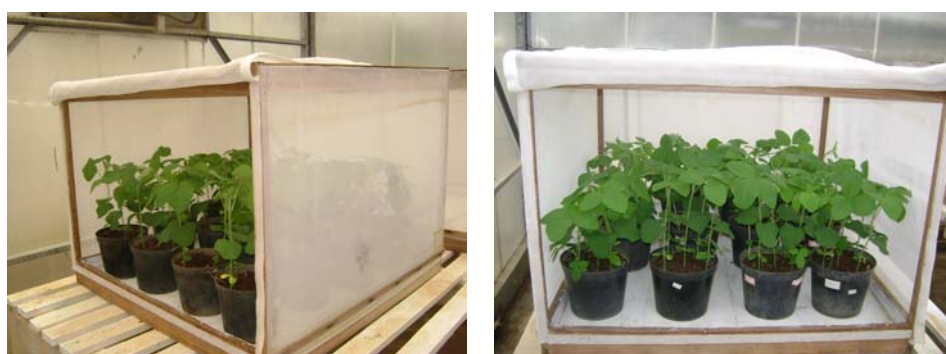


Figura 1 – Foto das gaiolas com as plantas de soja.

## 2.5. Ataque da lagarta da soja

Plantas de soja no estágio V3 de desenvolvimento foram submetidas ao ataque de lagartas de 4<sup>o</sup> ou 5<sup>o</sup> instar (instares em que a lagarta se alimenta mais vorazmente). Em cada vaso contendo 3 plantas de soja, foi colocada uma lagarta no primeiro trifólio de cada planta. Após 24 horas, os três folíolos da primeira folha trifoliolar foram coletados e as lagartas removidas nesse período para retirada do intestino médio para posteriores análises. As folhas foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em – 80 °C para posterior obtenção dos extratos foliares.

## **2.6. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio das lagartas**

Os intestinos médios foram extraídos após dissecação das lagartas em presença de 1 mL de HCl  $10^{-3}$  M a 4 °C e acondicionados em tubos plásticos de 2 mL. Os extratos enzimáticos foram obtidos pelo rompimento celular resultante de nove ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria 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.

## **2.7. Determinação da 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).

## **2.8. Determinação da atividade protéica de proteases do intestino médio de *A. gemmatalis***

As atividades proteásicas foram determinadas 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 50µL de substrato e 60 µL de extrato enzimático, sendo 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 homogeneizadas em vortex e mantidas em repouso, no gelo, por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas 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 de ensaio contendo 280 µL de NaOH 1 M. A atividade foi determinada no sobrenadante com leituras de absorbâncias a

440 nm. O experimento foi realizado em uma série de três repetições e em triplicatas.

### **2.9. Determinação da atividade amidásica tripsina-like de proteases do intestino médio de *A. gemmatalis***

A atividade amidásica foi realizada pelo método descrito por Erlanger *et al.* (1961), utilizando-se o substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil-p-nitroanilida (L-BApNA), substrato para enzimas tripsina-*like* na concentração final de 1,2 mM a 25°C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl<sub>2</sub>. A mistura de reação consistiu de 0,5 mL do substrato, 0,5 mL do tampão e 10 µL do extrato enzimático. O branco foi composto de 0,5 mL do substrato e 0,5 mL do tampão.

As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, pela medida da absorvância a 410 nm em função do tempo (2,5 minutos), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 (M<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>) para o produto. Os experimentos foram realizados em uma série de três repetições e em triplicatas.

### **2.10. Determinação da atividade esterásica de tripsina-like do intestino médio de *A. gemmatalis***

A atividade esterásica foi realizada pelo método descrito por Hummel (1959), utilizando-se o substrato N-α-p-tosil-L-arginina metil éster (L-TAME) na concentração final de 0,1 mM a 25 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM CaCl<sub>2</sub>.

As velocidades foram determinadas através da medida da absorvância a 247 nm em função do tempo (2,5 minutos), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 540 M<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições e em triplicatas.

### **2.11. Determinação da atividade cisteíno protease do intestino médio de *A. gemmatalis***

A determinação da atividade de cisteino-proteases foi realizada adaptando-se o método de Erlanger *et al.* (1961) com adaptações de Mendonça *et al.*, 2010. Foram pipetados 0,5 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M contendo Dietiltiotriol 1 mM, pH 8,0, 10 µL do extrato enzimático do intestino e 0,1 mL do inibidor benzamidina 10 mM. Essa mistura reacional foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado 0,5 mL do substrato L-BApNA na concentração final de 1,2 mM. O branco foi composto de 0,5 mL do substrato, 0,5 mL do tampão e 0,1 mL do inibidor.

As velocidades foram determinadas através da medida da absorvância a 410 nm em função do tempo (2,5 minutos), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de  $8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições e em triplicatas.

### **2.12. Obtenção do extrato foliar**

O preparo do extrato bruto foi realizado a  $4^\circ \text{C}$ , de acordo com o método descrito por Ohta *et al.* (1986). As folhas de soja, após terem sido pesadas, foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e trituradas em almofariz. O pó obtido foi macerado em tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5, na proporção de 1:3 (p/v) e em seguida centrifugado a  $17.200 \text{ g}$  por 60 minutos a  $4^\circ \text{C}$ , segundo metodologia modificada por Batista *et al.* (2002). O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para as determinações da concentração de proteína total, avaliação da atividade de lipoxigenases e da concentração de inibidor de proteases.

### **2.13. Determinação da atividade de lipoxigenases**

A atividade de lipoxigenases sobre o ácido linoléico foi determinada de acordo com o método de Axelrod *et al.* (1981), determinando-se a formação do sistema de duplas ligações conjugadas no hidroperóxido formado através do

aumento da absorvância a 234 nm. O substrato foi preparado a partir de uma solução-estoque de linoleato de sódio 10 mM, utilizando-se ácido linoléico, aproximadamente 99 % (SIGMA), como se segue: a um erlemeyer envolvido por papel-alumínio contendo aproximadamente 10 mL de água deionizada, previamente fervida, foram adicionados 78 µL de ácido linoléico e 90 µL de Tween 20 (SIGMA). Em seguida, foi feita a homogeneização da solução com auxílio de uma pipeta automática para evitar a formação de bolhas. O clareamento da solução foi obtido adicionando-se gotas de solução de hidróxido de sódio 0,5 M. Após o clareamento, a solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, envolvido por papel-alumínio, e o volume foi completado com água deionizada fervida. A solução-estoque de linoleato de sódio foi armazenada a – 20 °C em tubos de plástico de 1 mL, envolvidos em papel-alumínio.

A atividade de lipoxigenases foi avaliada na mistura de reação contendo uma solução de 1,0 µL do extrato bruto foliar e 4,0 µL da solução-estoque de linoleato de sódio em 1,0mL de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5. A absorvância da mistura de reação foi determinada de 30 em 30 segundos, a 234 nm, por períodos de 2,5 minutos. O branco consistiu das mesmas quantidades de substrato e tampão. As velocidades foram obtidas utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 25.000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para o produto formado.

#### **2.14. Determinação de inibidores de proteases.**

A presença de inibidores de proteases no extrato bruto foliar foi determinada utilizando-se tripsina bovina. A atividade tríptica, na presença de inibidores, consistiu no seguinte procedimento analítico: a) para a análise do teste: 50 µL do extrato; 500 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio, e 50 µL da solução de tripsina 4,7 x 10<sup>-5</sup> M foram adicionados em um tubo de ensaio; b) para o controle da enzima foram adicionados, em outro tubo de ensaio, 550 µL de Tris-HCl 0,1M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 50 µL da solução de tripsina 4,7 x 10<sup>-5</sup> M. c) para o Branco: 600 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio

Essa mistura contida em ambos os tubos (teste e controle da enzima, respectivamente) foi incubada por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após transcorrido o tempo de incubação, 500 µL da mistura de incubação, do teste e do controle, foram retirados e adicionados a outro tubo com 500 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 500 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM. A absorvância da solução foi determinada a 410 nm durante 2,5 minutos de reação. As análises foram feitas numa série de três repetições. Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com a seguinte equação:

$$\text{mg de tripsina inibida/grama de proteína} = \frac{A \times B}{C \times 1.000 \times P}, \text{ em que:}$$

A = absorvância a 410 nm do controle – absorvância a 410 nm da amostra;

B = diluição da amostra;

P = concentração, em g/mL, de proteína dos extratos; e

C = fator de tripsina, ou seja, o produto da atuação de 1 µg de tripsina ativa sobre o substrato L-BApNA tem uma leitura de absorvância de 0,019 a 410 nm (Kakade *et al.*, 1974).

### 3 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os modelos de regressão para atividade enzimática foram testados desde os mais simples (linear e quadrática) para os modelos alternativos de complexidade crescente (modelos de pico não-linear). A escolha do modelo foi realizada com base no aumento do coeficiente de determinação ajustado (adj. R<sup>2</sup>) em relação à complexidade do modelo, relativa simplicidade e altos valores de F (e quadrados médios), utilizando 2DTableCurve (SPSS, 2000).

### 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2, observando as variedades antes do ataque e após o ataque de *Anticarsia gemmatalis*, verifica-se que houve um aumento significativo no *pool* de lipoxigenases, correspondendo aproximadamente aos percentuais de 78, 81 e 87% para IAC-24, IAC-18 e Foscarin-31 respectivamente, após o

ataque do inseto. A baixa atividade de lipoxigenases observada antes do ataque da lagarta da soja, para todas as variedades seria explicado pela não ocorrência de indução da ativação da rota de defesa, uma vez que não houve injúria na planta. Esses resultados permitem inferir que o aumento observado para a atividade específica de lipoxigenases após a injúria ocorreu devido a ativação da via de lipoxigenases, como uma resposta ao ataque da lagarta, como um mecanismo de defesa da planta ao ataque do inseto o que pode resultar no aumento de ácido jasmônico, aldeídos e inibidores de proteases. Fortunato *et al.* (2007), após submeterem plantas de soja de quatro genótipos da variedade CAC-1 ao ataque da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*), verificaram um aumento na atividade de lipoxigenases foliares quando comparado com o controle (plantas não atacadas). Silva *et al.* (2002) também verificaram uma alteração no *pool* de lipoxigenases foliares de dois genótipos da variedade de soja IAC-100 após o ataque da lagarta da soja. Após submeterem plantas de duas variedades de soja à injúria mecânica, Vieira *et al.*, (2001) observaram um aumento na atividade de lipoxigenases em comparação com as plantas não injuriadas.

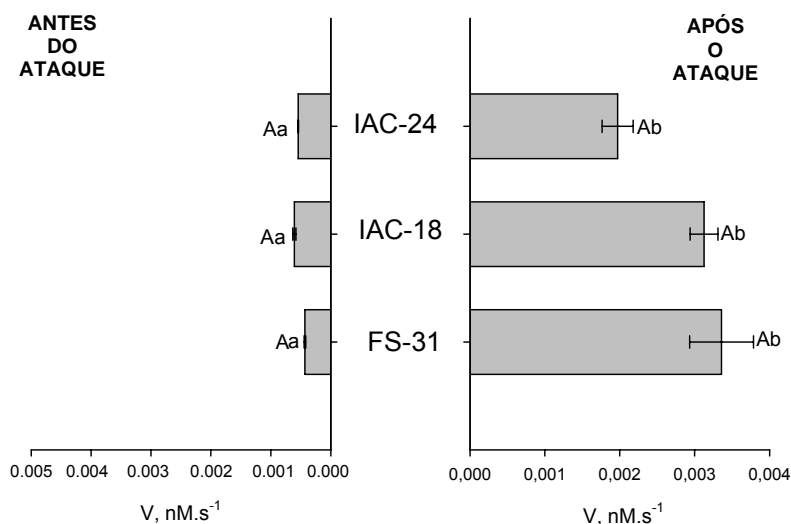


Figura 2- Histograma da atividade específica de enzimas lipoxigenases em folhas de soja das variedades IAC-24, IAC-18 e Foscarin-31 antes e após a presença do inseto.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na horizontal, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na vertical, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Ainda na Figura 2, quando se compara a resposta ao ataque da lagarta da soja entre as variedades, observa-se que não houve diferença estatística quanto ao aumento na atividade específica de lipoxigenases, ou seja, tanto a variedade resistente (IAC-24) e moderadamente resistente (IAC-18) quanto a variedade suscetível (Foscarin-31) responderam de modo semelhante ao ataque da lagarta. Esse resultado sugere que o mecanismo de resistência de IAC-18 e IAC-24, portadoras de resistência moderada e do tipo antibiose (Miranda *et al.*, 2003; Fugi *et al.*, 2005) ao ataque de insetos respectivamente, não acarreta simplesmente em aumento da atividade de lipoxigenases, mas também numa maior eficiência dessas enzimas na síntese de inibidores de proteases.

De acordo com a Figura 3, ao se comparar as variedades antes e após o ataque, verifica-se que houve um aumento no teor de inibidor de proteases foliares de 91% (IAC-24), 85% (IAC-18) e 95% (Foscarin-31) após o ataque da lagarta da soja. Mesmo tendo havido diferença entre as variedades, verifica-se que todas responderam com um aumento nos níveis de inibidor de proteases após o ataque da lagarta da soja.

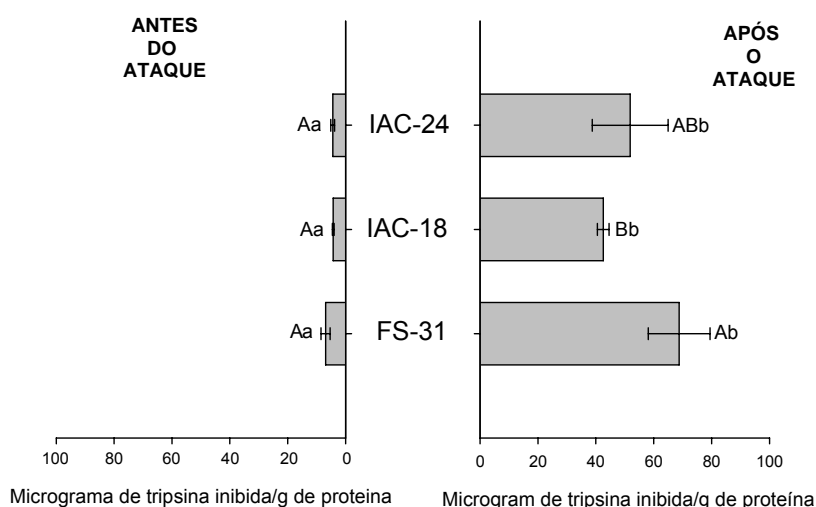


Figura 3 - Determinação dos níveis de inibidores de proteases em folhas de soja das variedades IAC-24, IAC-18 e Foscarin-31 antes e depois da presença do inseto.

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na horizontal diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na vertical, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Esse aumento nos níveis de inibidores de proteases nas folhas das três variedades está relacionado com o aumento da atividade de lipoxigenases observado na Figura 2, que leva a um aumento da produção de inibidores de proteases. Em outros trabalhos com soja, também foi observado um aumento nos níveis de inibidores de proteases após as plantas terem sofrido injúrias mecânica e por insetos (Vieira *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004; Fortunato *et al.*, 2007). Rickauer *et al.* (1997) demonstraram que a indução da síntese de inibidores de proteases em células de folha de tabaco por ácido jasmônico era precedida por um aumento na atividade de lipoxigenases.

Em folhas, ferimentos resultantes do ataque de insetos levam ao aparecimento de sinais que ativam a síntese de inibidores de proteases no local do ferimento, como também em folhas mais distantes. Vários compostos para sinal sistêmico têm sido sugeridos, incluindo ácido jasmônico, oligogalacturonídeos, ácido abscísico, sistemina e sinais elétricos (Farmer *et al.*, 1994). Green & Ryan, (1972) mostraram que ferimentos em folhas de batata de tomate pelo inseto *Leptinotarsa decemlineata* ou suas larvas induzem a um rápido acúmulo de inibidores de proteases por todos os tecidos aéreos das plantas.

Comparando o aumento nos níveis de inibidores de proteases nas três variedades (Figura 3), verifica-se uma maior produção de inibidores de proteases para Foscarin-31 e IAC-24, consideradas padrão de suscetibilidade e de resistência do tipo antibiose ao ataque de insetos respectivamente (Miranda *et al.*, 2003; Fugi *et al.*, 2005), em relação a IAC-18, padrão de resistência moderada a insetos (Lourenção *et al.*, 2000). Pode-se sugerir que a semelhança no aumento dos níveis de inibidores de proteases observado na Figura 3 para as variedades Foscarin-31 e IAC-24 parece indicar que o mecanismo de resistência de IAC-24 não passa pelo aumento da produção de inibidores de proteases como resposta da planta ao ataque de insetos, mas pela síntese de outras substâncias entomotóxicas que atuam afetando os aspectos biológicos e bioquímicos do inseto, uma vez que Foscarin-31, mesmo sendo suscetível ao ataque de insetos, apresentou alta produção de inibidores de proteases após o ataque da lagarta. Trabalhos realizados por Fugi *et al.*, (2005), mostraram que a variedade IAC-24 é portadora de resistência do tipo antibiose a insetos desfolhadores e sugadores. Os autores verificaram que

essa variedade provocou efeitos deletérios na biologia da lagarta da soja, proporcionando baixa viabilidade das fases larval, pupal e de ovo, provocando deformação de adultos e diminuição do número de ovos por fêmea. A antibiose, considerada um tipo de resistência da planta, caracteriza-se pelos efeitos deletérios da planta sobre o inseto, provocando principalmente alterações no seu desenvolvimento. Os principais efeitos da antibiose são: mortalidade das formas jovens e na transformação para adulto, redução do tamanho, peso e fecundidade dos indivíduos, alteração da proporção sexual e no tempo de vida (Painter, 1951; Kogan e Ortman, 1978).

Por sua vez, a variedade IAC-18 produziu uma quantidade menor de inibidores de proteases em comparação com a variedade Foscarin-31. E sendo considerada uma variedade de resistência moderada ao ataque de insetos em relação à Foscarin-31, padrão de suscetibilidade ao ataque de insetos, esse resultado pode estar indicando que IAC-18 tenha como mecanismo de defesa a produção de inibidores de proteases mais eficientes na inibição da atividade de enzimas digestivas no intestino do inseto, já que se sugere que a atividade de lipoxigenases nas plantas dessa variedade seja mais eficiente na produção de inibidores de proteases diferenciados. Dunse *et al.* (2010) observaram que um inibidor de serino proteases multidomínio de batata tipo II (NAPI) é produzido em níveis elevados nos tecidos reprodutivos femininos de tabaco ornamental *Nicotiana glauca* após a planta sofrer injúrias por insetos. Segundo esses mesmos autores, os domínios inibitórios individuais de NAPI inibiram as principais classes de enzimas digestivas, tripsina e quimotripsina, do intestino médio de larvas de lepidópteros pragas.

Os resultados da atividade proteolítica no intestino das lagartas *A. gemmatilis* alimentadas com plantas das variedades Foscarin-31, IAC-18 e IAC-24 estão mostrados na Tabela 1. Comparando-se as variedades no tratamento controle (plantas não pulverizadas com berenil), pode-se observar que houve diferença quanto à atividade proteolítica. A atividade proteolítica do intestino médio das lagartas que foram alimentadas com plantas da variedade IAC-24, padrão de resistência a insetos, não diferiu da atividade proteolítica do intestino das lagartas alimentadas com plantas da variedade Foscarin-31, padrão de suscetibilidade. Esse resultado reforça a hipótese de que o mecanismo de resistência da variedade IAC-24 não consiste no aumento dos

níveis de inibidores de proteases, mas sim na produção de outras substâncias consideradas tóxicas ao inseto que afetem a fisiologia digestiva da lagarta da soja. O aumento na atividade proteolítica no intestino das lagartas alimentadas com plantas IAC-24 pode estar relacionado ao fato de os insetos produzirem maior concentração de enzimas proteolíticas para compensar as moléculas de proteases inibidas por outras substâncias entomotóxicas presentes na variedade IAC-24 além dos inibidores de proteases (Shulke & Murdock, 1983; Broadway, 1995).

Tabela 2 – Valores médios  $\pm$  desvio-padrão para **atividade proteolítica (Abs 440 nm/mg de proteína)** do intestino médio de lagartas *Anticarsia gemmatalis* após ataque a plantas de três variedades de soja pulverizadas com diferentes concentrações do inibidor de protease berenil

Concentração Berenil	Variedade		
	FS-31	IAC-18	IAC-24
0,0	0,174 $\pm$ 0,00549 <sup>aA</sup>	0,0609 $\pm$ 0,00665 <sup>aB</sup>	0,179 $\pm$ 0,00681 <sup>aA</sup>
0,60	0,0103 $\pm$ 0,000682 <sup>bA</sup>	0,0112 $\pm$ 0,00145 <sup>bA</sup>	0,00706 $\pm$ 0,000735 <sup>bA</sup>
1,0	0,00658 $\pm$ 0,00109 <sup>bA</sup>	0,00615 $\pm$ 0,000772 <sup>bA</sup>	0,00563 $\pm$ 0,000327 <sup>bA</sup>
d.m.s*	0,00824		

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na linha, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

d.m.s: Diferença mínima significativa.

Com isso, os insetos passam a utilizar os aminoácidos biodisponíveis para a síntese de mais proteases em detrimento da síntese de outras proteínas necessárias ao seu crescimento e desenvolvimento (Broadway, 1995). A defesa da planta pode atuar como um sinal bioquímico percebido pelo inseto, bloqueando a alimentação e/ou oviposição, ou como toxina. A resistência induzida está vinculada à síntese de proteínas, as quais atuam como toxinas, ou como interruptores do metabolismo da praga (Ryan e Pearce, 1998). As plantas produzem proteínas de defesa que interrompem a aquisição de nutrientes e outros aspectos da fisiologia digestiva do inseto.

A síntese e o acúmulo de uma variedade de proteínas de reserva têm sido relacionados como proteínas de defesas desde que estas proteínas apresentem propriedades entomotóxicas tais como inibidores de proteases, lectinas, inibidores de  $\alpha$ -amilase, proteínas inativadoras de ribossomos (RIP's) do tipo 1 e 2, e glicohidrolases e canatoxina (Peumans *et al.*, 1995; Carlini *et al.*, 1997; Franco *et al.*, 2002; Garcia *et al.*, 2004; Macedo *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2007; Pilon *et al.*, 2009). Estas proteínas estão comumente nas sementes e órgãos de plantas leguminosas (Sales *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2002).

A menor atividade proteolítica observada para as lagartas alimentadas com plantas da variedade IAC-18, em comparação com a atividade proteolítica do intestino das lagartas alimentadas com Foscarin-31 e IAC-24, vem reforçar a hipótese de que IAC-18 produz inibidores de proteases muito eficientes na redução da atividade das enzimas digestivas do intestino médio do inseto. A ingestão de inibidores de proteases pelo inseto acarreta numa deficiência em aminoácidos essenciais, o que influenciará no seu crescimento e desenvolvimento, podendo eventualmente ocasionar sua morte pela inibição das proteases digestivas ou por uma hiperprodução destas enzimas, reduzindo a disponibilidade de aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas (Jongsma & Bolter, 1997; Pompermayer *et al.*, 2001). As plantas desenvolveram características extraordinárias contra as proteases dos insetos tais como o aumento da atividade do inibidor em seus tecidos, produção de um conjunto heterogêneo de inibidores ativos contra várias enzimas e de inibidores bifuncionais que são ativos contra amilases e proteases, aumento da complexidade dos inibidores com propriedades bioquímicas diferentes por meio da produção de isoinibidores (Tiffin & Gaut, 2001), além de inibidores de enzimas de insetos altamente específicos e resistentes à proteólise e ativos sob condições diversas de pH intestinal (Roy & Gupta, 2000; Falco *et al.*, 2001; Rakwal *et al.*, 2001; Christeller, 2005; Dunse *et al.*, 2010).

É conhecido que inibidores de proteases provocam efeitos deletérios no desenvolvimento de insetos (Pilon *et al.*, 2006; Moreira, 2007; Amorin *et al.*, 2008; Pilon *et al.*, 2009; Ramos *et al.*, 2009A; Marinho, 2010 ). Esses efeitos podem estar sendo potencializados no caso dos inibidores de proteases presentes nas plantas da variedade IAC-18, conforme foi sugerido no presente trabalho.

Ainda na Tabela 2, comparando-se o efeito das doses do inibidor de proteases berenil na atividade proteolítica das lagartas, pode-se verificar uma redução significativa na atividade das proteases digestivas do intestino das lagartas alimentadas com plantas das variedades Foscarin-31, IAC-18 e IAC-24 nas doses 0,60 e 1,0% quando comparadas com o tratamento controle (dose 0,0% de berenil). Foi observada uma diminuição de aproximadamente 94% na atividade proteolítica do intestino das lagartas alimentadas com plantas da variedade Foscarin-31, 82% com plantas IAC-18 e 96% com plantas IAC-24 pulverizadas com berenil na concentração 0,60%. Berenil 1,0% reduziu a atividade proteolítica no intestino das lagartas em 96% (Foscarin-31), 90% (IAC-18) e 97% (IAC-24). Portanto, berenil foi eficiente na inibição da atividade das enzimas digestivas do intestino das lagartas alimentadas com as três variedades de soja. As concentrações de berenil 0,60 e 1,0% foram semelhantes quanto ao efeito inibidor na atividade proteolítica no intestino das lagartas alimentadas com plantas das três variedades. Os resultados requerem atenção para o forte poder inibidor do berenil na atividade digestiva da lagarta da soja nas duas concentrações testadas. Os inibidores de proteases são considerados agentes antimetabólicos levando a uma deficiência protéica nos insetos. Sua ação inibitória 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 (Xavier *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005). Entre as variedades IAC-24, IAC-18 e Foscarin-31, verificou-se que o berenil, tanto na dose 0,60 quanto na dose 1,0%, diminuiu a atividade proteolítica do intestino médio das lagartas conforme está mostrado na Tabela 1. Ou seja, o berenil pulverizado sobre as plantas possibilitou à variedade considerada suscetível ao ataque de insetos, Foscarin-31 responder de forma semelhante a uma variedade considerada resistente ao ataque de insetos na diminuição da atividade digestiva da lagarta. Pilon, (2008) observou uma menor atividade proteolítica em larvas de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com plantas de soja de duas variedades pulverizadas com o inibidor sintético benzamidina em comparação com o tratamento controle. Em larvas de *Thyrintea arnobia*, alimentadas com plantas de eucalipto pulverizadas com berenil em diferentes concentrações, Marinho, (2010) observou uma diminuição na atividade proteolítica no intestino do inseto.

Pereira *et al.*, (2007) verificaram que o inibidor de serino proteases pertencente à classe Bowman-Birk extraído de sementes de *Phaseolus coccineus* (PcBBI1) reduziu em 80% a atividade proteolítica no intestino médio de larvas da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*).

A atividade dos IPs é devida a sua capacidade de formar complexos estáveis com as proteases alvos, bloqueando, alterando ou prevenindo o acesso ao sítio ativo da enzima. O berenil ocupa os sítios de especificidade (S1') e secundário de ativação (S2') do centro ativo da tripsina-*like*, e se mostrou eficiente na diminuição da atividade proteolítica da lagarta da soja, a qual não foi capaz de contornar os efeitos negativos desse inibidor.

Os resultados da atividade esterásica do intestino médio das lagartas da soja alimentadas com plantas das variedades Foscarin-31, IAC-18 e IAC-24 estão mostrados na Tabela 2. Quando se compara a atividade esterásica entre as variedades no tratamento controle, observa-se que a atividade esterásica no intestino médio das lagartas alimentadas com a variedade Foscarin-31 não diferiu da atividade esterásica no intestino das lagartas alimentadas com plantas da variedade IAC-24. Sendo assim, os resultados seguiram o mesmo comportamento observado para a atividade proteolítica (Tabela 1), com as lagartas alimentadas com plantas das variedades Foscarin-31 e IAC-24, apresentando maior atividade esterásica. Conforme sugerido para a atividade proteolítica, a alta atividade esterásica observada para as lagartas alimentadas com plantas de IAC-24 torna a reforçar a hipótese de que os efeitos de antibiose provocados pela variedade IAC-24 na lagarta não está no aumento da produção de inibidores de proteases, mas na produção de outros compostos entomotóxicos que estariam afetando a atividade digestiva no intestino médio do inseto. As lagartas alimentadas com plantas da variedade IAC-18 por sua vez apresentaram uma menor atividade esterásica quando comparada com as outras duas variedades.

Esse resultado também vem reforçar a hipótese da produção de inibidores de proteases mais potentes como mecanismo de defesa dessa variedade, afetando assim de forma negativa a atividade tripsina-*like* no intestino médio das lagartas.

A lagarta seria então prejudicada, uma vez que haveria um impedimento da quebra das proteínas no intestino do inseto de forma a reduzir a

biodisponibilidade de aminoácidos necessários para o seu crescimento e desenvolvimento.

Tabela 3 – Valores médios  $\pm$  desvio-padrão para **atividade esterásica (V, Micromolar.s<sup>-1</sup>/mg de proteína)** do intestino médio de lagartas *Anticarsia gemmatalis* após ataque a plantas de três variedades de soja pulverizadas com diferentes concentrações do inibidor de protease berenil

Concentração Berenil	Variedade		
	FS-31 x 10 <sup>-7</sup>	IAC-18 x 10 <sup>-7</sup>	IAC-24 x 10 <sup>-7</sup>
0,0	3,52 $\pm$ 0,744 <sup>aA</sup>	1,89 $\pm$ 0,194 <sup>aB</sup>	4,70 $\pm$ 0,954 <sup>aA</sup>
0,6	0,353 $\pm$ 0,132 <sup>bA</sup>	0,395 $\pm$ 0,138 <sup>bA</sup>	0,482 $\pm$ 0,0418 <sup>bA</sup>
1,0	0,224 $\pm$ 0,0816 <sup>bA</sup>	0,201 $\pm$ 0,0827 <sup>bA</sup>	0,244 $\pm$ 0,0903 <sup>bA</sup>
d.m.s* (x 10 <sup>-7</sup> )	1,38		

Médias de atividade esterásica seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na linha, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

d.m.s: Diferença mínima significativa.

Ainda na Tabela 3, entre as doses de berenil testadas (0,0%; 0,60% e 1,0%), foi observada uma eficiência de berenil na diminuição da atividade esterásica no intestino médio das lagartas alimentadas com as três variedades e nas duas concentrações testadas (0,60% e 1,0%) em comparação com o tratamento controle. Os resultados mostram que as lagartas alimentadas com plantas das variedades Foscarin-31, IAC-18 e IAC-24 não conseguiram contornar os efeitos de inibição provocados pelo berenil nas doses 0,60 e 1,0%. As doses de berenil 0,60 e 1,0% reduziram a atividade esterásica no intestino das lagartas alimentadas com plantas da variedade Foscarin-31 em aproximadamente 90 e 94%; 92 e 96% no intestino das lagartas alimentadas com plantas da variedade IAC-24 e 79 e 89% no intestino das lagartas alimentadas com plantas da variedade IAC-18 respectivamente. O berenil foi eficiente também na redução da atividade esterásica no intestino das lagartas alimentadas com plantas de variedades suscetíveis e resistentes, ou seja, esse inibidor potencializou as defesas das variedades contra o ataque de *A. gemmatalis*.

As enzimas *trispina-like* do intestino de larvas do lepidóptero *Plodia interpunctella* foram fortemente suscetíveis ao inibidor de tripsina de soja SBTI, produzindo 96% de inibição (Amorin *et al.*, 2008). Bhattacharyya *et al.* (2007) demonstraram que um inibidor de tripsina de *Archidendron ellipticum* (AeTI) diminuía significativamente a atividade de tripsina-*like* de larvas de *Spodoptera litura*, depois de alimentadas com dieta contendo 150 µM de AeTI. Gomes *et al.* (2005) demonstraram que um inibidor de tripsina de sementes de grão-de-bico (CaTI) inibiu 78% da atividade de enzimas tripsina-*like* de larvas do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis*.

Assim como foi verificado para a atividade proteolítica, as lagartas não conseguiram contornar os efeitos inibitórios de berenil na diminuição da atividade esterásica. Marinho (2010), ao alimentar lagartas de *Thyrinteina arnobia* com folhas de eucalipto pulverizadas com berenil em diferentes doses, verificou que esse inibidor foi danoso para a atividade de enzimas tripsina-*like* presentes no intestino do inseto. Quando os PIs da planta se ligam às proteases digestivas dos insetos, eles bloqueiam a digestão das proteínas, levando ao retardamento do desenvolvimento e aumento da mortalidade (Dunse *et al.*, 2010; Lwalaba *et al.*, 2010).

A avaliação da atividade amidásica no intestino das lagartas alimentadas com plantas das três variedades de soja pulverizadas com berenil nas doses 0,0; 0,60 e 1,0% está mostrada na Tabela 4.

O resultado para atividade amidásica no tratamento controle seguiu o mesmo comportamento observado para as atividades proteolítica (Tabela 1) e esterásica (Tabela 2), ou seja, não se verificou diferença na atividade amidásica para o tratamento controle (dose 0% de berenil) entre as lagartas alimentadas com plantas da variedade IAC-24 e as alimentadas com plantas da variedade Foscarin-31, sendo observado uma menor atividade amidásica para as lagartas alimentadas com plantas da variedade IAC-18.

Os resultados observados para a variedade IAC-24, por serem semelhantes ao observado para as atividades proteolítica e esterásica, vêm dar mais sustentação para a hipótese de que os efeitos de antibiose da variedade IAC-24 sobre a lagarta da soja, sejam provocados não pelo aumento da produção de inibidores de proteases, mas pela ação de outros componentes entomotóxicos presentes nas plantas dessa variedade, que estejam atuando de

forma a prejudicar o desenvolvimento e o crescimento do inseto. O resultado da atividade amidásica para IAC-18 também seguiu um comportamento semelhante ao observado para as atividades proteolítica e esterásica, sendo menor no intestino das lagartas alimentadas com essa variedade.

Tabela 4 – Valores médios  $\pm$  desvio-padrão para **atividade amidásica (V, Micromolar.s<sup>-1</sup>/mg de proteína)** do intestino médio de lagartas *Anticarsia gemmatalis* após ataque a plantas de três variedades de soja tratadas com diferentes concentrações do inibidor de protease berenil

Concentração Berenil	Variedade		
	FS-31 x 10 <sup>-8</sup>	IAC-18 x 10 <sup>-8</sup>	IAC-24 x 10 <sup>-8</sup>
0,0	4,58 $\pm$ 0,0134 <sup>aA</sup>	1,77 $\pm$ 0,108 <sup>aB</sup>	4,30 $\pm$ 1,74 <sup>aA</sup>
0,6	0,264 $\pm$ 0,0130 <sup>bA</sup>	0,110 $\pm$ 0,00214 <sup>bA</sup>	0,331 $\pm$ 0,0392 <sup>bA</sup>
1,0	0,0538 $\pm$ 0,00934 <sup>bA</sup>	0,0411 $\pm$ 0,00584 <sup>bA</sup>	0,0473 $\pm$ 0,0154 <sup>bA</sup>
d.m.s* (x 10 <sup>-8</sup> )	1,20		

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na coluna, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na linha, diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

d.m.s: Diferença mínima significativa.

É importante chamar a atenção para o poder de ação desses inibidores de proteases presentes na variedade IAC-18, tanto na atividade proteolítica geral quanto na atividade tripsina-*like* no intestino da lagarta da soja. É conhecido que as enzimas primárias da digestão em lepidóptera são as serino-proteinases, particularmente tripsinas (Terra & Ferreira, 1994; Terra *et al.*, 1996, Oliveira *et al.*, 2005), o que sugere que os inibidores de proteases produzidos pela variedade IAC-18 sejam inibidores de serino proteases, uma vez que foi observada uma menor atividade proteolítica, esterásica e amidásica para o intestino das lagartas alimentadas com IAC-18 em comparação com o intestino das lagartas alimentadas com as plantas das variedades Foscarin-31, padrão de suscetibilidade e IAC-24, portadora de resistência a insetos.

Fazendo uma comparação entre as doses de berenil testadas nas três variedades, observa-se que o inibidor reduziu de maneira significativa a

atividade amidásica no intestino das lagartas alimentadas com plantas das três variedades em aproximadamente 99% (berenil 1,0%) e 94% (berenil 0,60%) para Foscarin-31, 98% (berenil 1,0%) e 94% (berenil 0,60%) para IAC-18 e 99% (berenil 1,0%) e 92% (berenil 0,60%) para a variedade IAC-24 em relação ao tratamento controle. Verifica-se, portanto, a eficiência do berenil também na diminuição da atividade amidásica no intestino das lagartas alimentadas com as três variedades, através da inibição da atividade das enzimas tripsina-*like* pela ocupação dos sítios de especificidade S1' e secundário de ativação S2'.

Conforme observado para as atividades proteolítica e esterásica, na atividade amidásica, as três variedades apresentaram comportamento semelhante nas doses de berenil 0,60 e 1,0%, não sendo detectada diferença significativa entre elas. Ou seja, tanto as lagartas alimentadas com uma variedade suscetível quanto as alimentadas com variedades resistentes ao ataque de insetos tiveram suas atividades enzimáticas diminuídas em presença de berenil. Os efeitos dos inibidores de proteases nos insetos já foram comprovados de diversas maneiras: incorporados na dieta do inseto (Ramos *et al.*, 2009A; Pilon *et al.*, 2006), pulverizados diretamente sobre a planta (Pilon, 2008; Marinho, 2010) e expressos em plantas transgênicas (Vila *et al.*, 2005; Maheswaran *et al.*, 2007; Steppuhn & Baldwin, 2007).

Com relação à avaliação da atividade cisteíno protease no intestino médio das lagartas alimentadas com plantas das variedades Foscarin-31, IAC-18 e IAC-24, pulverizadas com berenil nas doses 0,0; 0,60 e 1,0%, foi observado que não houve atividade dessas enzimas (dados não mostrados), o que sugere que, em presença de berenil, não ocorre aumento de atividade de enzimas cisteíno proteases. O aumento na atividade cisteíno-proteases seria uma estratégia das lagartas para contornar os efeitos do inibidor de serino-proteases na diminuição da atividade das enzimas tripsina-*like* presentes no intestino do inseto, conforme foi observado por Pilon (2008), ao alimentar lagartas *Anticarsia gemmatalis* com o inibidor de serino proteases benzamidiana.

Neste trabalho, pelas determinações de atividade enzimática, fica demonstrado que, nas três variedades de soja testadas (Foscarin-31, IAC-18 e IAC-24), ocorreu efeito positivo no uso de um inibidor do tipo bis-benzamidina, ou seja, um inibidor que ocupa o sítio de especificidade e o sítio secundário de

ativação de tripsina-*like*. A atividade de serino-proteases diminuiu na presença de berenil e não foi observada atividade de cisteíno proteases no intestino médio das lagartas, mostrando sua eficiência no controle do inseto. Os aspectos bioquímicos dos mecanismos de resistência da variedade IAC-24 merecem ser mais bem estudados para uma elucidação dos componentes envolvidos na resposta ao ataque do inseto, pois o mecanismo de resistência sugere não ser pela via de síntese de inibidores de proteases como resposta ao ataque da lagarta da soja, mas pela produção de outros componentes entomóxicos que atuam afetando a atividade das enzimas digestivas do inseto. A variedade IAC-18, padrão de resistência moderada ao ataque de insetos, por sua vez, teria como provável mecanismo de resposta ao ataque de insetos, a produção de inibidores de proteases mais eficientes na redução da atividade das enzimas presentes no intestino médio do inseto. Torna-se, portanto, necessário a realização de testes bioquímicos com o objetivo de purificar e caracterizar esses inibidores de proteases que podem estar conferindo resistência a variedade IAC-18 contra o ataque de insetos praga.

## 5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amorim, T.M.L., Macedo, L.L.P., Uchoa, A.F., Oliveira, A.S., Pitanga, J.C.M., Macedo, F.P., Santos, E.A., Sales, M.P. 2008. Proteolytic Digestive Enzymes and Peritrophic Membranes during the Development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Piralidae): Targets for the action of Soybean Trypsin Inhibitor (SBTI) and Chitin-Binding Vicilin (EvV). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:7738– 7745.
- Axelrod, B., Cheesbrough, T.M., Laasko, S. 1981. Lipoxygenases from soybeans. *Methods Enzymology*. 71:441-451.
- Barbara, K.A. Velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae) 2000. Disponível em: <<http://entnemdept.ifas.ufl.edu/creatures/field/velvetbean.htm>>. Acessado em 15 de março de 2010.
- Batista, R.B., Oliveira, M.G.A., Pires, C.V., Piovesan, N.D., Rezende, S.T., Moreira, M.A. 2002. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. 37 (11):1517-1524.
- 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.
- Bhattacharyya, A., Leighton, S.M., Babu, C.R. 2007. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. *Comparative Biochemistry And Physiology*. 145:669-677.
- Broadway, R.M. 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *Journal of Insect Physiology*. 41(2): 107-116.
- Carlini, C.R., Udedible, A.B. 1997. Comparative effects of processing methods on hemagglutinating and antitryptic activities of *Canavalia ensiformes* and *Canavalia brasiliensis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45:4372-4377.
- Chen, H., Vigil, E.G., Wilkerson, C.G., Howe, G.A. 2007. Stability of Plant Defense Proteins in the Gut of Insect Herbivores. *Plant Physiology*. 143:1954–1967.
- Chougule, N.P., Doyle, E., Fitches, E., Gatehouse, J. A. 2008. Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae* (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *Journal of Insect Physiology*, 54:563–572.
- Christeller, J.T. 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS Journal*. 272:5710–5722.

- Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB. Levantamento de grãos 2009/2010. [S.I.], 2010. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 10 Abr. 2010.
- Dunse, K.M., Stevens, J.A., Laya, F.T., Gasparb, Y.M., Heath, R.L., Anderson, M.A. 2010. Coexpression of potato type I and II proteinase inhibitors gives cotton plants protection against insect damage in the field. *PNAS*. 107:(34)15011–15015.
- 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.
- Falco, M.C., Marbach, P.A.S., Pompermayer, P., Lopes, F.C.C., Silva-Filho, M.C. 2001. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. *Genet. Molecular Biology*. 24:113-122.
- Farmer, E.E., Caldelari, D., Pearce, G., Simmons, M.K., Ryan, C.A. 1994. Diethylthiocarbamic acid inhibits the octadecanoid signaling pathway for the wound induction of proteinase inhibitors in tomato leaves. *Plant Physiology*. 106:337-342.
- 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 gemmatalis* Hübner). *Journal of Pest Science*.
- Franco, O.L., Ridgen, D.J., Melo, F.R., Grossi-de-Sá, M.F. 2002. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylase structure, function and potencial for crop protection. *European Journal Biochemistry*. 269:397-412.
- Fugi, C.G.Q., Lourenção, A.L., Parra, J.R.P. 2005. Biology of *Anticarsia gemmatalis* on soybean genotypes with different degrees of resistance to insects. *Scientia Agraria*. 62: 3-35.
- Garcia, V.A., Freire, M.D.M., Novello, J.C., Marangoni, S., Macedo, M.L.R. 2004. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: Purification, characterization, and activity against pest proteases. *Protein Journal*. 23(5):343-350.
- Gomes, A.P.G., Dias, S.C., Bloch JR, C., Melo, F.R., Furtado-JR, J.R., Monnerat, R.G., Grossi-De-Sá, M.F., Franco, O.L. 2005. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 140:313-319.
- Green, T.R., Ryan, C.A. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. *Science*. 175:776-777.

- Hoffman-Campo, C.B., Oliveira, E.B., Moscardi, F. 1985. Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina, EMBRAPA-CNPSo, 10, Documentos, 23p.
- Hummel, B.C.W.1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and trombin. Canadian Journal Biochemistry Physiology 37: 1393-1399.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (online). [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\\_200912comentarios.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200912comentarios.pdf). Acessado em 26 de julho de 2010.
- Jaber, K., Éric, H., Francis, F. 2010. Development of entomotoxic molecules as control agents: illustration of some protein potential uses and limits of lectins (Review). Biotechnology, Agronomy, Society and Environment. 14(1):225-241.
- Jongsma, M.A., Bolter, C. 1997. The Adaptation of Insects to Plant Protease Inhibitors. Journal 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.
- Kakade, M.L., Rackis, J.J., McGhee, J.E. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chemistry. 51:376-382.
- Kant, M. R., Baldwin, I. T. 2007. The ecogenetics and ecogenomics of plant-herbivore interactions: rapid progress on a slippery road. Current Opinion in Genetics & Development. 17:519–524.
- Kogan, M., Ortman, E.E. 1978. Antixenosis – a new term proposed to define Painter’s ‘nonpreference’ modality of resistance. Bulletin of the Entomological Society of America, Lanhan. 24:175-176.
- Lourenção, A.L., Pereira, J.C.V.N.A., Miranda, M.A.C., Ambrosano, G.M.B. 2000. Avaliação de danos causados por percevejos e por lagartas em genótipos de soja de ciclos precoce e semiprecoce. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 35:879-886.
- Lwalaba, D., Weidlich, S., Hoffmann, K.H., Woodring, J. 2010. Exogenous and endogenous protease inhibitors in the gut of the fall armyworm larvae, *Spodoptera frugiperda*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 74:(2)114–126.
- Macedo, M.L.R., Freire, M.G.M., Martins, L.T.D.M., Martinez, D.S.T., Gomes, V.M., Smolka, M.B., Toyama, M.H., Marangoni, S., Coelho, L.C.B.B., 2004. Novel Protein from *Labramia bojeri* A. DC. Seeds Homologue to Kunitz-Type Trypsin Inhibitor with Lectin-like Properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 52: 7548-7554

- Macedo, L. P. M., Cunha, U. S., Vendramim, J. D. 2007. Gossipol: fator de resistência a insetos-praga. *Campo Dig., Campo Mourão*. 2(1):34-42.
- Maheswaran, G., Pridmore, L., Franz, P., Anderson, M.A. 2007 A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants. *Plant Cell Reports* 26:773–782.
- Mares-Guia, M., Rogana, E., Amorin, A.F., Magalhães-Rocha, N.M. 1981. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. *The Journal of Biological Chemistry*. 256: 1661-1668.
- 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.
- Marinho, J.S. 2010. Viçosa: Bioatividade de berenil, um inibidor de proteases do tipo bis-benzamidina, sobre *Thyrinteina arnobia*. 96p. Dissertação (Doutorado em Entomologia)-Universidade Federal de Viçosa.
- Mendonca, E., Oliveira, M.G.A., Visotto, L., Guedes, R.N. 2010. Midgut cysteine-proteinase activity in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* (Hübner)). *Journal Insect Science*. Aceito para publicação.
- Migliolo, L., Oliveira, A.S., Santos, E.A., Franco, O.L., Sales, M.P. 2010. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine and cysteine-proteinases. *J. Mol. Graph. Model*. 1-9.
- Mills, N.J.E., Kean, J.M. 2010. Behavioral studies, molecular approaches, and modeling: Methodological contributions to biological control success. *Biological Control*. 52:255–262.
- Miranda, M.A.C., Braga, N.R., Lourenção, A.L., Miranda, F.T.S., Unêda, S.H., Ito, M.F. 2003. Descrição, produtividade e estabilidade da cultivar de soja IAC-24, resistente a insetos. *Bragantia*. 62:29-37.
- Moreira, L.F. 2007. Eficiência alimentar, atividade proteolítica e desenvolvimento pós-embrionário de *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae) exposta ao inibidor de serino-proteases, bis-benzamidina. 83p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Oliveira, M.G.A., Simone, S.G., Xavier, L.P., Guedes, R.N.C. 2005. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140 (B):369-380.
- Ohta, H., Ida, S., Mikami, B., Morita, Y. 1986. Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination. *Plant Cell Physiology*. 22(5): 911-918.

- Oliveira, M.G.A., Simone, S.G., Xavier, L.P., Guedes, R.N.C. 2005. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140 (B):369-380.
- 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, A.S., Migliolo, L., Aquino, R.O., Ribeiro, J.K.C., Macedo, L.L.P., Andrade, L.B.S., Bemquerer, M.P., Santos, E.A., Kiyota, S., Sales, M.P. 2007. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds and its *in vitro* effects towards digestive enzymes from insect pests. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45:858-865.
- Painter, R.H. 1951. The mechanisms of resistance. In: *Insect resistance in crop plants*. University Press of Kansas. 23-83.
- Pereira, R.A., Valência-Jiménez, A., Magalhães, C.P., Prates, M.V., Melo, J.A.T., Lima, L.M., Sales, M.P., Nakasu, E.Y.T., Silva, M.C.M., Grossi-de-Sá, M.F. 2007. Effect of Bowman-Birk Proteinase Inhibitor from *Phaseolus coccineus* on *Hypothenemus hampei* Gut Proteinases In Vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:10714-10719.
- Pereira, M.E., Dörr, F.A., Peixoto, N.C., Lima-Garcia, J.F., Dörr, F., Brito, G.G. 2005. Perspectives of digestive pest control with proteinase inhibitors that mainly affect the trypsin-like activity of *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 38:1633-164.
- Peumans, W.J., Van Damme, E.J.M. 1995. The role of lectins in plant defence. *Histochemical Journal*. 27: 253-271.
- 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* 86:23-29.
- Pilon, A.M., Oliveira, M.G.A., Pilon, F.M., Guedes, R.N.C., Oliveira, J.A., Fazollo, A. 2009. Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. *Revista Ceres*. 56(6):744-748.
- Pilon, A.M. 2008. Viçosa: Respostas bioquímica, fisiológica e comportamental de *Anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) ao inibidor de serino-proteases benzamidina. 86p. Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola)- Universidade Federal de Viçosa, MG.

- Pompermayer, P., 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 the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. Entomol. Experimental and Applied. 99: 79-85.
- Praça, L.B., Silva Neto, S.P., Monnerat, R.G. 2006. *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae): Biologia, amostragem e métodos de controle. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, (Série Documento, 196).
- Rakwal, R., Agrawal, G.K., Jwa, N.S. 2001. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2 A inhibitors. Gene. 263: 189-198, 2001.
- Ramos, V.S., Freire, M. G. M., Parra, J. R. P. 2009. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 152:255–261.
- Rickauer, M., Brodschelm, W., Bottin, A., Véronési, C., Grimal, H., Esquerré-Tugayé, M.T. 1997. The jasmonate pathway is involved differentially in the regulation of different defence responses in tobacco cells. Planta. 202:155-162.
- Roy, I., Gupta, M.N. 2000. Purification of a “double-headed” inhibitor of alpha-amylase/proteinase K from wheat germ by expanded bed chromatography. Bioseparation. 9:239-245.
- Ryan, C.A., Pearce, G. Systemin: 1998. A polypeptide signal for plant defensive genes. Annual Review of Cell and Developmental Biology. 14:1-17.
- Sales, M.P., Gerhardt, I.R., Grossi-de-Sá, M.F., Xavier-Filho, J., 2000. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? Plant Physiology. 124:515-522.
- Savio, G.M., Pinotti, E.B. 2008. Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) por *baculovirus anticarsia*. Revista científica eletrônica de Agronomia (FAEF). Ano VII – Nº 13 – Jun/Periódicos Semestral.
- Schaller, A. 2008. Induced plant resistance to herbivory. Springer.
- Scott, I.M., Thaler, J.S., Scott, J.G. 2010. Response of a Generalist Herbivore Trichoplusiani to Jasmonate-Mediated Induced Defense in Tomato Journal of Chemical Ecology. 36:490–499.
- Shukle, R.H., Murdock, L.L. 1983. Lipoxygenase, trypsin inhibitor and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). Environmental Entomology. 12:787-791.

- Silva, F.B., Oliveira, M.G.A., Batista, R.B., Pires, C.V., Xavier, L.P., Piovesan, N.D., Oliveira, J.A., José, I.C., Moreira, M.A. 2002. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* HUBNER.). Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo. 69(1):67-74.
- Silva, F.B., Oliveira, M.G.A., Brumano, M.H.N., Pires, C.V., Almeida, F.T., Oliveira, J.A., Pilon, A.M., Silva, C.H.O., Moreira, M.A. 2004. Função bioquímica da via das lipoxigenases em plantas de soja submetidas ao ataque de mosca-branca (*Bemisia argentifolii*) Ciênc. agrotec., Lavras. 28:(2)406-413.
- Silva-Filho, M.C., Falco, M.C. 2000. Interação Planta-inseto – Adaptação dos Insetos aos Inibidores de Proteinases Produzidas pelas Plantas. Biotecnologia – Ciência e desenvolvimento. Ano II, 12: 38-42.
- Soares, A.M.S., Machado, O.L.T. 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. Revista Trópica Ciências Agrárias e Biológicas, Chapadinha. 1:(1) 9-19.
- Steppuhn, A., Baldwin, I.T. 2007. Resistance management in a native plant: nicotine prevents herbivores from compensating for plant protease inhibitors. Ecology Letters 10:499-511.
- Terra, W., Ferreira, C., Baker, J.E. 1996. Digestive Enzymes. In: Lehane, M.J. & Billingsley, P.F. (ed). Biology of the Insect Midgut. Chapman & Hall. The University Press, Cambridge. First edition, 206-235.
- Terra, W.R., Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: compartmentalization and function. Comparative Biochemistry Physiology. 109B:1-62.
- Tiffin, P., Gaut, B.S. 2001. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip 1 in zea and related genera. Molecular Biology and Evolution. 18:2092-2101.
- Tomarelli, R.M., Charney, J., Harding, M.L. 1949. Journal Laboratory Clinical Medical. 34:428.
- Vieira, A.A., Oliveira, M.G.A., José, I.C., Piovesan, N.D., Rezende, S.T., Moreira, M.A., Barros, E.G. 2001. Biochemical evaluation of lipoxygenase pathway of soybean plant submitted to wounding. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. 13(1):5-12.
- Vila, L., Quilis, J., Meynard, D., Breitler, J.C., Marfà, V., Murillo, I., Vassal, J.M., Messeguer, J., Guiderdoni, E., Segundo, B.S. 2005 Expression of the maize proteinase inhibitor (mpi) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. Plant Biotechnology Journal 3:187–202.

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.

## CONCLUSÕES GERAIS

- O aumento na atividade de lipoxigenases e nos níveis de inibidores de proteases foliares sugere que as plantas de soja respondem ao ataque da lagarta da soja (*A. gemmatalis*);
- Berenil apresenta propriedade inseticida;
- Berenil prejudica o desenvolvimento de *A. gemmatalis*;
- Berenil afeta o tempo de vida das larvas de *A. gemmatalis*;
- Berenil é repelente às lagartas;
- Berenil não alterou a preferência de oviposição das mariposas de *A. gemmatalis*;
- Não foi observada atividade de cisteíno-protease em presença de berenil;
- Berenil, por ocupar os subsítios de especificidade S1' e secundário de ativação S2' das enzimas tripsina-*like*, pode apresentar melhor eficiência no controle de insetos pragas.

## **APÊNDICE**

Quadro 1 – Resumo da análise de variância para testes bioquímicos da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com plantas de soja tratadas com diferentes concentrações de inibidor de proteases berenil

Fonte de variação	G.L	QM			
		Atividade proteolítica	Atividade esterásica	Atividade amidásica	Atividade cisteíno protease
Concentração de IP	5	0,05849*	1,106154E-13	7,343377E-15	4,758697 E-17 <sup>n.s</sup>
Resíduo	12	0,002642	1,889263E-15	4,063911E-16	3,355505 E-17 <sup>n.s</sup>
C.V (%)		41,74	22,65	44,46	148,67

G.L: Grau de liberdade

QM: quadrado médio

\*: Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>n.s</sup> : Não significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 2 – Resumo da análise de variância da regressão não-linear para o teste de preferência por oviposição de mariposas *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com plantas de soja tratadas com diferentes concentrações do inibidor de proteases berenil

Fonte de variação	G.L	QM
Regressão não-linear	3	287,5984*
Resíduo	1	0,0047

G.L: Grau de liberdade

QM: quadrado médio

\*: Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 3 – Resumo da análise de variância da regressão não-linear para o teste de preferência para alimentação de livre escolha de lagartas de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com plantas de soja tratadas com diferentes concentrações do inibidor de proteases berenil

Fonte de variação	G.L	QM
Regressão não-linear	3	511,9314*
Resíduo	1	10,2737

G.L: Grau de liberdade

QM: quadrado médio

\*: Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 4 – Resumo da análise de variância para teste de ganho de peso de larvas de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com folhas de soja tratadas com diferentes concentrações do inibidor de proteases berenil

A- Concentração 0,0% de berenil

Fonte de variação	G.L	QM
Regressão	1	8,70383*
F.A.	2	0,1939*
Tempo	(3)	3,03060082*
Resíduo	198	0,017122
C.V (%)	37.02472	

F.A.: Falta de ajuste

G.L: Grau de liberdade

QM: quadrado médio

\*: Significativo ao nível de 5% de probabilidade.

B- Concentração 0,0080% de berenil

Fonte de variação	G.L	QM
Regressão	1	3.39538018 *
F.A.	2	0.03256986 <sup>n.s</sup>
Tempo	(3)	1.15350663*
Resíduo	198	0,017122
C.V (%)	57.31355	

F.A.: Falta de ajuste

G.L: Grau de liberdade

QM: quadrado médio

\* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>n.s</sup> Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

C- Concentração 0,010% de berenil

Fonte de variação	G.L	QM
Regressão	1	2.86253607*
F.A.	2	0.01911894 <sup>n.s</sup>
Tempo	(3)	0.96692465*
Resíduo	198	0,017122
C.V (%)	41.28761	

F.A.: Falta de ajuste

G.L: Grau de liberdade

QM: quadrado médio

\* Significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>n.s</sup> Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

D- Concentração 0,20% de berenil

Fonte de variação	G.L	QM
Regressão	1	0.01159399 <sup>n.s</sup>
F.A.	2	0.00201940 <sup>n.s</sup>
Tempo	(3)	0.00521093 <sup>n.s</sup>
Resíduo	198	0,017122
C.V (%)	67.36320	

F.A.: Falta de ajuste

G.L: Grau de liberdade

QM: quadrado médio

<sup>n.s</sup> Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

E- Concentração 0,60% de berenil

Fonte de variação	G.L	QM
Regressão	1	0.00025958 <sup>n.s</sup>
F.A.	2	0.00002114 <sup>n.s</sup>
Tempo	(3)	0.00010062 <sup>n.s</sup>
Resíduo	198	0,017122
C.V (%)	183.1137	

F.A.: Falta de ajuste

G.L: Grau de liberdade

QM: quadrado médio

<sup>n.s</sup> Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

F- Concentração 1,0% de berenil

Fonte de variação	G.L	QM
Regressão	1	0.00000004 <sup>n.s</sup>
F.A.	2	0.00014645 <sup>n.s</sup>
Tempo	(3)	0.00009765 <sup>n.s</sup>
Resíduo	198	0,017122
C.V (%)	106.7646	

F.A.: Falta de ajuste

G.L: Grau de liberdade

QM: quadrado médio

<sup>n.s</sup> Não-significativo, ao nível de 5% de probabilidade.

Quadro 5 – Resumo da análise de variância para testes bioquímicos em *Anticarsia gemmatilis* alimentadas com plantas de soja de três variedades (Foscarin-31, IAC-18 IAC-24) tratadas com diferentes concentrações (0,0; 0,60; 1,0% p/v) do inibidor de proteases berenil

Fonte de variação	G.L	QM			
		Atividade proteolítica	Atividade esterásica	Atividade amidásica	Atividade cisteíno protease
Variedade	2	0.00468506*	5.323698E-14*	2.746843E-16*	1.134188E-15 <sup>n.s</sup>
Conc. de IP	2	0.05353182*	3.26756E-13*	3.488956E-15*	1.183414E-15 <sup>n.s</sup>
Var.X Conc.de IP	4	0.00503267*	4.875404E-14*	2.231815E-16*	1.143789E-15 <sup>n.s</sup>
Resíduo	18	0.00001562	4.434387E-15	3.407804E-17	1.148197E-15
C.V (%)		7.55	47.05	45.73	438.84

G.L: Grau de liberdade

QM: quadrado médio

\*: Significativo ao nível de 5% de probabilidade

n.s : Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 1 - Estimativas obtidas por Kaplan-Meier para os tempos de vida da lagarta da soja em função das concentrações de Berenil

Tempo	n	$\hat{S}(t)$	Erro-Padrão $\hat{S}(t)$	IC 95% $\hat{S}(t)$
Conc= 0				
6	60	0,983	0,017	0,951 : 1,000
7	59	0,967	0,023	0,922 : 1,000
8	58	0,683	0,060	0,575 : 0,812
9	41	0,650	0,062	0,540 : 0,783
10	39	0,583	0,064	0,471 : 0,722
Conc= 0,008				
2	60	0,950	0,028	0,896 : 1,000
5	57	0,900	0,039	0,827 : 0,979
5	54	0,817	0,050	0,724 : 0,921
6	49	0,750	0,056	0,648 : 0,868
7	45	0,733	0,057	0,630 : 0,854
8	44	0,650	0,062	0,540 : 0,783
9	39	0,617	0,063	0,505 : 0,753
10	37	0,550	0,064	0,437 : 0,691
11	33	0,500	0,065	0,388 : 0,644
Conc= 0,01				
2	60	0,933	0,032	0,872 : 0,999
5	56	0,800	0,052	0,705 : 0,908
6	48	0,733	0,057	0,630 : 0,854
7	44	0,667	0,061	0,557 : 0,797
8	40	0,650	0,062	0,540 : 0,783
9	39	0,633	0,062	0,522 : 0,768
10	38	0,533	0,064	0,421 : 0,676
12	32	0,450	0,064	0,340 : 0,595
Conc= 0,20				
5	60	0,967	0,023	0,922 : 1,000
6	58	0,883	0,041	0,806 : 0,968
7	53	0,783	0,053	0,686 : 0,895
8	47	0,517	0,065	0,405 : 0,660
9	31	0,283	0,058	0,189 : 0,424
10	17	0,083	0,036	0,036 : 0,193
11	5	0,000	--	--
Conc= 0,60				
5	60	0,500	0,065	0,388 : 0,644
6	30	0,350	0,062	0,248 : 0,494
8	21	0,000	--	--
Conc= 1,0				
5	60	0,567	0,064	0,454 : 0,707
6	34	0,350	0,062	0,248 : 0,494
7	21	0,000	--	--

n: número de indivíduos sob risco;  $\hat{S}(t)$ : função de sobrevivência.