

ANDERSON MARTINS PILON

**RESPOSTAS BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA E
COMPORTAMENTAL DE *Anticarsia gemmatalis* (LAGARTA
DA SOJA) AO INIBIDOR DE SERINO PROTEASES
BENZAMIDINA**

**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
2008

ANDERSON MARTINS PILON

**RESPOSTAS BIOQUÍMICA, FISIOLÓGICA E
COMPORTAMENTAL DE *Anticarsia gemmatalis* (LAGARTA
DA SOJA) AO INIBIDOR DE SERINO PROTEASES
BENZAMIDINA**

**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: 26 de fevereiro de 2008.

Prof. Wellington Garcia Campos

Prof . Joel Antônio de Oliveira
(Co-orientador)

Prof. Cláudio Lisias Mafra de Siqueira

Dr. Thiago Rennó dos Mares-Guia

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

A Deus.

À meus familiares.

À minha mãe Lúcia Martins Pilon.

À meu pai Odemar Pilon.

À minha irmã Franciny Martins Pilon.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), onde se realizou o trabalho de tese.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, pela orientação, pela presença, pelo estímulo e, acima de tudo, pela amizade que demonstrou no decorrer do curso.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Ao professor Raul Narciso Guedes, pela co-orientação, pelas sugestões na parte estatística e na discussão dos resultados.

Ao professor Joel Antônio de Oliveira, pela co-orientação e pelo auxílio na discussão dos resultados.

Aos estudantes de Iniciação Científica Fabrício e Fernanda que muito me ajudaram para a realização deste trabalho e pela amizade e convívio.

Aos meus companheiros e amigos de república, Ângelo e Marcos pelas críticas e sugestões durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos Christiano, Fabrícia, Franciny, Jeanne, Ronnie, Rita, Denise, Camila, Edson, Pedro, Arlindo, Eduardo, Gisele, Lilian, Angélica, Newton, Anderson, Márcio, Aloísio, Gláucia, Márcia e José Fausto, pela amizade e agradável convivência.

Ao secretário Eduardo Pereira Monteiro Montes do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela atenção e amizade.

A todas as pessoas que, de algum modo, contribuíram para o êxito deste trabalho.

BIOGRAFIA

ANDERSON MARTINS PILON, filho de Lúcia Martins Pilon e Odemar Pilon, nasceu em 20 de outubro de 1979, na cidade de Vitória, Estado do Espírito Santo.

Em maio de 2002, graduou-se no curso de Agronomia na Universidade Federal de Viçosa.

Em fevereiro de 2004 obteve o título de Magister Scientiae em Bioquímica Agrícola na UFV.

Em março de 2004, iniciou o curso de Doutorado em Bioquímica Agrícola na UFV, submetendo-se à defesa de tese em 26 de fevereiro de 2008.

ÍNDICE

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1. Introdução geral.....	1
2. Revisão da literatura.....	5
2.1. Interação Planta-Inseto.....	5
2.2. Enzimas Digestivas dos Insetos.....	8
2.3. Proteases de insetos.....	10
2.4. Inibidores de proteases.....	13
2.5. Ação dos inibidores de proteases em insetos.....	15
2.6. Inibidores de proteases benzamidinas.....	17
2.7. A cultura da soja.....	17
2.8. <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner 1818) (Lepidoptera: Noctuidae).....	18
3. Objetivos.....	21
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
4. Materiais e Métodos.....	22
4.1. Criação da Lagarta da Soja (<i>Anticarsia gemmatalis</i> Hübner).....	22
4.2. Preparo da Dieta Artificial.....	23
4.3. Ataque de lagarta da soja.....	24
4.4. Obtenção das mudas.....	24
4.5. Aplicação do inibidor nas plantas.....	25
4.6. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio da lagarta.....	25
4.7. Determinação da Concentração de Proteína.....	26
4.8. Obtenção do extrato foliar.....	26
4.9. Determinação da Atividade Proteásica.....	26
4.10. Determinação da Atividade Amidásica Tripsina- <i>like</i>	27
4.11. Determinação da Atividade Esterásica de Tripsina- <i>like</i>	27
4.12. Determinação da Atividade cisteíno protease.....	27
4.13. Determinação de inibidores de proteases.....	28
4.14. Estudo da biologia de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	29
4.15. Teste de preferência de lagartas a folhas com ou sem os inibidores de proteases benzamidinas.....	29
4.16. Teste de preferência de pouso e oviposição em plantas com ou sem os inibidores de proteases benzamidinas.....	30
4.17. Análises estatísticas.....	31
5. Resultados e discussão.....	32
5.1. Efeito de pulverizações com benzamidina na preferência alimentar de lagartas <i>Anticarsia gemmatalis</i> em plantas de soja.....	32
5.2. Efeito de pulverizações com benzamidina na preferência de pouso de mariposas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	34
5.3. Efeito de pulverizações com benzamidina na preferência de oviposição de mariposas de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	36
5.4. Efeito de diferentes concentrações de benzamidina pulverizadas em plantas de soja no ganho de peso de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	38

5.5. Efeito de diferentes concentrações de benzamidina pulverizada em plantas de soja na mortalidade de <i>Anticarsia gemmatalis</i>	41
5.6. Determinação dos níveis de inibidores de proteases presentes nos extratos foliares.....	43
5.7. Atividade proteásica do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	47
5.8. Atividade amidásica do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	49
5.9. Atividade esteárica do intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	52
5.10. Atividade de cisteíno protease no intestino médio de <i>A. gemmatalis</i>	55
6. Conclusões.....	58
7. Referências Bibliográficas.....	59

RESUMO

PILON, Anderson Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Respostas bioquímica, fisiológica e comportamental de *anticarsia gemmatalis* (lagarta da soja) ao inibidor de serino proteases benzamidina.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-orientadores: Raul Narciso Carvalho Guedes, Maurílio Alves Moreira, Joel Antônio de Oliveira e Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

Os insetos são responsáveis por grandes perdas na Agricultura. Na tentativa de controlá-los, têm-se buscado novas alternativas que não sejam baseadas em agroquímicos. 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. É postulado que, quando uma planta é atacada ou ferida, ela propicia um aumento nos níveis de inibidores de proteases na região ferida (resposta local) e ou em toda a planta (resposta sistêmica). Nesta interação inseto-planta, os insetos podem desenvolver mecanismos de defesa contra os inibidores de proteases produzidos pela planta. Esta possibilidade demanda um conhecimento mais elaborado do comportamento das enzimas proteolíticas do intestino médio dos insetos, a partir da ingestão crônica de inibidores de protease no momento do ataque à planta. Muitas pesquisas vêm demonstrando o potencial dos inibidores de proteases em comprometer o desenvolvimento do inseto. Uma praga que se destaca na cultura da soja é o lepidóptera, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner). Neste contexto, o presente trabalho fundamentou-se em verificar os efeitos comportamentais no desenvolvimento pós-embrionário e nas proteases digestivas de *A.gemmatalis* quando ingeriram o inibidor de serino-proteases benzamidina aplicado em plantas de soja da variedade CAC-1 e seu genótipo triplo-nulo, em seis diferentes concentrações: 0,0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60; e 0,75%. A benzamidina interferiu na resposta comportamental de lagartas e mariposas de *Anticarsia gemmatalis*, as quais tiveram preferência por plantas que não receberam pulverizações com benzamidina. O desenvolvimento pós-embrionário também foi afetado reduzindo o ganho de peso e aumentando a

mortalidade. *Anticarsia gemmatalis* em situação de ingestão de inibidores apresentou respostas adaptativas como a capacidade de sintetizar cisteíno proteases. Portanto, estes dados sugerem que a utilização de inibidores de protease possa ser uma estratégia promissora no controle de *Anticarsia gemmatalis* na cultura da soja.

ABSTRACT

PILON, Anderson Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa. February, 2008. **Biochemical, physiological and behavioral response of *anticarsia gemmatalis* when submitted to treatments with protease inhibitors.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Advisers: Raul Narciso Carvalho Guedes, Maurílio Alves Moreira, Joel Antônio de Oliveira and Márcia Rogéria de Almeida Lamêgo.

The insects are responsible for great losses in Agriculture. In the attempt to control them, new alternatives that are not based on agrochemicals have been searched. In the coevolution involving plants and insects, the plants developed defense mechanisms against the attack of insects. Amongst these mechanisms the production of protease inhibitors is distinguished. It is postulated that, when a plant is attacked or wound, it favors an increase in the levels of proteases inhibitors in the wounded region (local response) and or all over the plant (systemic response). In this insect-plant interaction, the insects can develop defense mechanisms against the protease inhibitors produced by the plant. This possibility demands a closer study of the behavior of the mid intestine proteolytic enzymes of the insects, starting from the chronic ingestion of protease inhibitors at the moment of the attack to the plant. Many investigations have been demonstrating the potential of proteases inhibitors in compromising insect development. An important plague in the soy culture is the lepidoptera *Anticarsia gemmatalis* (Hübner). In this context the present work was based on verifying to the behavioral effects, in the post-embryonic development and in the *A.gemmatalis* digestive proteases after the ingestion of the serine-proteases inhibitor, benzamidine, sprayed on soy plants of the CAC-1 variety and its triple-null genotype, in six different concentrations: 0.0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60 and 0.75%. The benzamidine intervened in the behavioral response of *Anticarsia gemmatalis* larvae and butterflies, which had preference for plants that had not been sprayed with benzamidina. The post-embryonic development was also affected reducing the weight gain and increasing the mortality. *Anticarsia gemmatalis* in situation of chronic inhibitor ingestion presented adaptative responses like a hyperproduction of sensible

and/or insensitive to the trypsin-like proteases and the capacity to sintethise other proteases as it is the case of cysteine proteases. Therefore, these data suggest that the employment of protease inhibitors can be a promising strategy in the control of *Anticarsia gemmatalis* in the soy culture.

1. Introdução geral

Estima-se que as perdas provocadas por pragas e doenças na agricultura mundial atinjam 37% da produção, dos quais cerca de 10-20% sejam devidos aos insetos (Silva-Filho e Falco, 2000; Ferry *et al.*, 2006). Os insetos não apenas provocam perdas na produtividade diretamente pelo ataque herbívoro, mas também indiretamente por atuarem como vetores de vários patógenos de plantas (Hilder e Boulter, 1999). Essas perdas ocorrem mesmo com o uso extensivo de pesticidas e fungicidas e, na ausência de tais medidas de proteção, tais perdas podem ser ainda maiores. Segundo Lawrence e Koundal (2002), as perdas estimadas em culturas ao redor do mundo sem o uso de pesticidas ou outras estratégias de controle não-químico atingem 70% da produção, representando um prejuízo de 400 bilhões de dólares.

Embora atualmente os métodos de controle de pragas ainda se concentrem basicamente na utilização de agroquímicos (Lawrence e Koundal, 2002), o alto custo para o desenvolvimento de novos produtos cujas formulações devam se adequar às pragas cada vez mais resistentes ao seu uso, as consequências ambientais inaceitáveis, como a contaminação da cadeia alimentar e cursos de água, e a própria pressão de consumidores contra essa prática têm provocado uma revolução no controle de pragas na agricultura moderna.

A soja *Glycine max* (L.) Merrill é um dos produtos agrícolas de maior importância para o Brasil, ocupando lugar de destaque na pauta de exportação, sendo plantada praticamente em todo território nacional. Ocupa extensas áreas nas regiões sul e centro-oeste tendo posição de destaque no país como fonte de proteína e de óleo vegetal, para consumo interno ou como gerador de divisas, através das exportações. Os países maiores produtores de soja são também os maiores exportadores, sendo o principal os Estados Unidos, seguidos pelo Brasil e Argentina. No âmbito nacional a soja ocupa o segundo lugar entre os principais produtos agrícolas, ocupando essa posição há vários anos (Embrapa, 2006). Dada a sua importância econômica, os problemas ocasionados pelo ataque de pragas são consideráveis face aos prejuízos que causam à produção e à qualidade dos grãos ou sementes (Magrini *et al.*, 1999).

O levantamento da safra 2006/2007 feito em janeiro de 2007 pela Conab (Companhia Nacional de Abastecimento) prevê que a área cultivada com soja nesta safra seja de 20,7 milhões de hectares, com uma produção de 54,87 milhões de toneladas (Companhia Nacional de Abastecimento, 2007). A cultura da soja está sujeita ao ataque de pragas durante todo o seu ciclo, e os insetos, principalmente na fase larval, representam um importante prejuízo, pois afetam tanto a planta quanto a semente, podendo reduzir substancialmente a qualidade de ambas, causando perdas significativas da produção da cultura (Andrade *et al.*, 2004).

Entre os insetos que trazem conseqüências econômicas mais significativas na soja, destaca-se *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). É conhecida como lagarta da soja, sendo um inseto desfolhador que começa a se alimentar da epiderme inferior e do mesófilo da folha jovem. A partir do segundo ínstar a lagarta já consegue se alimentar da folha inteira chegando a promover a completa desfolhação da planta. Quando a folhagem é removida, ataca outras partes da planta. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com conseqüente redução da produção de grãos. O ciclo de vida da lagarta da soja se completa em cerca de quatro semanas durante o verão, tendo sua duração aumentada no outono.

No combate à pragas agrícolas é crescente a busca por desenvolvimento de compostos de menor custo, que sejam mais específicos e menos poluentes, como os biopesticidas, além do uso cada vez mais freqüente de práticas de engenharia genética, que permitem que genes de resistência de qualquer origem (planta, animal, microrganismo, sintético) sejam utilizados nos programas de melhoramento de plantas (Hilder e Boulter, 1999; Andrade *et al.* 2004). Em 2003 nos Estados Unidos, a cultura de seis espécies de plantas, inclusive a soja, modificadas com um único gene de resistência a insetos, resultou em uma produção adicional de 2,4 milhões de toneladas de alimentos e uma redução do uso de 21.000 toneladas de pesticidas (Christou *et al.*, 2006). Assim, a exploração de mecanismos de resistência endógena das plantas ao ataque dos insetos herbívoros tem sido uma alternativa de controle de pragas (Gatehouse, 2002; Ferry *et al.*, 2004).

Para escapar do ataque de organismos fitopatogênicos e herbívoros, as plantas desenvolveram variados e eficientes mecanismos de resistência, explorando

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

Em nosso grupo de pesquisa constatamos que plantas de soja respondem ao ataque de insetos através da Via das Lipoxigenases. Por esta via são ativados genes que codificam para inibidores de proteases. Assim, plantas de soja atacadas por insetos produzem aumento de inibidores de proteases (Silva *et al.* 2002, Silva *et al.* 2004, Fortunato *et al.* 2007). A ingestão dos inibidores pelos insetos herbívoros interfere no processo de degradação das proteínas no intestino médio sendo, portanto, considerados agentes antimetabólicos por causarem deficiência protéica nos insetos. Os seus efeitos são atribuídos à sua interferência direta na digestão protéica, diminuindo a biodisponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos insetos. Há ainda outra hipótese de que os inibidores afetem o desenvolvimento de forma indireta, através de um mecanismo de “feedback”, que levaria a uma hiperprodução de proteases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos biodisponíveis, deslocando aminoácidos para a síntese de mais proteases em detrimento de outras proteínas essenciais (Oliveira *et al.* 2005; Pilon *et al.* 2006).

Os inibidores de proteases apresentam grande potencial por reduzirem ou impedirem a atividade das enzimas digestivas dos insetos, causando-lhes desnutrição e redução do desenvolvimento, podendo chegar até à morte (Oliveira *et al.* 2005, Pilon *et al.*, 2006, Moreira 2007). Entretanto, no caso de genes de inibidores, para que isto ocorra é necessário que estes inibidores sejam selecionados levando-se em consideração a fisiologia do inseto e a bioquímica de sua digestão (Franco *et al.*, 2002, Oliveira *et al.* 2005, Xavier *et al.* 2005).

Neste contexto, buscamos compreender melhor o mecanismo de interação entre a lagarta da soja [*A. gemmatalis* (Hübner)] e a planta da soja [*Glicine max* (L.) Merrill] realizando um estudo bioquímico fisiológico e comportamental de *A.gemmatalis* que ingeriram o inibidor de serino-proteases benzamidina aplicado em plantas de soja da variedade CAC-1 e seu genótipo triplo-nulo, em seis diferentes concentrações: 0.0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e 0,75 %. buscando uma melhor compreensão da bioquímica e fisiologia do inseto durante a interação planta-inseto.

2. Revisão da literatura

2.1. Interação Planta-Inseto

As plantas e os insetos nos ecossistemas naturais estão continuamente interagindo de forma complexa. Os insetos propiciam às plantas atividades benéficas como a polinização e defesa, já as plantas podem prover aos insetos abrigo, local para ovoposição e alimentação, demonstrando uma estreita relação associativa entre esses organismos. Em contrapartida existem insetos que atacam as plantas e, dependendo da intensidade de herbivoria, podem ser extremamente prejudiciais podendo levar até mesmo à morte destas (Panda e Khush, 1995).

Na coevolução das plantas e dos insetos, as plantas evoluíram com desenvolvimento de diferentes mecanismos de defesa contra o ataque dos insetos, como barreiras físicas e defesas químicas, além de complexas vias de sinalização (Falco *et al.*, 2001). Existem diferentes mecanismos de defesa química destacando-se a síntese de proteínas (Haruta *et al.*, 2001), a liberação para o ambiente de compostos voláteis objetivando a atração de predadores dos insetos herbívoros (Birkett *et al.*, 2000), a síntese de metabólitos secundários (Baldwin, 2001; Kliebenstein, 2001) e o aumento de tricomas na epiderme de folhas e caule (Fordyce e Agrawal, 2001) (Figura I).

Em resposta aos mecanismos de defesa das plantas, os insetos desenvolveram estratégias para contornar as barreiras impostas pelas plantas, em se incluem a metabolização e seqüestro de compostos tóxicos (Scott e Wen, 2001; Nishida, 2002), mecanismos de fuga (Zangerl, 1990) e alteração nos padrões de expressão gênica (Silva *et al.*, 2001) (figura I)

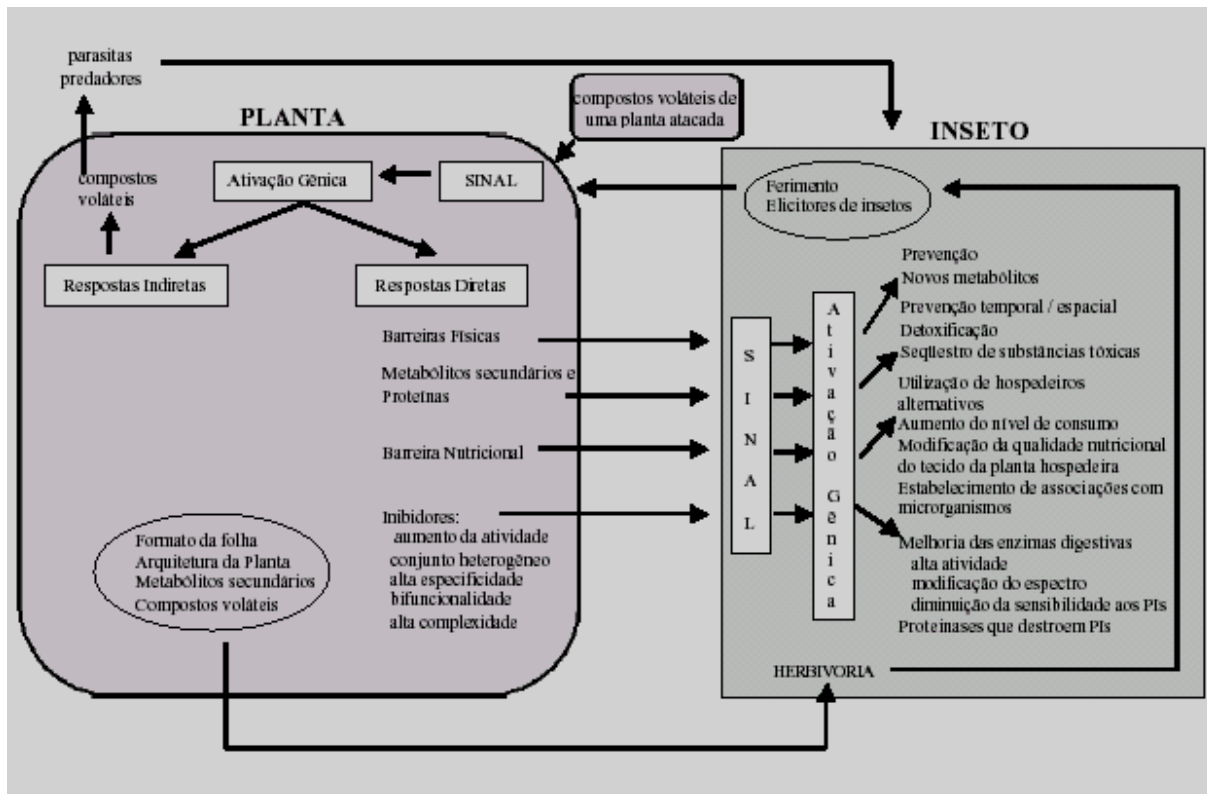


Figura I – Interações entre plantas e insetos

Fonte: Mello & Silva-Filho, 2002.

As proteínas de defesa demonstram ser uma excelente estratégia de controle. Estas podem ser produzidas constitutivamente em tecidos que são particularmente vulneráveis ao ataque de insetos, tais como sementes e folhas, ou podem ser induzidos por danos mecânicos, como ocorre quando um inseto se alimenta de uma folha (Jouanin *et al.*, 1998). Entretanto, muitas destas proteínas também são tóxicas aos mamíferos, o que indica que devam ser cautelosamente estudadas para o uso como mecanismo de proteção de plantas contra insetos (Silva-Filho & Falco, 2000). Entre essas proteínas estão incluídas enzimas como quitinases, lectinas e inibidores de protease (Ryan, 1990, Silva *et al.*, 2002).

Os inibidores de proteases são naturalmente produzidos pelas plantas e estão intimamente relacionados ao mecanismo de defesa delas à herbivoria. Seus níveis em folhas são extremamente baixos e podem ser rapidamente elevados quando a planta é mecanicamente danificada pelo inseto ou mediante a liberação de elicitores (Rakwal *et al.*, 2001). Além da resposta local verifica-se que sinais específicos originários dos tecidos danificados são transportados via floema, acarretando

aumento nos níveis de inibidores de proteases por toda a planta, caracterizando esta resposta como sistêmica (Jongsma e Bolter, 1997). Os inibidores de proteases de planta funcionam como substratos específicos das proteases digestivas dos insetos, formando um complexo estável no qual a proteólise é limitada e extremamente lenta (Tiffin e Gaut, 2001).

Enfim, a ingestão crônica de inibidores de protease pelo inseto acarreta uma deficiência em aminoácidos essenciais, a qual influencia 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 e Bolter, 1997; Pompermayer *et al.*, 2001). Assim, a ingestão de inibidores de proteases, prolongando o desenvolvimento dos insetos herbívoros, também o faz com o período de tempo em que os inimigos naturais (predadores) podem ser atraídos para a planta atacada através de compostos voláteis liberados por ela, promovendo dessa maneira o controle da praga (Baldwin, 2001).

Na evolução das plantas e dos insetos, os insetos herbívoros parecem ter desenvolvido estratégias de contraposição às defesas de plantas, uma vez que alguns se alimentam de uma larga variedade de espécies de plantas (polívoros), podendo ser seletivos ou utilizar partes mais desejáveis, restringido deste modo os compostos tóxicos produzidos pelas plantas. Outros restringem sua alimentação a uma ou poucas espécies de plantas (insetos monófagos) e evoluíram sistemas enzimáticos que podem desintoxicar tecidos (Ruppert e Barnes, 1996). Com os inibidores de proteases produzidos pelas plantas não é diferente. Quando a planta produz um inibidor que atua sobre uma enzima de uma determinada classe de proteases, o inseto produz proteases de classes diferentes que poderão degradar inclusive o inibidor protéico produzido por esta planta e desta forma impede a sua ação prejudicial (Silva-Filho & Falco, 2000).

Em uma visão global verificamos que, na evolução de insetos e plantas, estes desenvolveram mecanismos ecológicos, bioquímicos e fisiológicos de contornar os efeitos negativos da interação inseto-planta. Após a ingestão de inibidores de proteases que poderiam causar impactos negativos no seu desenvolvimento, os

insetos contornam a situação, mediante aumento da atividade das enzimas no trato digestivo ou síntese de enzimas não sensíveis ao inibidor (Paulillo *et al.*, 2000; Zhu-Salzman 2003). Além disso, os insetos podem também resistir à ação dos inibidores de protease através da modificação do espectro ou atividade relativa de várias hidrolases digestivas (Patankar *et al.*, 2001), a hidrólise de inibidores protéicos através de proteases insensíveis (Girard *et al.*, 1998) e da diminuição da sensibilidade das enzimas aos inibidores através da formação de oligômeros de alto peso molecular insensíveis aos inibidores (Brito *et al.*, 2001).

As plantas desenvolveram também estratégias muito eficientes de defesa contra as proteases dos insetos como o aumento da síntese de inibidores nos tecidos (Rakwal *et al.*, 2001), assim como um aumento na síntese de uma gama de inibidores que possuem atividade contra várias proteases (Christeller *et al.*, 1998). Desenvolveram também a produção de inibidores bifuncionais que atuam contra amilases e proteinases (Roy e Gupta, 2000), o aumento da complexidade dos inibidores com propriedades bioquímicas diferentes por meio da produção de iso-inibidores (Tiffin e Gaut, 2001) e a expressão de inibidores específicos para as enzimas do trato digestivo dos insetos (Falco *et al.*, 2001).

2.2. Enzimas Digestivas dos Insetos

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

Para crescerem, se desenvolverem e se reproduzirem os insetos requerem os mesmos aminoácidos essenciais aos mamíferos. Esses aminoácidos essenciais devem ser obtidos de uma dieta protéica e para isso os insetos aparentemente alimentam-se de todos os compostos orgânicos, de madeira a folhas, flores, raízes, tubérculos, néctar, sementes, animais vivos, restos de outros organismos, sangue e de outros insetos, fungos e bactérias (Murdock e Shade, 2002; Fortunato *et al.*, 2007). Essa plasticidade teria sido conferida pela diversidade de enzimas digestivas presentes no intestino médio dos insetos que conferem as habilidades de consumir e utilizar com eficiência os recursos alimentares de que dispõem justificando o “status” de pragas de cultivos agrícolas e alimentos armazenados que muitos insetos possuem (Terra *et al.*, 1996).

As proteases digestivas catalisam a produção de peptídeos e aminoácidos de uma dieta protéica e são encontradas na região do intestino médio do trato digestivo dos insetos. As peptidases – (peptídeo hidrolases, EC 3.4) agem em ligações peptídicas. Neste grupo estão incluídas as proteases (endopeptidases, EC 3.4.21-24) e exopeptidases (EC 3.4.11-19). As proteases são divididas em quatro subclasses, de acordo com o seu mecanismo catalítico: serino proteases, cisteíno proteases, aspártico proteases e metalo proteases.

A organização do processo digestivo depende da compartimentalização das enzimas digestivas e do fluxo do intestino médio que são responsáveis pela translocação das enzimas e produtos da digestão. Segundo Terra *et al.* (1996b) a digestão de polímeros dos alimentos (proteínas, amido, celulose e hemicelulose) no intestino dos insetos acontece em três fases:

- inicial – nesta fase ocorre a diminuição da massa molecular dos polímeros através da ação de hidrolases como tripsina, α -amilase, celulase e hemicelulase;
- intermediária – os oligômeros resultantes da primeira fase são hidrolisados em dímeros ou em dipeptídeos por hidrolases tais como a α -amilase e aminopeptidase;
- final – ocorre a digestão final dos dímeros que são transformados em monômeros por hidrolases tais como dipeptidases, maltase e celobiase.

Estes mesmos autores propõem que a digestão inicial ocorra no espaço endoperitrófico, a digestão intermediária e a final ocorre no espaço ectoperitrófico e células do intestino médio, respectivamente.

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 (Terra *et al*, 2000).

O intestino médio das Lepidópteras é alvo de vários estudos relacionados ao processo de digestão, mecanismo secretor de enzimas, caracterização de proteases digestivas, absorção e movimento de íons, já que várias espécies desta ordem são insetos de grande interesse econômico, pois atacam variedades comerciais como cereais, algodão, leguminosas entre outros. Santos e colaboradores em 1986 demonstraram que não existe digestão no intestino anterior em larvas de *Erinnyis ello* (Lepidoptera: Sphingidae).

Em *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) foram encontrados resultados similares. Dados obtidos com larvas *Manduca sexta* (Sphingidae) mostraram que a atividade da tripsina é recuperada no lúmen do intestino médio anterior, sendo que a maioria do mRNA para tripsina é encontrada na porção mediana do intestino médio. Estes resultados levaram à proposição, por estes autores, de que esta enzima é secretada por células da porção mediana do intestino médio e carregada pelo espaço ectoperitrófico para o intestino médio anterior. Esta organização espacial do processo digestivo é provavelmente comparável na maioria das larvas, parecendo também ser similar em Lepidópteras adultas (Ferreira *et al*, 1994 citados por Terra *et al*, 1996 a e b).

2.3. Proteases de insetos

As proteases digestivas de insetos catalisam a produção de peptídeos e aminoácidos de uma dieta protéica e são encontradas na região do intestino médio do trato digestivo dos insetos. As serino-proteases são as enzimas mais estudadas, sendo seus representantes mais conhecidos a tripsina e a quimiotripsina. As serino proteases participam de uma grande diversidade de processos fisiológicos que

incluem, além da digestão, ativação de proteínas específicas como nas cascatas de coagulação no sistema imune de insetos e plantas (Wilson *et al.*, 1997) e no desenvolvimento e produção de peptídeos biologicamente ativos (Gill *et al.*, 1996).

Dentro do grupo das serino proteases, tripsinas e quimiotripsinas são as enzimas mais encontradas. As tripsinas clivam, preferencialmente, as cadeias protéicas no lado carboxila dos aminoácidos básicos, como arginina e lisina. São inibidas por TLCK, que age sobre a histidina do centro ativo da enzima (Shaw e Mares-Guia, 1965). O valor da massa molecular da tripsina varia entre 20 e 35 KDa e seu valor de pI está entre 4-5. Seu pH ótimo de atividade é alcalino, entre 8 e 9 (Terra *et al.*, 1994). Contudo as tripsinas isoladas de Lepidópteras possuem um pH ótimo maior do que os valores de pH encontrados em intestinos médios de outros insetos (Lemos *et al.*, 1992).

As atividades de enzimas tripsina-like são amplamente estudadas em várias espécies de Lepidópteras e diversas ordens como Coleóptera, Auchenorrhyncha, Blattodea e Díptera (Muharsini *et al.*, 2001; Foissac *et al.*, 2002; Wagner *et al.*, 2002; Lopes & Terra, 2003, Oliveira *et al.*, 2005; Xavier *et al.*, 2005). Algumas de suas propriedades assemelham-se às das tripsinas de vertebrados. No entanto, determinadas características da tripsina de insetos contrastam com as tripsinas de vertebrados, como pH ótimo de atividade, peso molecular, sensibilidade a íon, ponto isoelétrico e sensibilidade aos inibidores de proteases da planta. Foi verificado que as tripsinas de insetos não são ativadas ou estabilizadas por íons cálcio e são instáveis em pH ácido (Sakal *et al.*, 1988). O efeito de íons cálcio foi avaliado na atividade de uma protease presente no intestino médio de *A. gemmatalis*, onde foi observado um aumento de atividade na presença de 10 - 30 mM de CaCl₂ (Oliveira *et al.*, 2005). Em vertebrados, o íon cálcio impede a agregação de moléculas da enzima protegendo-a da autólise e desnaturação por calor, induzindo uma mudança conformacional em sua estrutura para uma forma mais compacta, a qual é necessária para a atividade catalítica (Sipos & Merkel, 1970).

Estudos realizados em larvas de *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) e em *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae) sobre o efeito de íons cálcio na atividade de tripsina em presença de EGTA e/ou EDTA, quelantes de cálcio demonstraram que esta enzima sofreu pequena queda em sua atividade

(5%). Esse resultado sugere que o cálcio talvez possa ter uma função na enzima desses insetos, provavelmente, como co-fator (Lee *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 2002).

Oliveira *et al.* (2005) purificaram parcialmente a enzima tripsina-like de *A. gemmatalis*. A fração parcialmente purificada mostrou três bandas com atividade proteolítica e pesos moleculares de 66,000, 71,000 e 91,000 em gel SDS-PAGE. Ensaio de especificidade enzimática, usando sete peptídeos sintéticos contendo 13 resíduos de aminoácidos diferenciando somente no 5º resíduo foram realizados, tendo tripsina e quimotripsina como controle. Somente os peptídeos contendo os aminoácidos lisina e arginina (específicos para tripsina) foram clivados por ambas, tripsina e enzima parcialmente purificada. Esses resultados demonstraram que o intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* possui uma serino protease tripsina-like.

Xavier *et al.* (2005) identificaram e caracterizaram proteases ligadas à membrana presentes no intestino médio de *A. gemmatalis*. Seus resultados demonstraram que o extrato enzimático insolúvel foi capaz de hidrolisar a caseína, e o substratos sintéticos L-BApNA e L-TAME. Usando L-BApNA como substrato, a atividade foi investigada na presença de vários inibidores de proteases. Assim, EDTA, PMSF, TLCK, benzamidinas e aprotinina, foram todos capazes de inibir a atividade, com maior inibição observada com TLCK e benzamidinas. De acordo com estes resultados, concluiu-se que o intestino médio de larvas de *A. gemmatalis* possui tripsina-like ligada à membrana. Com o propósito de caracterizar melhor a atividade tripsina-like, foi determinada a atividade ótima para o extrato insolúvel. O pH ótimo usando L-BApNA e L-TAME foi 8,5 e 8,0, respectivamente e a temperatura ótima foi de 50°C para ambos substratos. O efeito de cálcio na atividade foi investigado usando L-BApNA como substrato. A atividade máxima foi obtida na concentração de 20 mM de cálcio. Valores de K_{Mapp} para L-BApNA e L-TAME foram de 0.23 mM e 95,4 mM, respectivamente.

Múltiplas isoenzimas de tripsinas têm sido reconhecidas e o seqüenciamento da multifamília de genes codificadores de tripsinas de insetos tem recebido recente foco de atenção (Mazumdar-Leigton *et al.*, 2000; Mazumdar-Leigton *et al.*, 2001; DE Leo *et al.*, 2001). As proteases induzidas explicam o desenvolvimento da resistência do inseto aos inibidores de proteases presentes em plantas nativas ou transgênicas

(Jogsma *et al.*, 1995; Broadway, 1995, 1996; Brown *et al.*, 1997; Brito *et al.*, 2001).

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

2.4. Inibidores de proteases

A resistência de planta pode incluir a síntese de antibióticos, alcalóides e terpenos (Franco *et al.*, 1999), sendo que os mais importantes componentes dos mecanismos de proteção são compostos proteínáceos, os quais incluem enzimas, como β -1,3-glucanases e quitinases, lecitinas, polifenóis oxidases (PPO's), inibidores de proteases (IP's) e α -amilases (Valueva e Mosolov, 2004). As proteínas em resposta à injúria podem ter um papel direto ou indireto (i) na limitação do dano induzido pelo ataque de insetos; (ii) no extermínio de patógenos oportunistas que invadem os locais injuriados e (iii) no desenvolvimento da resistência induzida que protege a planta de subseqüentes ataques de pestes e patógenos (Walling, 2000; Silva *et al.*, 2002, 2004; Monteiro *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2004, 2005).

As α -amilases são endoamilases responsáveis por catalisar a hidrólise das ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos e sua inibição impede o desenvolvimento e crescimento de muitos insetos (Franco *et al.*, 1999). Os mecanismos de ação desses inibidores ainda não foram totalmente desvendados, mas sabe-se que sua ação depende tanto do tempo quanto do pH. Coleópteros apresentam pH intestinal ácido, enquanto em lepidópteros, o pH é alcalino. Nesse sentido, os complexos formados por uma das isoformas dos inibidores de α -amilases só são ativos dentro de uma faixa estreita de pH, atuando em determinados herbívoros (Franco *et al.*, 1999).

As proteases podem ser classificadas em quatro grandes classes: serínicas, cisteínicas, aspárticas e metalo-proteases com base em comparações de seus sítios ativos, mecanismos de ação e estrutura tridimensional (Mares-Guia e Shaw, 1965; Franco *et al.*, 1999). Os inibidores dessas enzimas são classificados como endopeptidases quando hidrolisam ligações internas e exopeptidases quando hidrolisam ligações N ou C-terminais e sua variedade é muito grande (Mares-Guia e Shaw, 1965).

Os inibidores de protease foram caracterizados como proteínas defensivas e tiveram seu papel reconhecido na defesa de plantas quando se observou que larvas de certos insetos eram incapazes de se desenvolver normalmente em soja (Haq *et al.*, 2004), embora dispusessem de grande quantidade de alimento. Suas concentrações nos tecidos vegetais são controladas na sua síntese. Em geral, são encontrados em plantas das famílias Brassicaceae, Cucurbitaceae, Fabaceae, Salicaceae, Glycinaceae, Leguminosae e Solanaceae (Karban e Baldwin, 1997).

A maioria desses inibidores são moléculas pequenas, estáveis e fáceis de purificar e são encontrados nos órgãos reprodutivos, de reserva e vegetativos das plantas. A soja crua contém cerca de 6 % de inibidores que atuam sobre as proteases ao nível do trato gastrintestinal do inseto, indisponibilizando o fornecimento de aminoácidos para o organismo (Whitaker, 1994).

Os inibidores de proteases de soja são constituídos pelo Inibidor de Tripsina Kunitz (KTI) e pelo inibidor de tripsina e quimotripsina Bowman-Birk (BBI). Cerca de 80% da inibição da atividade trípica de grãos de soja é causada pela ação do KTI. Estes antinutrientes apresentam especificidade de inibir as enzimas proteolíticas e, conseqüentemente, reduzem a digestão protéica de alimentos, proporcionando diminuição no ganho de peso e crescimento dos animais. Desta forma, para aumentar o valor nutricional da soja e seus produtos, há necessidade de processamentos térmicos para inativá-los (Miura *et al.*, 2001). O inibidor de soja Bowman Birk (BBI) tem massa molecular em torno de 8 kDa e o Kunitz (KTI) tem massa em torno de 21 kDa (Xavier-Filho e Campos, 1989).

Em tecidos de planta mais vulneráveis ao ataque do herbívoro, essas defesas são constitutivas, como, nas sementes em que também podem ser utilizados como proteínas de reserva. Podem também ser induzidos, por danos mecânicos, por

exemplo, quando o inseto se alimenta em uma folha (Silva-Filho e Falco, 2000). Os inibidores de protease estão presentes nos órgãos reprodutivos, de reserva e vegetativos das plantas e são regulados nesses tecidos durante o desenvolvimento ontogenético da planta ou por variáveis ambientais (intensidade da luz ou concentração de CO₂) (Broadway e Missurelli, 1990).

Os mais altos níveis de IP's foram encontrados em folhas jovens de plantas efêmeras (Silva *et al.*, 2002; Haq *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2005) ou em folhas jovens de plantas maduras (Broadway e Missurelli, 1990), o que demonstra o maior investimento da planta para defender suas partes mais nutritivas e, conseqüentemente, mais expostas à herbivoria. Seu acúmulo pode ser local ou distal ao local do dano, podendo atingir concentrações de 200 µg/g. Cerca de 3 a 4 h após a injúria, os níveis de *mRNA* que atuam na tradução dos IP's elevam-se e se mantêm ativos por até 8h, com suas concentrações apresentando uma meia vida de até 12 h. Após a tradução pelo *mRNA*, os inibidores de proteases são acumulados no vacúolo central das células vegetais, persistindo por até 1 semana (Karban e Baldwin, 1997).

Localmente, os IP's são ativos contra nematóides, vírus, bactérias e patógenos fúngicos (Haq *et al.*, 2004), podendo ter um efeito cumulativo em plantas. Para nematóides, plantas de *Arabidopsis thaliana* modificada com genes PI (cistatina Oc-I delta D86) de uma variedade de arroz promoveram a perda da atividade intestinal da proteinase cisteína, enquanto em outra espécie de nematóides as fêmeas não alcançaram o tamanho mínimo requerido para a produção de ovos (Haq *et al.*, 2004).

2.5. Ação dos inibidores de proteases em insetos

Insetos fitófagos apresentam serino e cisteíno-proteases como principais enzimas digestivas (Haq *et al.*, 2004) sendo que, em afídeos, as proteases presentes no trato digestivo são cisteínicas. Nesses insetos, a atividade dos IP's não é significativa porque sua dieta é à base de nitrogênio e com baixa quantidade de proteína. Em coleópteros, há uma ampla faixa de proteases intestinais e em lepidópteros as proteases serínicas são as mais comuns. Entre as proteases

serfínicas, as tripsinas e quimiotripsinas são as enzimas mais comumente encontradas (Oliveira *et al.*, 2005).

O modo de ação dos IP's consiste em formar os complexos proteína-proteína com essas enzimas, resultando na sua inativação (Mosolov *et al.*, 2001). A inibição de uma enzima proteolítica é competitiva e ocorre pela ligação do sítio ativo da enzima (substrato) à região reativa do inibidor (sítio reativo) no intestino médio do inseto (Silva-Filho e Falco, 2000). Esses IP's são altamente específicos, limitando a proteólise do substrato às suas enzimas cognatas (Karban e Baldwin, 1997).

A formação do complexo enzima-inibidor ocorre rapidamente, mas sua dissociação é lenta e resulta na enzima livre e em um inibidor clivado, que sofre desnaturação (Franco *et al.*, 1999). As interações entre enzima e inibidor ocorrem por interações do tipo forças de *van der Waals*, ligações de hidrogênio e pontes dissulfeto, envolvendo ainda a formação de uma ligação peptídica (Oliveira *et al.*, 1993; Franco *et al.*, 1999).

Os inibidores de proteases são considerados agentes antimetabólicos levando a uma deficiência protéica nos insetos. Sua atividade antibiótica é atribuída à interferência na digestão protéica que diminui a disponibilidade de aminoácidos prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução (Oliveira *et al.*, 1993; Silva-Filho e Falco, 2000; Xavier *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2005). No entanto, esse processo pode ser mais elaborado. Um mecanismo de *feedback* leva o inseto à hiperprodução de proteases para compensar a perda de atividade de suas enzimas digestivas (Silva-Filho e Falco, 2000; Oliveira *et al.*, 2005). Esse processo promove depleção dos aminoácidos essenciais ao metabolismo do inseto, resultando no retardo do seu crescimento (Oliveira *et al.*, 2005). Nos casos em que a enzima também está envolvida em processos como o de muda e na síntese de neuropeptídeos, os inibidores perturbariam essa atividade, retardando o crescimento e o desenvolvimento da larva (Karban e Baldwin, 1997).

2.6. Inibidores de proteases benzamidinas

A benzamidina é uma amida aromática, 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). A bis-benzamidina 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).

2.7 A cultura da soja

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

A cultura da soja praticamente encontra-se sujeita ao ataque de insetos durante todo o seu ciclo. Logo após a emergência, insetos como a lagarta rosca *Agrotis ipsilon* (Hüfnagel) (Lepidoptera: Noctuidae), os percevejos castanhos *Scaptocoris castanea* (Perty) (Hemiptera: Cydnidae) e *Atarsocoris brachiariae* (Becker) (Hemiptera: Cydnidae), os córos e a broca-do-colo *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) podem atacar as plântulas. Posteriormente, a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera:

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

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

A lagarta *A. gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das maiores pragas da soja (*Glycine max*). Ela consome a folha iniciando seu ataque pela epiderme inferior e mesófilo e, após o segundo ínstar, a lagarta da soja consome a folha inteira. A lagarta alimenta-se inicialmente da metade superior ou do terço superior de plantas de soja, podendo passar às folhas inferiores e, a seguir, para tecidos terminais dos caules. Sob altas infestações, ela pode também se alimentar das ramas e vagens pequenas (Roberts e Guillebeau, 1999). É considerada primariamente uma praga das leguminosas, embora tenham sido registrados surtos em algodoeiro (Hinds e Osterberge, 1931), arroz (Tarragó *et al.*, 1977) e pastagens (Wille, 1943).

A lagarta da soja é uma praga desfolhadora bastante problemática em culturas brasileiras. Mesmo em baixas densidades populacionais, este inseto causa grandes danos à lavoura de soja, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. É um inseto mastigador que se alimenta de folhas jovens. Quando a folhagem é removida, ela ataca outras partes da planta. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com conseqüente redução da produção de grãos (Embrapa, 2001).

Apesar de a soja ser um dos principais hospedeiros primários da *A. gemmatilis*, sua larva é capaz de se alimentar de muitas outras espécies incluindo amendoim, kudzu (*Pueraria thunbergiana*), feijão de cavalo (*Cannavalia* sp), algodão, ervilha, erva daninha do café e, folhas de trevo entre outras (Waters e Barfield 1989). A lagarta da soja é nativa das áreas tropicais e subtropicais do hemisfério ocidental sendo uma habitante permanente da América tropical.

O ciclo de vida da lagarta da soja se completa em cerca de quatro semanas durante o verão, sendo de maior duração no outono. O número de gerações depende da dispersão e a chegada dos adultos. Os ovos são brancos, ligeiramente ovais e com tamanho entre 1 mm a 2 mm de diâmetro e aplainado em sua superfície de baixo. O ovo possui suportes proeminentes, sendo branco só até antes de chocar, quando se torna rosa. Os ovos são postos separadamente do lado abaxial da folha, entretanto quando se tem alta infestação podemos encontrar ovos também na superfície adaxial das folhas, nos pecíolos e até mesmo no caule (WATSON, 1916).

Larvas recém chocadas se alimentam da casca do ovo do qual irão, emergir deixando somente a porção presa à folha. Existem normalmente seis ínstaes no estágio larval da lagarta da soja. As larvas variam extremamente em coloração e marcas durante os ínstaes. A maioria das lagartas possui uma linha negra longitudinal e linhas brancas estreitas, amarelas ou rosas. A larva gasta cerca de dois dias no primeiro instar e cresce de 2,5 mm a 6 ou 7 mm antes da muda. A cabeça é marrom clara, arredondada e bilobada. O corpo da lagarta no primeiro instar é uniformemente verde-claro sem nenhuma faixa longitudinal. As pseudopatas do segmento abdominal 3 e 4 são menores do que as dos segmentos 5 e 6. No segundo instar, a borda negra da linha lateral aparece e o primeiro par de pseudopatas abdominais está cerca de um quarto maior do que o terceiro par. O Segundo par de pseudopatas está 50% maior do que o terceiro. O segundo instar termina em 3 ou 4 dias, tendo a larva cerca de 9 mm de comprimento. O terceiro ínstar também termina em 3 ou 4 dias e a lagarta pode alcançar 16 mm em comprimento. O quarto e o quinto ínstaes terminam em 3 ou 4 dias e podem alcançar 25 mm de comprimento. Durante o sexto ínstar a lagarta da soja torna-se gradualmente maior e pode chegar a medir 48 mm. O sexto instar termina no quinto

dia, sendo que até este ponto se passaram 25 dias. No estágio pré-pupal a larva reduz em tamanho para 25 mm de comprimento e torna-se marrom com poucas linhas longitudinais (Watson, 1916).

A pupa da *A. gemmatalis* é verde clara por volta de um dia de idade, quando então se torna marrom. É de textura lisa e mede de 18 a 20 mm de comprimento e de 4 a 6 mm de largura. Ela vive diretamente embaixo da superfície do solo em uma profundidade de cerca de 2 cm. Suas células são frágeis. A mariposa adulta é variável em formas e coloração com uma envergadura de 30 a 38 mm. A asa da mariposa de *A. gemmatalis* varia de cinza, marrom amarelado claro, ou marrom avermelhado escuro. A ponta das asas é marrom claro com uma linha de pontos claros próxima à margem. Uma linha diagonal escura estende através das duas asas quando estas estão completamente estendidas (Barbara, 2001).

Vários parasitóides atacam a lagarta da soja. O parasitóide predominante é *Winthemia rufopicta* (Bigot) (Diptera: Tachinidae). Os parasitóides podem variar de ano a ano e de local para local. Os predadores desta lagarta são generalistas os quais se alimentam de outras lagartas. Dentre estes predadores observamos os besouros, *Calosoma sayi* Dejean, *Calleida decora* (Fabricius) e *Poecilus chalcites* (Say) (todos Coleoptera: Carabidae) e vários outros. Predadores vertebrados como os pássaros, sapos, e roedores também agem como inimigos naturais da lagarta da soja. Este tipo de predação tem-se mostrado insignificante no controle desta lagarta (Barbara, 2001).

Na tentativa de controlar o ataque destas pragas, tem-se buscado novos métodos que não sejam baseados em agroquímicos, os quais, apesar de aumentarem a produtividade, causam sérios danos ambientais, contaminação dos operadores rurais e proporcionam a seleção de indivíduos resistentes entre as espécies que se estão combatendo. A engenharia genética de plantas oferece a possibilidade de se introduzirem genes de resistência às pragas, que codificam para inibidores de proteases (Jouanin *et al*, 1998).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve por objetivo geral realizar estudos bioquímicos e fisiológicos sobre o mecanismo de interação planta-inseto utilizando *A. gemmatalis* e plantas de soja em presença de inibidor de proteases benzamidinas. Neste contexto, objetivou-se avaliar o efeito de inibidores de proteases aplicados em folhas de soja sobre os parâmetros biológicos, bioquímicos, fisiológicos e comportamentais de *Anticarsia gemmatalis*.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar o efeito na atividade proteolítica de proteases do intestino da lagarta da soja quando alimentadas com plantas de soja da variedade CAC-1 e seu genótipo CAC-1 TN, submetidas à pulverização com diferentes concentrações de inibidores de proteases benzamidinas;
- Determinar o efeito na atividade amidásica de proteases tripsina-*like* do intestino da lagarta da soja quando alimentadas com plantas de soja, submetidas à pulverização com diferentes concentrações de inibidores de proteases benzamidinas;
- Determinar o efeito na atividade esterásica de proteases tripsina-*like* do intestino da lagarta da soja quando alimentadas com plantas de soja, submetidas à pulverização com diferentes concentrações de inibidores de proteases benzamidinas;
- Avaliar a produção de inibidores de proteases pelas plantas quando atacadas pela lagarta da soja, assim como quando submetidas à pulverização com diferentes concentrações de inibidores de proteases benzamidinas;
- Estudar a biologia e comportamento de *A. gemmatalis* quando alimentadas com plantas de soja submetidas à pulverização com diferentes concentrações de inibidores de proteases benzamidinas.

4. Materiais e Métodos

4.1. Criação da Lagarta da Soja (*Anticarsia gemmatalis* Hübner)

Ovos de *A. 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 $26 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 50 x 50 cm revestida internamente com folhas de papel sulfite, A4.

Após quatro dias as mariposas emergiram, e foram alimentadas com solução nutritiva composta de mel (10,5g), cerveja (350mL), sacarose (60g), ácido ascórbico (1,05g), nipagin (1,05g) e água (1050mL), embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de Petri.

A postura de *A. gemmatalis* ocorreu após três dias, 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 está acoplada uma tela de filó. Estes copos foram então transferidos para uma câmara climatizada a 25°C , umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas mantido por “timers” acoplados a lâmpadas tipo luz-do-dia.

Após dois ou três dias ocorreu a eclosão dos ovos, quando se iniciou a alimentação das larvas de *A. gemmatalis* baseada na metodologia de Hoffman-Campo *et al.* (1985), com um cubo de dieta artificial em cada copo plástico. Nos experimentos para os estudos dos parâmetros biológicos, as lagartas foram alimentadas com folhas de soja pulverizadas com as soluções contendo triton X-100 e benzamidina nas concentrações 0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60; e 0,75% (p/v).

4.2. Preparo da Dieta Artificial

A dieta artificial possui a seguinte composição (Quadro 1).

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

Ingredientes	Controle
Feijão mulatinho (cozido) ¹	4,80
Levedo de cerveja ¹	2,4
Germe de trigo ¹	3,8
Proteína de soja ¹	3,8
Caseína ²	1,9
Agar-agar ³	1,34
Ácido ascórbico ²	0,23
Ácido sórbico ⁴	0,11
Solução vitamínica ¹	0,38
Nipagin ⁴	0,19
Formol 40% ¹	0,23

¹ Obtido no comércio de Viçosa, MG

² Obtido da Sigma

³ Obtido da Isofar- Indústria comércio de produtos químicos Ltda.

⁴ Obtido da Synth- LabSynth produtos para laboratório Ltda

Estes ingredientes 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/cm², 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), pantoenato 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), água (1L); até formar uma pasta homogênea que foi então transferida ainda quente para recipientes plásticos com tampa. A pasta obtida era resfriada em câmara germicida acondicionada com luz ultravioleta e conservada a 4 °C.

4.3. Ataque de lagarta da soja

Plantas de soja no estágio V3 de desenvolvimento foram submetidas a uma lagarta em cada trifolíolo. Após 6, 12, 24 e 48 horas, os três folíolos da primeira folha trifoliolar foram coletados para posterior obtenção de extratos foliares, e as lagartas removidas nesses períodos.

4.4. Obtenção das mudas

Foram utilizadas plantas de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) variedade comercial CAC-1 e o seu genótipo CAC-1 TN "Triplo -Nulo", com sementes alteradas por manipulação genética, com e sem os genes que codificam as lipoxigenases, obtidas pelo Programa de Melhoramento da Qualidade da Soja do BIOAGRO/UFV.

As mudas foram cultivadas até o estágio V2 sem histórico de aplicação de qualquer produto foliar. Foram obtidas três plantas de cada genótipo de soja, em vaso com capacidade para 4,0 kg de solo, em condições de casa de vegetação. As mudas foram pulverizadas com as devidas soluções de inibidores de proteases, de acordo com o tratamento utilizado. Imediatamente decorridos os tempos de ataque das lagartas, de cada tratamento, os três folíolos da primeira folha foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C, para a determinação de inibidores de proteases.

4.5. Aplicação do inibidor nas plantas

Foram preparadas seis gaiolas com dimensões de 1m x 1m x 1m, recobertas com organza, cada gaiola contendo 24 vasos, cada vaso 3 plantas, portanto 72 mudas de soja, sendo cada gaiola correspondente a um tratamento. No tratamento controle as plantas foram pulverizadas com uma solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v) e as plantas dos tratamentos testes pulverizadas com uma solução aquosa contendo Triton X-100 0,01% (v/v) e acrescentada de inibidores de proteases do tipo benzamidinas, de acordo com o tratamento nas concentrações de 0,15, 0,30, 0,45, 0,60 e 0,75% (p/v).

Em cada vaso, com 3 plantas de soja no estágio V3 de desenvolvimento, foi colocada uma lagarta de 4º ou 5º instar (instares em que a lagarta se alimenta mais vorazmente) no primeiro trifólio de cada planta.

A pulverização das mudas de acordo com os tratamentos foi realizada com as lagartas nas folhas, como ocorre em uma aplicação no campo. De cada gaiola foram retirados 6 vasos (totalizando 18 lagartas) em cada um dos seguintes períodos: 6, 12, 24 e 48 horas depois de realizada a pulverização. As mudas retiradas não retornaram às gaiolas. As lagartas retiradas tiveram os intestinos extraídos para obtenção do extrato enzimático para posteriores análises.

4.6. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio das lagartas

Os intestinos médios foram extraídos após dissecação das lagartas em presença de HCl 10^{-3} M a 4°C e acondicionados em tubos plásticos de 2 mL contendo 1 mL de HCl 10^{-3} M. 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.

4.7. Determinação da Concentração de Proteína

As determinações das concentrações de proteínas do intestino de lagarta foram realizadas de acordo com método do ácido bicinconínico (Smith *et al.*, 1985), utilizando como padrão uma solução 2,0 mg/mL de Albumina Sérica Bovina, sendo que as absorbâncias foram monitoradas espectrofotometricamente a 562nm.

4.8. 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). As folhas pesadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido foram 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, segundo metodologia modificada por Batista *et al.* (2002). O sobrenadante, denominado extrato bruto, foi utilizado para as determinações da concentração de proteína total e da concentração de inibidor de proteases.

4.9. Determinação da Atividade Proteásica 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, os tubos plásticos de 2 mL com tampas contendo as amostras foram centrifugados a 8.000 g por 5 minutos a 25°C para remoção da proteína precipitada. Uma alíquota de 240 µL do sobrenadante foi transferida para tubos contendo 280 µL de NaOH 1M. A atividade foi determinada no sobrenadante com leituras de absorbâncias a 440 nm. O experimento foi realizado em uma série de três repetições e em triplicatas.

4.10. Determinação da Atividade Amidásica Tripsina-*like* do Intestino Médio de *A. gemmatalis*.

A atividade amidásica foi realizada pelo método descrito por Erlanger *et al.* (1961), utilizando-se o substrato cromogênico L-BApNA, a 25°C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl₂ e 1% (v/v) de dimetilformamida (DMF).

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

4.11. 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 CaCl₂.

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.

4.12. Determinação da Atividade Cisteíno Protease do Intestino Médio de *A. gemmatalis*.

A determinação da atividade de cisteíno-proteases foi realizada adaptando-se o método de Erlanger *et al.* (1961). Foram pipetados 0,59 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M contendo Dietiltiotriol 1mM, pH 8,0, 10 μ L do extrato enzimático do intestino e 0,1 mL do inibidor benzamidina 10 mM.. Essa mistura foi incubada por 15 minutos à

temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado 0,5 mL do substrato L-BApNA 1,2 mM.

As velocidades foram determinadas através da medida da absorvância a 410nm 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.

4.13. Determinação de Inibidores de Proteases.

A presença de inibidores de proteases no extrato foliar foi determinada utilizando-se tripsina bovina. A atividade tríptica, na presença de inibidores, consiste 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 $4,7 \times 10^{-5}$ 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 $4,7 \times 10^{-5}$ 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 o tempo de incubação, 500 μL da mistura de incubação, do teste e do respectivo 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:

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

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 μ g de tripsina ativa sobre o substrato L-BApNA dá uma leitura de absorvância em 410 nm de 0,019 (Kakade *et al.*, 1974).

4.14. Estudo da biologia de *Anticarsia gemmatalis*

Larvas de primeiro ínstar de *A. gemmatalis*, provenientes da criação-estoque, foram colocadas em potes plásticos de 200 mL, cada um contendo 5 lagartas. Cada tratamento correspondeu a um total de 12 potes, logo 60 lagartas.

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

As lagartas de *A. gemmatalis*, foram criadas com folhas de soja pulverizadas com os inibidores de proteases do tipo benzamidas e com folhas de soja sem os inibidores de proteases. As folhas foram fornecidas 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 observados os pesos das lagartas em dias alternados para avaliar o ganho de peso e a mortalidade.

4.15. Teste de preferência de lagartas a folhas com ou sem os inibidores de proteases benzamidas

Para este teste foram utilizadas lagartas de 4º ínstar obtidas da criação de rotina do laboratório.

A solução contendo os inibidores benzamidas foi preparada nas seguintes concentrações: 0,00; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e 0,75% (p/v), solubilizada em água e

adicionada de 1% 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.

Em cada gaiola descrita anteriormente foram colocadas 10 plantas eqüidistantes de forma circular, sendo cada planta correspondente a um tratamento. O suporte dos tubetes foi uma superfície de isopor perfurada (que serviu de arena). Os tratamentos foram distribuídos para que dois tratamentos iguais não ficassem próximos (Figura i). Foram liberadas 30 lagartas no centro da arena e retiradas após vinte minutos. A seguir tornaram a ser liberadas no centro da arena e as observações foram feitas nos períodos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12 horas onde as lagartas foram retiradas e contadas as presentes em cada tratamento. Para cada período de tempo o processo se repetiu com a substituição das lagartas.



Figura i) Plantas de soja dispostas na arena.

4.16. Teste de preferência de pouso e oviposição em plantas com ou sem os inibidores de proteases benzamídnas

Para realizar este teste foram utilizadas fêmeas adultas de *A. gemmatilis*, obtidas da criação base do laboratório.

A solução contendo os inibidores benzamídnas foram preparadas nas seguintes concentrações: 0,00; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e 0,75% (p/v), solubilizada em água e adicionada de 1% 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. Em cada gaiola descrita anteriormente foram colocadas 10 plantas equidistantes de forma circular, sendo cada planta correspondente a um tratamento. Os tubetes foram encaixados em uma superfície de isopor perfurada. Os tratamentos foram distribuídos para que dois tratamentos iguais não ficassem próximos, conforme (Figura i).

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 5 repetições. Como este lepidóptero é de hábito noturno estes testes foram realizados à noite (21:00h) e para visualizá-los foi utilizada uma lanterna com luz ultravioleta, não afetando assim o comportamento destes insetos uma vez que este comprimento de onda não é percebido por este lepidóptero.

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

4.17. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de regressão utilizando o programa TableCurve 3D Windows versão 2.0 e os modelos escolhidos foram plotados no programa SigmaPlot, versão 7.0 (SPSS, 2001).

5. Resultados e discussão.

5.1. Efeito de pulverizações com benzamidina na preferência alimentar de lagartas *Anticarsia gemmatalis* em plantas de soja

Observando-se as figuras 1 e 2 podemos verificar que houve efeito significativo entre a proporção de lagartas versus a concentração de inibidor. Podemos verificar que a proporção de lagartas em plantas controle que não receberam pulverizações com benzamidina, é superior do que em plantas pulverizadas com o inibidor. Isto demonstra que lagartas de *Anticarsia gemmatalis* apresentam uma não preferência por plantas de soja que receberam aplicações de inibidores. Esse efeito foi mais acentuado na concentração de 0,45% de benzamidina.

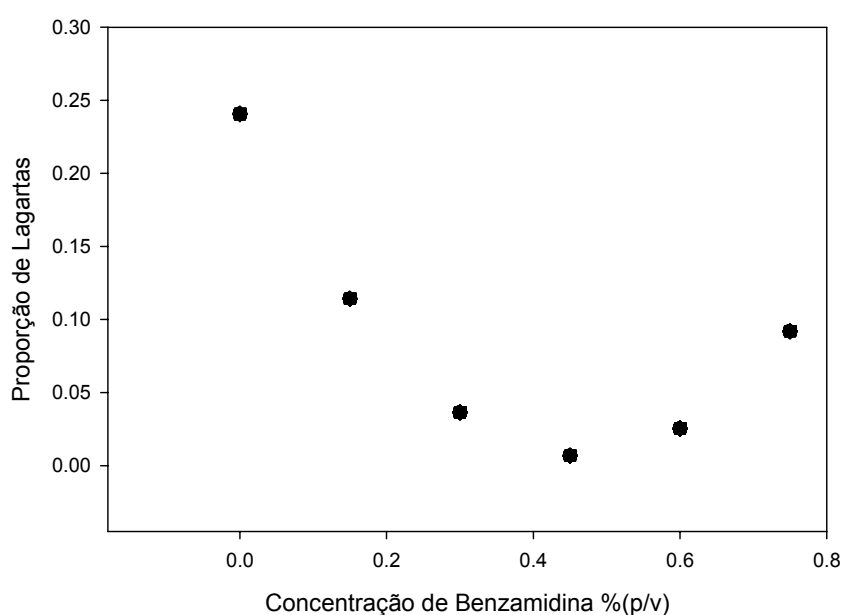


Figura 1- Preferência da lagarta por plantas de soja CAC -1 pulverizadas com o inibidor de protease benzamidina em diferentes concentrações. Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z =$

$0.24 - 1.01x + 1.09x^2 + 0.002y$ (não houve efeito expressivo do tempo de exposição) e os parâmetros : $R^2 = 0.59$; $F_{3,326} = 157.48$; $p < 0.0001$.

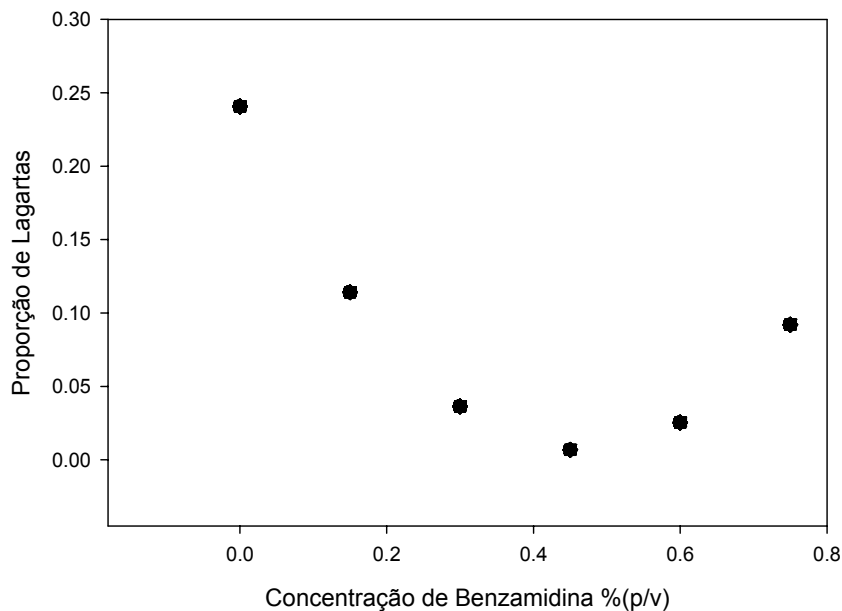


Figura 2- Preferência da lagarta por plantas de soja CAC -1 TN pulverizadas com o inibidor de protease benzamidina em diferentes concentrações. Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z = 0.24 - 1.00x + 1.07x^2 + 0.002y$ (não houve efeito expressivo do tempo de exposição) e os parâmetros : $R^2 = 0.50$; $F_{3,326} = 106.95$; $p < 0.0001$.

Já Oliveira (2006) ao trabalhar com lagartas do lepidóptero *Thyriniteina leucoceraea* submetidas ao teste de preferência em plantas de eucalipto e goiaba pulverizadas com inibidor de protease benzamidina não observou diferença significativa para nenhuma das concentrações estudadas do inibidor.

Em soja, Lin e Fischer (1990) avaliaram o efeito sobre a preferência alimentar do coleóptero *Epilachna varivestis* por plantas sadias e após o ataque do lepidóptero *Pseudoplusia includens*, estes autores verificaram que as plantas injuriadas por *P. includens* foram rejeitadas pelo coleóptero. Possivelmente esse efeito poderia ser decorrente do acúmulo de metabólicos secundários em plantas atacadas. Os

mecanismos de resistência em soja compreendem fatores químicos e físicos, podendo ser constitutivos ou indutivos (KOGAN, 1976). Injúrias causadas por insetos em folhas provocam o aumento do nível de resistência em folhas não atacadas da mesma planta (REYNOLDS and SMITH, 1985). Esse fenômeno foi bem estudado em tomate e batata, nos quais se verificou que qualquer tipo de ferimento ou injúria nos tecidos vegetativos da planta leva à liberação de uma substância chamada PIIF (fator indutivo de inibidor de protease) no sistema vascular da planta, sendo rapidamente transportada para outros tecidos, onde é iniciado o processo de acúmulo de inibidores de protease (RYAN, 1978).

5.2. Efeito de pulverizações com benzamidina na preferência de pouso de mariposas de *Anticarsia gemmatalis*.

Observando-se as figuras 3 e 4) verificamos que houve um efeito significativo entre a visitação de mariposas versus a concentração de inibidor e o tempo de exposição. Podemos verificar ainda que a proporção de mariposas em plantas controle as quais não receberam pulverizações com benzamidina é bem maior do que em plantas pulverizadas com o inibidor. Estes dados demonstram que as mariposas de *A. gemmatalis* têm preferência por visitar plantas que não tenham sido pulverizadas com benzamidina, o que sugere a possibilidade de haver uma maior postura de ovos nessas plantas.

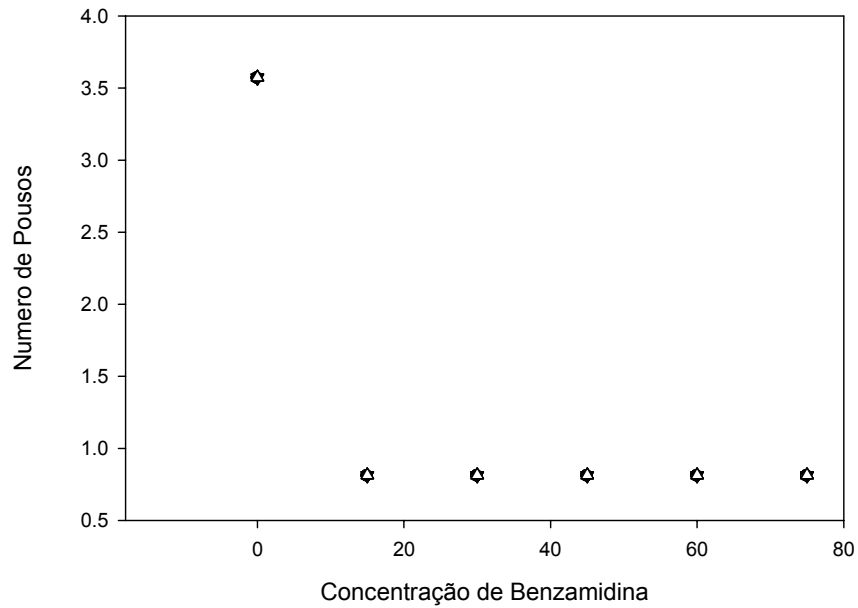


Figura 3- Preferência de pouso de mariposas por plantas de soja CAC-1 pulverizadas com o inibidor de protease benzamidina em diferentes concentrações. Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z = 0.82 + 2.76e^{-x} - 91.07/y^2$ e os parâmetros : $R^2 = 0.58$; $F_{2,189} = 130.11$; $p < 0.0001$.

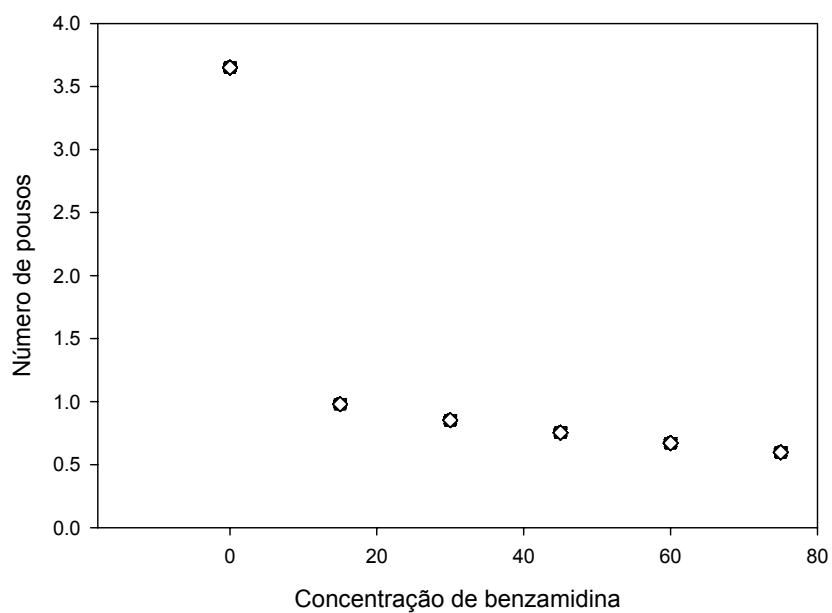


Figura -4 Preferência de pouso de mariposas por plantas de soja CAC-1 pulverizadas com o inibidor de protease benzamidina em diferentes concentrações. Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z = 01.29 - 0.08x^{0.5} + 2.36e^{-x}$ e os parâmetros : $R^2 = 0.63$; $F_{2,237} = 201.55$; $p < 0.0001$.

A seleção de um hospedeiro seja pela qualidade ou ausência de inimigos naturais é normalmente realizada pela fêmea (Mayhew, 1997). O sucesso dos descendentes está ligado ao comportamento de escolha de lepidópteros por sítios de oviposição, já que lagartas apresentam baixa mobilidade (Singer, 1986; Renwick, 1989). Isto é importante, pois compostos produzidos por plantas após o ataque dos herbívoros podem afetar o desenvolvimento deles (Doughty *et al.*, 1995) e ter maior importância em lagartas de primeiro estágio de desenvolvimento.

O padrão de escolha de fêmeas de *A. gemmatalis* sugere a idéia de este herbívoro estar adaptado a reconhecer compostos que podem interferir negativamente no desempenho de seus descendentes. Apesar de pouco tempo de contato com esse hospedeiro, a produção de compostos seja, possivelmente, semelhante. Uma das rotas conhecidas de produção de compostos voláteis e IP em plantas é a via das lipoxigenases que leva a produção do ácido jasmônico e esse composto pode agir na ativação e expressão de genes que codificam para a produção de inibidores de proteases (Farmer e Ryan 1972).

Silva *et al.* (2002 e 2004) e Fortunato *et al.* (2004 e 2007) demonstraram que plantas de soja atacadas por *A. gemmatalis* respondem através da produção de inibidores de proteases tripsinas-like.

5.3. Efeito de pulverizações com benzamidina na preferência de oviposição de mariposas de *Anticarsia gemmatalis*

Observando-se a Figura 5 na qual foi realizada uma regressão simples não linear podemos verificar que houve um efeito significativo entre o número de ovos depositados na planta e a concentração de inibidor. Trata-se de uma correlação negativa, ou seja, quanto maior a concentração de benzamidina menor a quantidade de ovos depositados nas plantas de soja. Portanto, menor oviposição em folhas tratadas com inibidores de proteases.

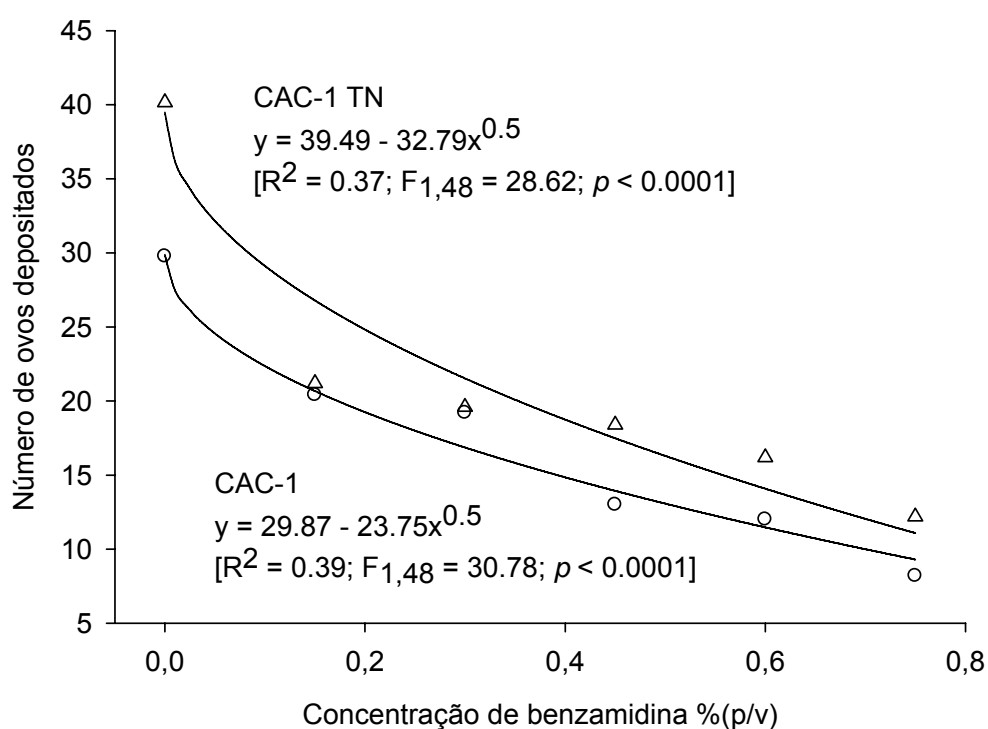


Figura 5 - Avaliação da preferência de mariposas por oviposição em plantas de soja CAC-1 e CAC-1 TN pulverizadas com o inibidor de protease benzamidina em diferentes concentrações.

Resultados semelhantes foram encontrados em *T. leucoceraea* por Oliveira (2006) onde a maioria das fêmeas desse lepidóptero ovipositaram em plantas de eucalipto e goiaba sem o inibidor benzamidina, mostrando preferência por plantas nas quais seus descendentes possam ter maior sucesso reprodutivo.

A literatura relata que fêmeas de herbívoros lepidópteros podem escolher hospedeiros através de substâncias voláteis, nutrientes, fago-inibidores e fago-estimulantes (Eisemann e Rice, 1985; Mc Innis, 1989; Oi e Mau, 1989; Messina, 1990). Estudando a oviposição de *Anthonomus grandis* em 16 cultivares de algodoeiro, contendo teores de gossipol, um composto fenólico, formado por aldeídos e terpenos, biossintetizado por plantas do gênero *Gossypium* da família Malvaceae, Hedin (1995) observou que 100% das fêmeas ovipositaram em cultivares com baixo teor de gossipol.

O mesmo parece ter ocorrido com fêmeas de *A. gemmatilis*, onde estas podem ter percebido a presença do inibidor benzamidina sobre as folhas das plantas, evitando realização de posturas, uma vez que inibidores de proteases podem reduzir o desenvolvimento e performance de seus descendentes (Pompermayer *et al.* 2001; Pilon *et al.* (2006).

Os IPs podem, então, inibir a oviposição de *A. gemmatilis*. Isto mostra a possibilidade de utilização destes inibidores de proteases como parte de programas de Manejo Integrado de Pragas (MIP) em plantios de soja, pois, como já demonstrado para outros herbívoros, a presença desses compostos pode reduzir o desempenho desses organismos, reduzindo os danos e a pressão desse herbívoro sobre esse hospedeiro.

5.4. Efeito de diferentes concentrações de benzamidina pulverizada em plantas de soja no ganho de peso de *Anticarsia gemmatilis*.

Podemos observar nas Figuras 6 e 7 que houve um decréscimo no crescimento, uma vez que o ganho de peso final de lagartas alimentadas com folhas de soja pulverizadas com o inibidor de protease benzamidina foi significativamente menor do que em lagartas alimentadas com folhas de soja sem o inibidor benzamidina. Uma explicação para este fato seria que a presença da benzamidina esteja inibindo serino proteases tripsina-*like* do intestino do inseto diminuindo a biodisponibilidade de aminoácidos essenciais à biossíntese de proteínas importantes para o seu crescimento, desenvolvimento e manutenção do inseto, comprometendo assim o seu desenvolvimento.

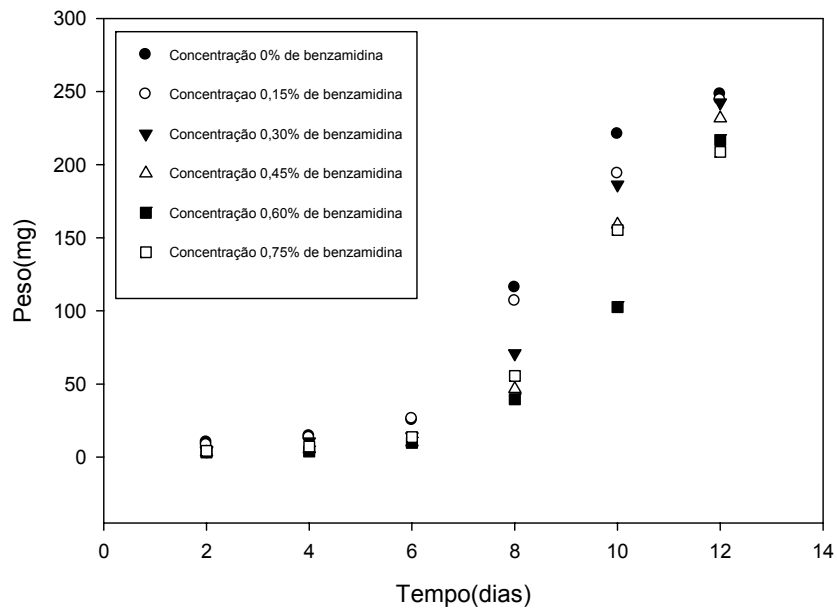


Figura 6 - Avaliação do ganho de peso de lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com folhas da variedade de soja CAC-1, pulverizadas com diferentes concentrações do inibidor de protease benzamidina. Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z = 11.26 + 53.16x + 0.50y^{2.5x}$ e os parâmetros : $R^2 = 0.95$; $F_{2,33} = 306.57$; $p < 0.001$.

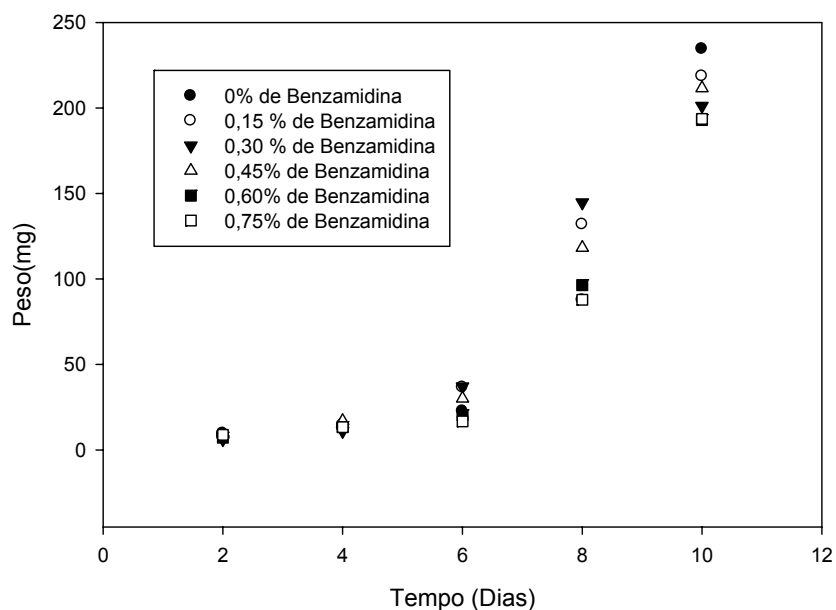


Figura 7 - Avaliação do ganho de peso de lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com folhas da variedade de soja CAC-1, pulverizadas com diferentes concentrações do inibidor de protease benzamidina. Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z = 29.59 - 17.37x^{1.5} + 7.30y^2$ e os parâmetros : $R^2 = 0.97$; $F_{2,27} = 412.00$; $p < 0.001$.

Estes resultados são condizentes com os de Broadway e Duffey (1986a), nos quais a incorporação do inibidor de tripsina de soja (SBTI) e o inibidor de protease II de batata em dieta resultou em um decréscimo na taxa de crescimento dos Lepidópteros *Heliothis zea* e *Spodoptera exigua*. Outros inibidores têm dado resultados semelhantes como oryzacistatina I, que retarda o crescimento de *Tribolium castaneum* (Michaud *et al.*, 1995); da mesma forma, o inibidor Multicistatina de batata reduz o crescimento de *Diabrotica virgifera virgifera* (Orr *et al.*, 1994). Esta, quando alimentada com soyacistatina N, tem sua atividade digestiva comprometida conturbando também o seu crescimento e desenvolvimento (Zhao *et al.*, 1996; Koiwa *et al.*, 1998 e 2000).

Moreira (2007) quando alimentando lagartas de *A. gemmatalis* com dieta acrescida de bis-benzamidina verificou uma redução inicial nas taxas de crescimento, resultando em menor ganho de peso pelas lagartas quando comparadas àquelas que consumiram dieta sem a adição de bis-benzamidina, sugerindo que o mesmo efeito possa ter ocorrido em *A. gemmatalis* alimentada com benzamidina, uma vez que o inibidor desde os primeiros dias afetou o ganho de peso das lagartas (figuras 6 e 7). Isto pode ter propiciado menores ganhos de peso no final da fase larval. Conseqüentemente, uma fase larval prejudicada pode afetar o peso da pupa e prejudicar a performance dos adultos formados.

Mcmanus e Burgess (1995), também verificaram esse efeito em larvas de *Spodoptera litura* que após ingestão crônica de inibidores tiveram uma redução do crescimento apenas no 1º instar o que acarretou menores ganhos de peso até 12 dias, e as lagartas, no final do ciclo, tiveram seus pesos pouco discrepantes.

Por outro lado, Koiwa *et al.* (1998) verificaram que o inibidor de soyacystatina-N causa impactos negativos no crescimento e desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus* apenas nos três primeiros instares. A partir do quarto instar até a fase pré-pupa, o inseto demonstrou ter uma taxa de recuperação dos efeitos negativos dos 3 primeiros instares.

5.5. Efeito de diferentes concentrações de benzamidina pulverizada em plantas de soja na mortalidade de *Anticarsia gemmatalis*.

Podemos observar na figura 8, em que foi realizada uma regressão linear, efeito significativo de aumento da mortalidade em decorrência do acréscimo de inibidor benzamidina.

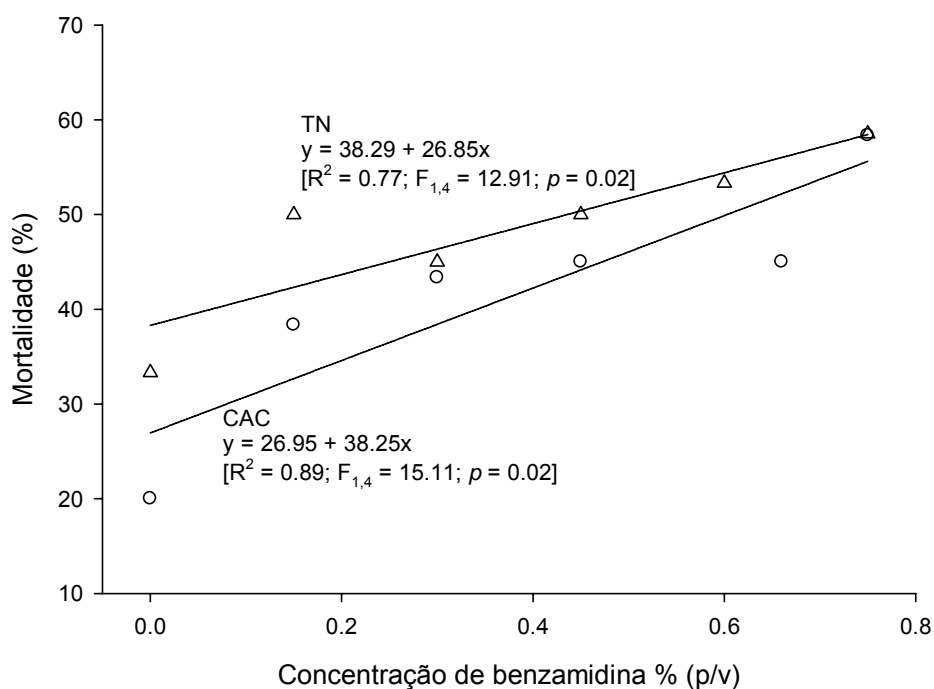


Figura 8 - Avaliação da mortalidade de lagartas *A. gemmatalis* alimentadas com folhas da variedade de soja CAC-1 e TN, pulverizadas com diferentes concentrações do inibidor de protease benzamidina.

Resultados semelhantes foram encontrados quando se alimentou *Leptinotarsa decemlineata* com E64, inibidor sintético de cisteína protease. O resultado foi um atraso no crescimento, aumento na mortalidade e diminuição da taxa de fecundidade de adultos (Wolfson e Murdock, 1987; Bolter e Latoszek-Green, 1997).

Pilon *et al.* (2006) basearam-se na determinação da digestibilidade e seus efeitos no crescimento e desenvolvimento de larvas de *A. gemmatalis* quando alimentadas com o inibidor de tripsina benzamidina em dieta artificial. Foi verificado que a adição de benzamidina alterou significativamente a digestibilidade do alimento proteico. Tal alteração está correlacionada com impactos negativos ocasionados na fase larval desse inseto, tais como aumento do ciclo larval, diminuição de ganho de peso e aumento da mortalidade.

Visotto (2007), buscando verificar o papel das bactérias intestinais no processo digestivo e no desenvolvimento de *A. gemmatalis* após a ingestão de dieta

artificial contendo tetraciclina, demonstrou que a redução da microbiota afetou significativamente a atividade proteolítica no intestino de *A. gemmatalis*, sugerindo que o aumento da mortalidade em larvas, pode estar correlacionado com a microbiota reduzida. Neste sentido, os inibidores de proteases apresentam grande potencial por reduzirem ou impedirem a atividade das enzimas digestivas produzidas pela *A. gemmatalis* e a sua microbiota, causando-lhes desnutrição e redução do desenvolvimento, aumentando, assim, a mortalidade das lagartas.

Moreira (2007) verificou que a ingestão do inibidor bis-benzamidina em dieta por *A. gemmatlis* provocou uma redução inicial nas taxas de crescimento afetando significativamente a biomassa incorporada pelas lagartas durante a fase larval, o que resultou em menor ganho de peso pelas lagartas quando comparadas àquelas que consumiram dieta sem a adição de bis-benzamidina.

5.6. Determinação dos níveis de inibidores de proteases presentes nos extratos foliares

Podemos observar nas figuras 9 e 10 mostram que mesmo em presença da benzamidina, as plantas de soja pulverizadas com benzamidina após o ataque de *A. gemmatalis*, tiveram aumentos na inibição trípica, . Estes resultados mostram que conforme verificado por Silva *et al.*(2002 e 2004) e Fortunato *et al.* (2004 e 2007) as plantas de soja responderam ao ataque do inseto através da produção endógena de inibidores de proteases uma vez que ocorre aumento da inibição trípica com o tempo. Além da benzamidina pulverizada na planta ocorre também a produção de inibidor endógeno pelas plantas de soja de ambos genótipos CAC-1 E CAC-TN.

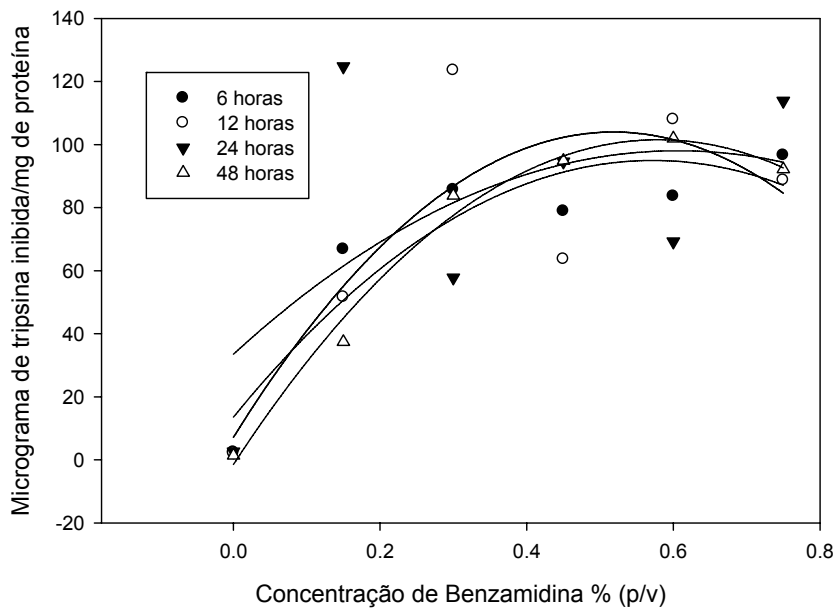


Figura 9 – Determinação dos níveis de inibidores em folhas de soja da variedade CAC 1, pulverizadas com inibidor de protease benzamidina nas concentrações de benzamidina 0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60; e 0,75 % (p/v) e coletadas nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas de ataque de lagartas *A. gemmatilis*. Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z = 5,07 + 301,6x + 1,03y - 2,65,5X^2 - 0,02y^2$ e os parâmetros : $R^2 = 0,65$; $F_{5,67} = 30,60$; $p < 0,0001$.

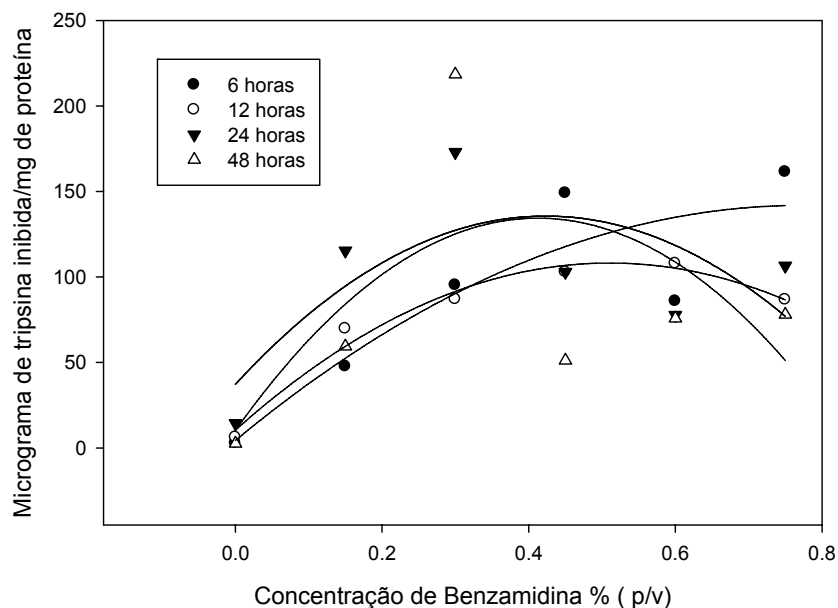


Figura 10 - Determinação dos níveis de inibidores em folhas de soja da variedade CAC-1 TN, pulverizadas com inibidor de protease benzamidina nas concentrações de benzamidina 0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60; e 0,75 % (p/v) e coletadas nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas de ataque de lagartas *A. gemmatilis*. Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z = 6,36 + 448,54x + 1,05y - 467,6x^2 - 0,02y^2$ e os parâmetros : $R^2 = 0,48$; $F_{5,66} = 14,99$; $P < 0,0001$

Marinho (2006) observou aumento na produção de inibidores pelas plantas de eucalipto e goiaba após a aplicação de benzamidina e com ataque de *Thyriniteina leucoceraea* nos tempos de 12 e 24 horas de ataque ao eucalipto e goiaba respectivamente. No entanto ocorreu um declínio na produção de inibidores 48 horas após aplicação do Inibidor de protease. Plantas de amieiro (*Alnus glutinosa*) também responderam ao ataque de *Agelastica alni* com aumento da produção de inibidores de proteases (Tscharntke *et al.*, 2001).

Em nosso estudo pudemos verificar que, independentemente da aplicação de benzamidina, ocorreu a produção de inibidores endógenos, os quais são relatados

na literatura, serem componentes de defesa das plantas. Estes dados indicam que a pulverização de plantas com inibidor benzamidina não foi eficiente no processo de defesa da planta uma vez que ocorreu aumento de inibidor endógeno. Provavelmente, o caminho mais promissor de controle utilizando essa via bioquímica fosse a produção de cultivares que expressem maiores níveis de inibidores ou expressem inibidores mais potentes, mas que sejam produzidos pela planta.

No entanto, a pulverização com benzamidina foi importante nos parâmetros biológicos dos insetos, uma vez que acarretou impactos negativos no desenvolvimento das lagartas e no aumento da mortalidade. Com isso podemos sugerir que o inibidor benzamidina possa ser uma estratégia no controle da lagarta da soja, uma vez que, além de proporcionar aumento da defesa endógena da soja, ele proporciona impactos negativos no desenvolvimento pós-embrionário das lagartas, além de influenciar no comportamento do inseto como a não preferência alimentar e a baixa oviposição em plantas de soja pulverizadas com benzamidina.

Neste estudo verificamos também que plantas de soja do genótipo CAC-1-TN, utilizadas no programa de melhoramento da soja da UFV se comportam semelhantemente à variedade CAC-1 na produção de inibidores, estando em conformidade com proposto por Carvalho *et al.* (1997), que trabalharam com sementes de vários genótipos de soja contrastando para ausência e presença de genes que codificam lipoxigenases e KTI. Eles demonstraram que a eliminação genética de lipoxigenases nas sementes diminuía os níveis de KTI. Verificaram, ainda, que a produção de KTI em sementes estava relacionada com os níveis de lipoxigenases. Portanto, a Via das Lipoxigenases estaria envolvida com o mecanismo bioquímico de produção de KTI em sementes. Assim, os resultados obtidos mostraram também, que a manipulação genética feita na semente, com a retirada das lipoxigenases para diminuir o *beany flavor* e a retirada do inibidor de proteases Kunitz, fator antinutricioanal, com o objetivo de obter um grão de soja de melhor qualidade para a agroindústria, não afetou a expressão dos genes de inibidores de proteases e de lipoxigenases em folhas os quais têm sido relatados como componentes importantes no mecanismo de defesa de plantas a insetos e patógenos.

5.7. Atividade proteásica do intestino médio de *A. gemmatalis*

Podemos observar na figura 11 que a atividade proteásica do intestino da lagarta é decrescente até a concentração 0,45% de benzamidina em relação ao controle onde começa a ser crescente nas concentrações 0,60 e 0,75%. Isso mostra que concentrações até 0,45% de benzamidina juntamente com os inibidores produzidos pela soja, reduzem significativamente a atividade proteolítica. Por outro lado, em concentrações maiores como 0,60 e 0,75% de benzamidina, o inseto provavelmente esteja utilizando os aminoácidos obtidos das folhas consumidas para a síntese de proteases digestivas, buscando contornar o efeito da presença de inibidores. Tal fato explica um menor ganho de peso e um aumento da mortalidade para tais concentrações. Como observado em *A. gemmatalis* quando alimentada com altos teores de inibidor tripsina, outros Lepdopteras como *Spodoptera littoralis* se adaptam a inibidores de proteases com uma grande produção de proteases digestivas (De Leo *et al.*,1998).

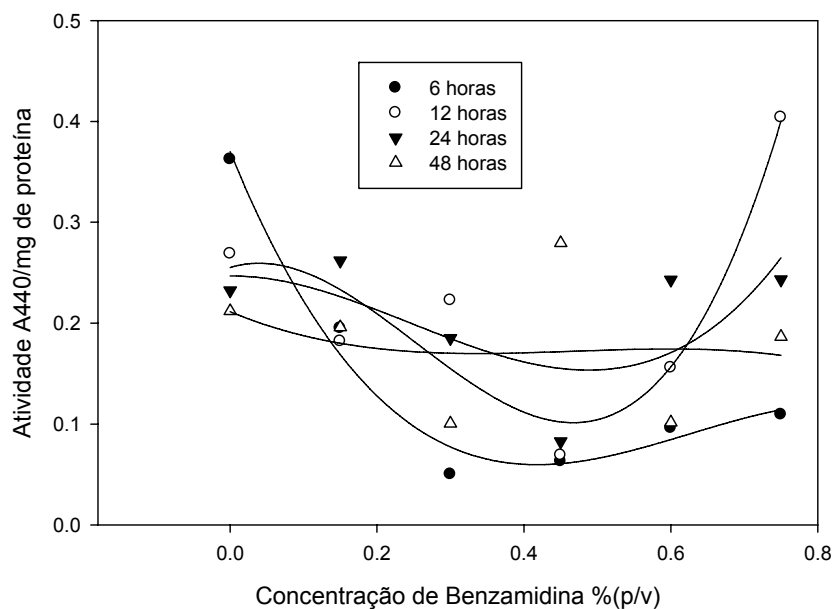


Figura 11 – Atividade Proteásica do extrato do intestino de lagartas *A. gemmatalis* alimentadas de plantas de soja CAC-1 pulverizadas com inibidor de protease benzamidina nas concentrações de benzamidina 0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e

0,75 %(p/v), nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas de ataque da soja. Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z=0,2155 - 0,73x + 0,007y + 0,88x^2 - 0,0001y^2$ e os parâmetros : $R^2 = 0,39$; $F_{5,67}$; $P=0,0001$.

Com a ingestão crônica de inibidores, a biodisponibilidade de aminoácidos estaria sendo utilizada para a síntese de mais proteases ao invés da biossíntese de outras proteínas necessárias ao crescimento e desenvolvimento do inseto, isso poderia levá-lo à morte.

Na figura 12, assim como ocorrido na Figura 11, a atividade proteásica é decrescente até a concentração 0,45% onde começa a ser crescente no tratamento 0,60%. Isto demonstra que plantas CAC-1 TN respondem igualmente a plantas CAC-1 na síntese de inibidores de protease.

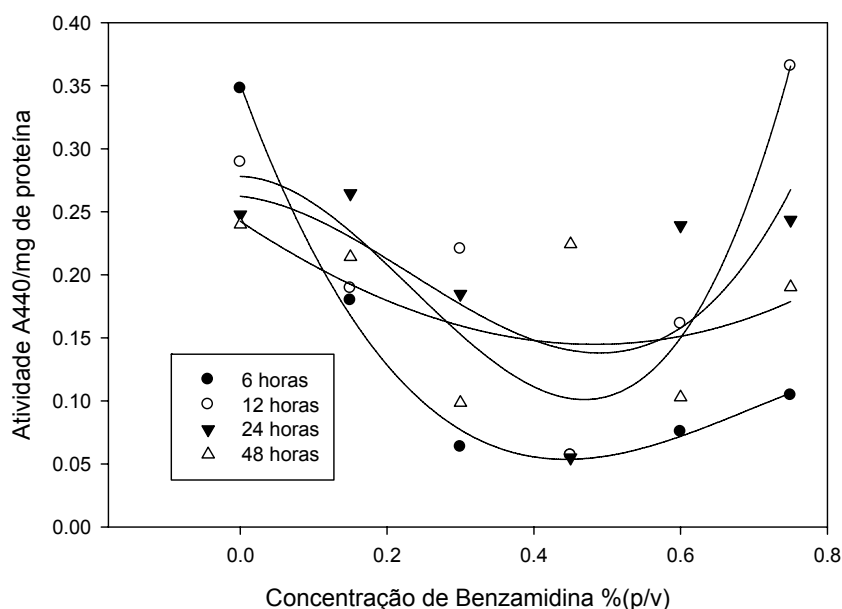


Figura 12 – Atividade Proteásica do extrato do intestino de lagartas *A. gemmatalis* alimentadas de plantas de soja CAC-1 TN pulverizadas com inibidor de protease benzamidina nas concentrações de benzamidina 0, 0,15, 0,30, 0,45, 0,60 e 0,75

%(p/v), nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas de ataque da soja. Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z = 0,22 - 0,82x + 0,008y + 0,97x^2 - 0,0001y^2$ e os parâmetros : $R^2 = 0,51$; $F_{5,67}=17,41$; $p < 0,0001$.

Os insetos podem superar os efeitos dos inibidores de proteases de diversas formas, tais como: pela hiperprodução de proteases (Broadway, 1995), pela indução da atividade de novas proteases insensíveis ao inibidor (Jogsma *et al.*, 1995; Broadway, 1995; Bolter e Jogsma, 1995; Zhu–Salzman *et al.* 2003; Pilon *et al.* 2006; Marinho 2006; Moreira 2007)), pela ligação dos inibidores de proteases a proteases não alvo (Michaud, *et al.*, 1995) ou pela ativação enzimática das tripsina-*like* (Oliveira *et al.*, 1993).

Lagartas de lepidópteros polípagos têm a capacidade de responder a mudanças na qualidade nutricional da dieta e/ou agentes antimetabólicos, como os inibidores de proteases, alterando suas proteases digestivas. As mudanças podem ser qualitativas, caracterizando-se pelo aumento nos níveis de proteases intestinais para manter a digestão nos níveis ideais, ou quantitativas, que incluem a síntese de isoformas insensíveis às quais o inibidor seria incapaz de se ligar e, portanto, inibir (Srinivasan *et al.*, 2006). *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae) é um inseto herbívoro generalista, mas tem o repolho como sua planta hospedeira preferida. Quando alimentadas em dieta protéica contendo inibidor de proteases extraído de folhas de repolho, as lagartas de *T. ni* tiveram sua digestibilidade protéica aumentada devido à síntese de outras proteases (Broadway, 1995).

5.8. Atividade amidásica do intestino médio de *A. gemmatilis*.

Podemos observar na figura 13 que atividade versus concentração de benzamidina mostra uma atividade amidásica crescente somente até a concentração 0,45% e, deste ponto em diante foi decrescente, demonstrando que

benzamidina pode ser uma excelente estratégia no controle de *A. gemmatalis* em plantas de soja da variedade CAC-1.

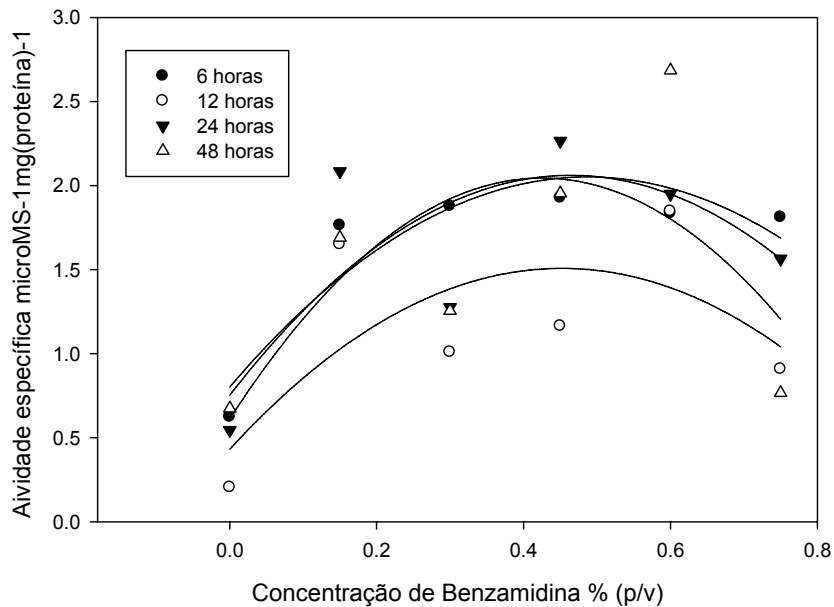


Figura 13 – Atividade Amidásica nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas do extrato do intestino de lagartas *A. gemmatalis* alimentadas de plantas de soja CAC-1 pulverizadas com inibidor de protease benzamidina nas concentrações de benzamidina 0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e 0,75 % (p/v). Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z = 2,20 + 2,44x - 0,06y - 5,03x^2 + 0,0011y^2$ e os parâmetros : $R^2=0,67$, $F_{5,67}=25,82$; $P<0,0001$.

Efeito parecido foi observado por Moreira (2007), que alimentou lagartas *A. gemmatalis* com dieta artificial acrescida do inibidor de serino protease berenil e verificou uma queda na atividade triptica na medida em que se aumentava a concentração do inibidor.

Brodway (1995), estudando as espécies de lepidopteras *Pieris rapae*, *Pieris napi*, *Plutella xylostella*, *Trichoplusia ni*, *Lymantria dispar* e *Helicoverpa zea*, observou que estes insetos apresentaram atividades de tripsina e quimotripsina,

sendo que índices muito maiores de atividade eram atribuídos a tripsinas. Do mesmo modo, inibidores de tripsina mostraram-se muito mais eficientes. Estes resultados sugerem que inibidores de tripsina na defesa de plantas ao ataque de Lepdopteras são muito eficientes, uma vez que a digestão desses insetos é mais dependente de tripsinas-*like*.

Resultado semelhante observou na figura 14, que mostra o perfil de atividade amidásica de lagartas alimentadas com plantas de soja do genótipo TN pulverizadas com o inibidor benzamidina.

Verificamos que esse aumento significativo na biossíntese de tripsinas, sugere que esteja ocorrendo uma hiperprodução de tripsinas *like*. É provável que essas tripsinas sejam sensíveis ao inibidor benzamidina e, para responder à demanda da dieta, a lagarta tenha produzido mais enzimas, o que pode ser observado com aumento da atividade.

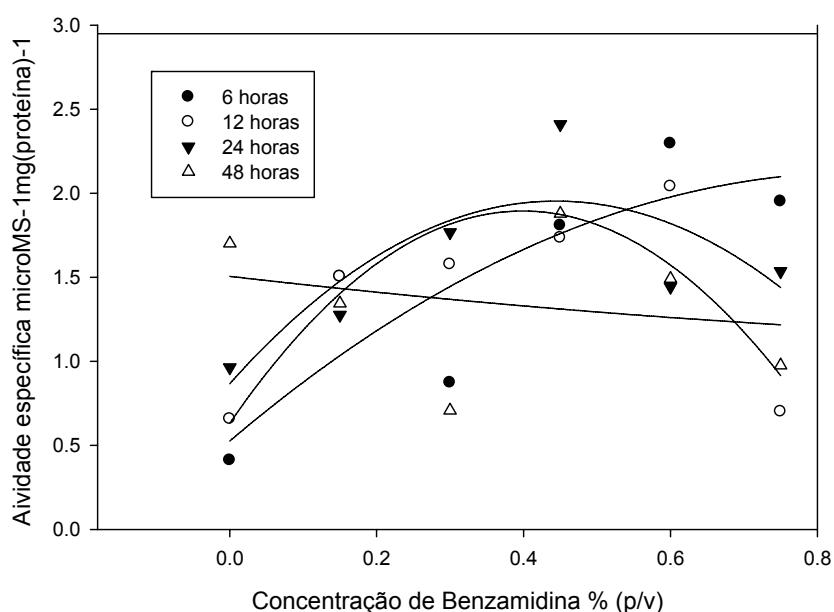


Figura 14 – Atividade Amidásica nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas do extrato de intestino de lagartas *A. gemmatalis* alimentadas de plantas de soja CAC-1 TN pulverizadas com inibidor de protease benzamidina nas concentrações de benzamidina 0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e 0,75 % (p/v). Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis

independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z = 0,78 + 3,60x + 0,01y - 3,85x^2 - 0,0003y^2$ e os parâmetros : $R^2 = 0,29$; $F_{5,67} = 6,95$; $P < 0,0001$.

Zhu–Salzman *et al.* (2003) estudando *C. maculatus*, utilizando cisteíno protease como principal enzima na digestão de proteínas, verificaram que altas concentrações de Soyacistatina N (ScN) na dieta deste inseto, induziam a síntese de cisteíno protease diferenciada e resistente ao inibidor. A síntese de tripsinas insensíveis à ação de inibidores proteolíticos está descrita na literatura como sendo uma estratégia de defesa empregada também por lepidópteros como *Spodoptera frugiperda*, que não teve o seu crescimento e desenvolvimento afetados pela ingestão de inibidor SBTI extraído de sementes de soja (Paulillo *et al.* 2000). Isto foi verificado pelo fato de que expressaram endopeptidases com baixa susceptibilidade ao inibidor, enquanto *H. virescens* produziu isoformas de tripsina ao alimentarem-se em folhas de tabaco (Brito *et al.* 2001), uma de suas plantas hospedeiras caracterizada por conter altos níveis de defesas químicas. A adaptação à ingestão de IP's pela síntese de proteases insensíveis também já foi identificada em outras espécies da família Noctuidae como *Helicoverpa zea*, *T. ni*, *Agrotis ipsilon* e *H. armigera* (Mazundar-Leighton e Broadway, 2001; Chougule *et al.*, 2005, Volpicella *et al.*, 2006).

5.9. Atividade esterásica do intestino médio de *A. gemmatalis*.

Nas figuras 15 e 16, Observa-se que houve uma redução da atividade em todas as concentrações de benzamidina, em relação ao controle, com ausência de benzamidina.

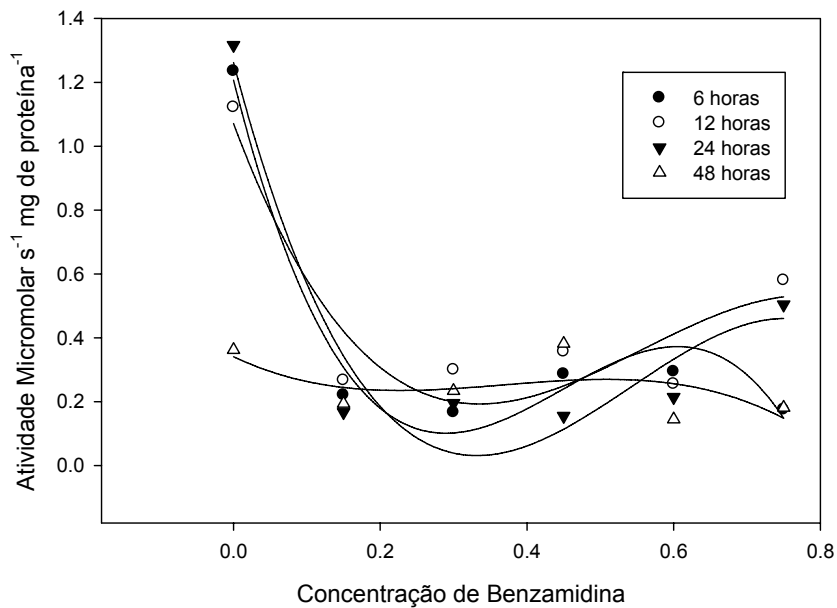


Figura 15 – Atividade esterásica nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas do extrato de intestino de lagartas *A. gemmatalis* alimentadas de plantas de soja CAC-1 pulverizadas com inibidor de protease benzamidina nas concentrações de benzamidina 0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e 0,75 % (p/v). Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z = 0,85 - 3,18x + 0,008y + 3,42x^2 - 0,0002y^2$ e os parâmetros : $R^2 = 0,59$; $F_{5,67} = 24,46$; $P < 0,0001$.

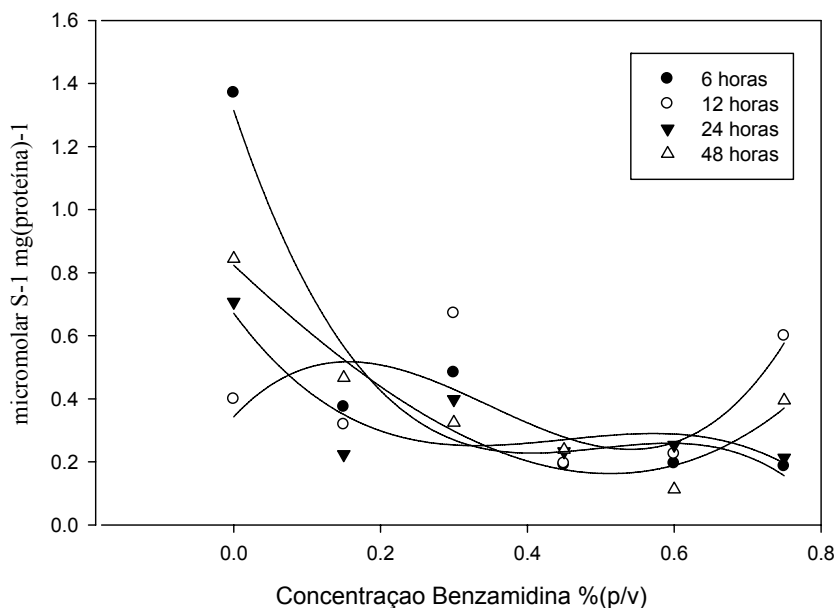


Figura 16 – Atividade esterásica nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas do extrato do intestino de lagartas *A. gemmatalis* alimentadas de plantas de soja CAC-1 TN pulverizadas com inibidor de protease benzamidina nas concentrações de benzamidina 0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e 0,75 % (p/v). Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z = 0,92 - 2,15x - 0,01y + 2,08x^2 + 0,0002y^2$ e os parâmetros : $R^2 = 0,43$; $F_{5,67} = 13,85$; $P < 0,0001$.

Diante dos resultados apresentados, verificamos que houve um decréscimo da atividade trípica e pouca atividade esterásica, o que nos leva a sugerir que *A. gemmatalis* possa estar produzindo outras proteases como forma de defesa à ingestão crônica de benzamidina, como observado em coleópteros os quais apresentam uma reconfiguração da expressão das enzimas digestivas, quando as larvas foram alimentadas em dietas com inibidores de proteases. *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), duas pragas de grãos armazenados, seriam capazes de alterar o perfil de suas enzimas proteolíticas entre aspartil, cisteíno e serino-proteases quando

alimentadas em dietas acrescidas de inibidores de cisteíno e serino-proteases, E-64, KTI e Soyacistatin (Oppert *et al.*, 2005; Zhu-Salzman *et al.*, 2003), ou mesmo reconfigurar a expressão da principal enzima digestiva (Ahn *et al.*, 2007).

5.10. Atividade de cisteíno proteases no intestino médio de *A. gemmatalis*.

Na figura 17 verificamos que houve incremento de atividade de cisteíno protease em todas as concentrações, principalmente nos tempos 6,12 e 48 horas. Embora na figura 18 o teste não tenha sido significativo a 5% de probabilidade verificamos que nos tempos 6 e 12 horas tende a apresentar um aumento na atividade de cisteíno proteases em decorrência da aplicação de benzamidina na concentração de 0,75%.

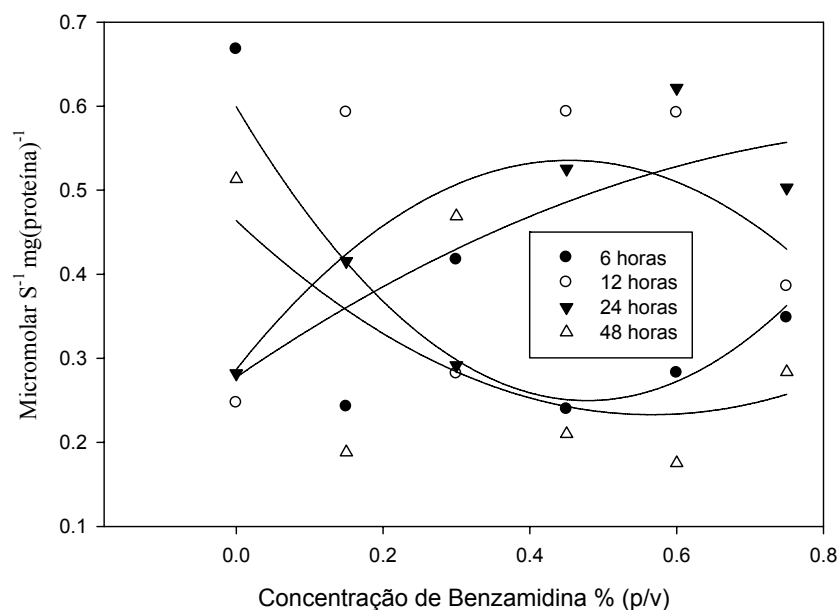


Figura 17 – Atividade de cisteíno protease nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas do extrato do intestino de lagartas *A. gemmatalis* alimentadas de plantas de soja CAC-1 pulverizadas com inibidor de protease benzamidina nas concentrações de benzamidina 0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e 0,75 % (p/v). Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis

independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $z = 0,73 - 0,28x - 0,03y + 1,03x^2 + 0,0006y^2$ e os parâmetros : $R^2 = 0,31$; $F_{5,67} = 7,60$; $P < 0,0001$.

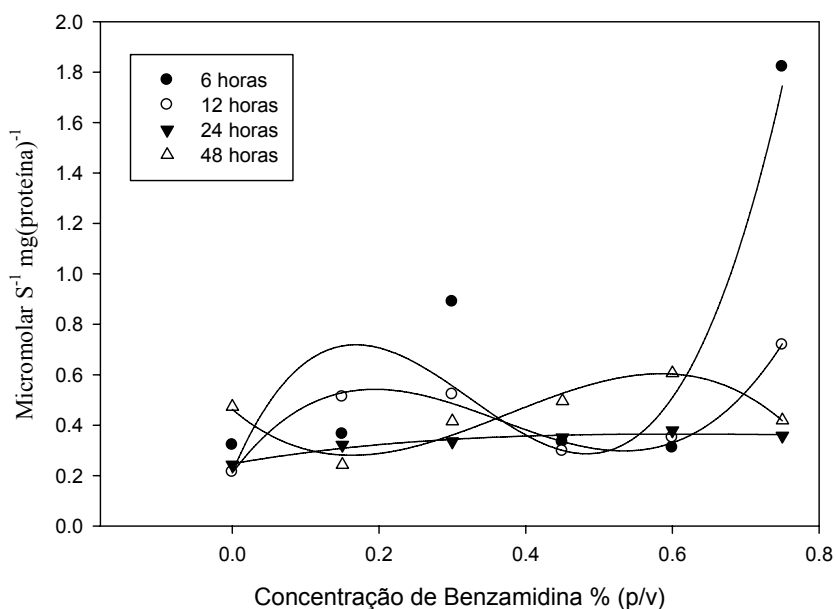


Figura 18 – Atividade de cisteína protease nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas do extrato do intestino de lagartas *A. gemmatilis* alimentadas de plantas de soja CAC-1 TN pulverizadas com inibidor de protease benzamidina nas concentrações de benzamidina 0; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e 0,75 % (p/v). Esses dados foram submetidos à análise estatística de regressão múltipla não linear com duas variáveis independentes (concentração de benzamidina e o tempo) obtendo-se a equação $.z = 0,34 - 0,14x + 0,01y + 0,18x^2 - 0,0002y^2$ e os parâmetros : $R^2 = 0,12$; $F_{5,67} = 2,36$; $P = 0,618$.

Resultados semelhantes foram observados por Marinho (2006) com acréscimo de atividade de cisteína proteases, quando alimentou lagartas de *Thyrintaina leucoceraea* com plantas de eucalipto e goiaba pulverizadas com o inibidor benzamidina. Provavelmente a lagarta da soja esteja produzindo cisteína proteases em presença de inibidor de serino proteases como adaptação. Sendo

inibidas as serino proteases do intestino, o inseto poderia estar produzindo mais serino proteases como também cisteíno proteases para digerir a sua dieta.

Estudos têm indicado que insetos da ordem Coleoptera sintetizam naturalmente mais de uma classe de proteases. Girard e colaboradores (1998) verificaram que *Phaedon cochleariae* na sua digestão proteica utiliza mutiplas enzimas proteolíticas que envolvem endo e exopeptidases. Em gel de atividade, são detectadas duas formas de cisteíno proteases, quatro formas de serino proteases principalmente elastase, e um pequeno residual de atividade atribuída a aspartil proteases. Aspartil e cisteíno proteases foram encontradas em *Leptinotarsa decemlineata* (Thie e Houseman, 1990; Michaud *et al.*, 1995 a) e em larvas de *Phyllotreta cruciferae* (Rymerson e Bodnaryk, 1995). Outros resultados mostram que Coleópteras, na sua digestão proteica, requerem a presença conjunta de aspartil, cisteíno e serino proteases *Callosobruchus maculatus* (Gatehouse e Boulter, 1983; Silva e Xavier-Filho, 1991; Zhu-Salzman *et al.*, 2003) e *Tribolium castaneum* (Liang *et al.*, 1991; Chen *et al.*, 1992; Blanco-Labra *et al.*, 1996). Isso explicaria a adaptabilidade destes insetos a uma diversidade de plantas.

Oliveira *et al.* (2005) descreveram as tripsinas *like* como as principais enzimas digestivas de *A. gemmatalis*, responsáveis pela digestão de proteínas. No entanto, em nossos estudos, verificamos a ocorrência de cisteíno proteases, quando as lagartas são alimentadas com plantas de soja CAC-1 pulverizadas com benzamidina. Verificamos que o aumento de atividade proteásica nas maiores concentrações (0,60 e 0,75%) provavelmente seja devido a atividade esterásica e atividade de cisteíno proteases. Por outro lado, verificamos que, quando lagartas *A. gemmatalis* foram alimentadas com plantas de soja CAC-1 TN pulverizadas com benzamidina nas concentrações (0,60 e 0,75%), não houve variação na atividade de cisteíno proteases, mas ocorreram aumentos nas à atividade amidásica e esterásica, podendo estar havendo um aumento na biossíntese de serino proteases.

6. Conclusões

Plantas CAC-1 e CAC-1 TN responderam de em os todos testes de forma similar, demonstrando que alteração genética no genótipo TN, que promoveu a eliminação dos genes *lox1*, *lox2* e *lox3*, não afetou a biossíntese foliar de inibidores proteolíticos.

Este trabalho permitiu concluir que benzamidina compromete os parâmetros biológicos do inseto, alterando o comportamento de lagartas e mariposas de *Anticarsia gemmatalis*, as quais tiveram preferência alimentar no caso das lagartas e de pouso e oviposição no caso das mariposas, por plantas que não receberam pulverizações com benzamidina. Benzamidina também afetou o desenvolvimento pós-embrionário de *A. gemmatalis* reduzindo o ganho de peso e aumentando a mortalidade.

Plantas pulverizadas com benzamidina respondem com aumento nos níveis inibidores endógenos de plantas de soja CAC-1 e CAC-1 TN. Uma estratégia para o controle de *A. gemmatalis* seria a utilização de plantas geneticamente modificadas expressando maiores concentrações de inibidor ou expressando inibidores mais potentes.

Os experimentos demonstraram que lagartas *A. gemmatalis* apresentaram, como mecanismo de defesa ao inibidor benzamidina, a capacidade de sintetizar cisteíno proteases. Um sistema de controle da lagarta da soja deverá, provavelmente, ser realizado com uma associação de inibidores de serino proteases e de cisteíno proteases.

7. Referências Bibliográficas

- ANDRADE, F.G.; NEGREIRO, M.C.C.; FALLEIROS, Â.M.F. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner,1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). Arq. Inst. Biol.,v.71, p.391-398, 2004.
- BAIRD, I.R.; MOSI, R.; OLSEN, M.; CAMERON, B.R.; FRICKER, S.P.; SKERLJ, R.T. '3 + 1' mixed-ligand oxorhenium(V) complexes and their inhibition of the cysteine proteases cathepsin B and cathepsin K. Inorg. Chim. Acta, 359: 2736–2750. 2006.
- BALDWIN, I.T., 2001. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. Plant Physiol., 127(4): 1449-1458.
- BARBARA, K.A. "Featured Creatures – Velvetbean Caterpillar". University of Florida. Number: EENY-151.September 2000. <http://creatures.ifas.edu/field/velvetbean.Htm> Acesso em outubro de 2001.
- BATISTA, R. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; PIRES, C. V.; PIOVESSAN, N. D.; REZENDE, S. T. & MOREIRA, M. A. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas à aplicação de ácidos graxos poliinsaturados. Pesq. Agrop. Bras., 37 (11): 1517-1524, 2002.
- BIRKETT, M. A., Campbell, C. A. M., Chamberlain, K., Guerrieri E., Hick A. J., Martin, J.L., Matthes M., Napier, J. A., Petterson, J., Pickett, J. A., Poppy G.M., Pow. E. M., Pye, B. J., Smart, L. E., Wadhams, G. H., Wadhams, L.J., Woodcock, C. M. New role for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97: 9329-9334, 2000.
- BLANCO-LABRA, A., Martinez-Gallardo, N.A., Sandoval- Cardoso, L., Delano-Frier, J. Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* larvae (Herbst). Insect. Biochem. Mol. Biol: 95-100, 1996.
- BOLTER, C.J. E JONGSMA, M.A., 1995. Colorado potato beetles (*leptinotarsa decemlineata*) adapt to protease inhibitor induced in potato leaves by methyl jasmonate. J. Insect Physiol. 41: 1071-1078.

- BOLTER, C.J., LATOSZECK-GREEN, M., 1997. Effect of chronic ingestion of the cysteine protease inhibitor, E-64, on Colorado potato beetle gut proteinases. *Entom. Exp. et Appl.* 83(3): 295-303.
- BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochem. and Mol. Biol.*, v.27, p.625-638, 1997.
- BRITO, L.O.; LOPES, A.R.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comp. Biochem. and Physiol., Parte B*, v.128, p.365-375, 2001.
- BROADWAY, R. M. & DUFFEY, S. S. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 32 (10): 827-833, 1986.
- BROADWAY, R. M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *J. Insect Physiol.*, 41: 107-116, 1995.
- BROADWAY, R. M. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 32: 39-53, 1996.
- BROADWAY, R.M., MISSURELLI, D.L., 1990. Regulatory mechanisms of tryptic inhibitory activity in cabbage plants. *Biochem.* 29 (12): 3721-3725.
- BROWN, D. P.; WILKINSON, H. S. & GATEHOUSE, J. A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27: 625-638, 1997.
- CHEN, H., GONZALES-VIGI, E., WILKERSON, C.G., HOWE, GA., 2007. Stability of plant defense proteins in the gut of insect herbivores. *Plant Physiol.* 143(4):1954-1967.
- Chougule, N.P., Giri, A.P., Sainani, M.N., Gupta, V.S., 2005. Gene expression patterns of *Helicoverpa armigera* gut proteases. *Insect Biochem. and Mol. Biol.* 35: 355-367.

- CHRISTELLER, J.T., Farley, P.C., Ramsay R.J., Sullivan, P. A., W. A. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. *Eur. J. Biochem.* 254: 160-167., 1998.
- CHRISTOU, P.; CAPELL, T.; KOHLI,A.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Recent developmets and future prospects in insect pest control in transgenic plants. *Trends in Plant Sci.*, v.11, p.302-308, 2006.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- Conab. 4º Levantamento de grãos 2006/2007- Jan/2007. [26 de janeiro 2007]. (<http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/4levsafra.pdf>).
- DE LEO, F.; BOTTINO, M.B.; CECI, L.R.; GALLERANI, R.; JOUANIN,L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. *Insect Biochem. and Mol. Biol.*, v.31, p.593-602, 2001.
- EISEMANN, CH & RICE, MJ 1985. Oviposition behaviour of *Dacus tryoni*: the effects of some sugars and salts. *Ent. Exp. et Appl.*, 39:61-71.
- EMBRAPA, CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2006. Tecnologia de produção de soja – região central do Brasil 2007. Londrina. 225p.
- EMBRAPA, CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, 2006. Tecnologia de produção de soja – região central do Brasil 2007. Londrina. 225p.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. Recomendações técnicas para cultura da soja na região central do Brasil. Londrina. 245p. 2001.
- ERLANGER, B.F., KOKOWSKY, N., COHEN, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. of Biochem. and Biophy.* 95: 271-278.
- ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. of Biochem. and Biophy.*, 95:271-278, 1961.
- FALCO, M.C., Marbach, P. A. S., Pompermayer, P., Lopes, F.C.C., Silva-Filho, M. C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. *Genet. Mol. Biol.* 24: 113-122, 2001.

- FERREIRA, C. C. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; BRUMANO, M. H. N.; GUEDES, R. N. C.; ALMEIDA, F. T. DE; SILVA, C. H. O. & MOREIRA, M. A. Lack of seed lipoxygenases does not affect soybean defense against removal of reproductive tissue. *Bioscienc. J.*, 21: 49-55, 2005.
- FERREIRA, C. C. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; OLIVEIRA, J. A.; ALMEIDA, F. T. DE; PIRES, C. V.; PIOVESSAN, N. D. & MOREIRA, M. A. Caracterização bioquímica e cinética de lipoxigenases de plantas de soja submetidas a remoção dos primórdios florais. *Cien. e Agrotecnol.*, 28: 263-270, 2004.
- FOISSAC, X.; EDWARDS, M.; DU, J. P.; GATEHOUSE, A. M. R. & GATEHOUSE, J. A. Putative protein digestion in a sapsucking homopteran plant pest (rice brown plant hopper, *Nilaparva lugens*: Delphacidae) – identification of trypsin-like and cathepsin B-like proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 967-978, 2002.
- FOISSAC, X.; EDWARDS, M.; DU, J. P.; GATEHOUSE, A. M. R. & GATEHOUSE, J. A. Putative protein digestion in a sapsucking homopteran plant pest (rice brown plant hopper, *Nilaparva lugens*: Delphacidae) – identification of trypsin-like and cathepsin B-like proteases. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 967-978, 2002.
- FORDYCE, J.A. e AGRAWAL, A. A. The role of plant trichomes and caterpillar group size on growth and defense of the pipevine swallowtail *Battus philenor*. *J. Animal Ecol.* 70: 997-1005, 2001.
- FORTUNATO, F.S., OLIVEIRA, M.G.A., BRUMANO, M.H.N., SILVA, C.H.O., GUEDES, R.N.C., MOREIRA, M.A., 2007. Lipoxygenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis* Hübner). *J. of Pest Science*. (Aceito para publicação)
- FRANCO, O.L., MELO, F.R., SILVA, M.C.M.DA, SÁ, M.F.G.DE., 1999. Inibidores de enzimas digestivas e a obtenção de plantas resistentes. *Biotec., Ciência e Desenvol.* 11: 36-40.
- FRANCO, O.L., RIGDEN, D.J., MELO, F.R., GROSSI-DE-SÁ, M.F., 2002. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylases-structure, function and potential for crop protection. *Eur. J. Biochem.* 269(2): 397-412.

- GATEHOUSE, A. e BOULTER, D. Assessment of the antimetabolic effects of trypsin inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*) and other legumes on development of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. J. Sci. Food Agric. 34: 345-350, 1983.
- GATEHOUSE, A.M.R., NORTON, E., DAVISON, G.M. , 1999. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*: effects on plant protease inhibitors *in vitro* and *in vivo*. J. Insect Physiol., 45(6): 545-558.
- GATEHOUSE, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. New Phytologist, v.156, p.145-169, 2002.
- GILL, I.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; JORBA, X. & VULFSON, E. N. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. Enz. and Microb. Technol., 18: 162-183, 1996.
- GIRARD, C., Le Métayer, M., Zaccomer, B., Bartlet, E., Williams, I., Bonadé-Bottino, M., Pham-delegue, M.H., Jounain, L. Growth stimulation of beetle larvae reared on a transgenic oilseed rape expressing a cysteine proteinase inhibitor. J. Insect Physiol. 44: 263-270, 1998b.
- GIRARD, C., Métayer, M., L., BONADÉ-BOTTINO, M., PHAM-DELÈGUE, M-H., JOUNAIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larval. Insect Biochem. Mol. Biol. 28: 229-237, 1998.
- 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. Arch. Biochem. Biophys. 431(1): 145-159.
- HARUTA, M., Major, J.J., Christopher, M.E., Patton, J.J., Constabel C.P. A kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michxsc.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. Plant Mol. Biol. 46: 347-359, 2001.
- HILDER, V.A.; BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance- a critical review. Crop Protect., v.18, p.177-191, 1999.

- HINDS, W.E., OSTERBERGER, B.A., 1931. The soybean caterpillar in Louisiana. J. Economic Entomol. 24:1168-1173.
- HOFFMANN-CAMPO, C.B., OLIVEIRA, E.B., MOSCARDI, F., 1985. Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). EMBRAPA, Serviço de produção de informação, Brasília. 23p.
- HOLTZ, A.M. Interações tritróficas afetando os surtos de pragas em Myrtaceae. 104p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.
- HUMMEL, B.C.W., 1959. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin and trombin. Canad. J. Biochem. Physiol. 37: 1393-1399.
- JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptations of insects to plant proteinase inhibitors. J. Insect Physiol., v.43, p.885-895, 1997.
- JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.92, p.8041-8045, 1995.
- JOUANIN L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance. Plant Sci. 131:1-11, 1998.
- JUNQUEIRA, R.G., SILVA, E., MARES-GUIA, M. 1992. Competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines. Braz. J. Med. Biol. Research 25 (9): 873-887.
- KAKADE, M.L., RACKIS, J.J., MCGHEE, J.E., PUSKI, G. (1974). Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chem., 51: 376-382.
- KARBAN, R., AGRAWAL, A.A., THALER, J.S., ADLER, L.S., 1999. Induced plant responses and information content about risk of herbivory. TREE 14 (11): 443-7.
- KARBAN, R., BALDWIN, I.T., 1997. Induced responses to herbivory. Chicago University Press, 319 p.

- KLIEBENSTEIN, D. J., Kroymann, J., Brown, P., Figuth, A., Pedersen D., Gershenzon, J., Mitchell-Olds T. Genetic control of natural variation in Arabidopsis glucosinolate accumulation. *Plant Physiol.* 126: 8811-8825, 2001.
- KOGAN, M.; GOEDEN, R. D. The host-plant ranger of *Lema trilineata* Daturaphila (Coleoptera: Crisomelidae). *Annals of the Entomol. Soc. Ame.*, v. 63, n. 4, p. 1175-1180, 1970.
- KOIWA, H., Shade, R.E. Zhu- Salzman, K., D'Urso, M.P., Murdock, L.L., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. A plant defensive cystatin(soyacystatin) targets cathepsin 1-like digestive cysteine proteinases(DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *FEBS Lett.* 471: 67-70, 2000.
- KOIWA, H., Shade, R.E. Zhu- Salzman, K., Subramanian, L., Murdock, L.L., Nielsen,S.S., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. *Plant J.* 14: 371-379, 1998.
- KUNAKBAEVA, Z., CARRASCO, R., ROZAS, I. An approximation to the mechanism of inhibition of cysteine proteases: nucleophilic sulfur addition to Michael acceptors type compounds. *J. Mol. Struct.* 626: 209–216, 2003.
- LAWRENCE, P.K.; KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.5, p93-109, 2002.
- LEE, M.J. & ANSTEE, J.H. Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* includes a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 25 (1): 49-61, 1995.
- LEMOS, F.J.A.; TERRA, W.R. A high yield preparation of *Musca domestica* larval midgut microvilli and the subcellular distribution of amylase and trypsin. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v.22, p.433-438, 1992a.
- LIANG, C., Brookhart, G. Feng, G.H., Reeck, G. R., Kramer, K. J. Inhibition of digestive proteinases of stored grain Coleoptera by oryzacystatin, a cysteine proteinase inhibitor from rice seed. *FEBS Lett.* 278: 139-142, 1991.
- LIN, H. M.; FISCHER, D. Induced resistance in soybean to the Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae): comparisons of inducing fators. *Environm. Entomol.*,

v. 19, p.1852-1857, 1990.

LOPES, A.R.; JULIANO, M.A.; JULIANO, L.; TERRA, W.R. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, v.55, p.140-152, 2004.

MAGRINI, E.A., BOTELHO, P.S.M., SILVEIRA NETO, S., 1999. Biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) in the soybean crop. *Scientia agricola* 56(3): 547-555.

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. *J. Biolog. Chem.*, 240: 1579-1585

MARES-GUIA, M.; ROGANA, E.; AMORIN, A.F.; MAGALHÃES-ROCHA, N.M. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. *J. Biolog. Chem.* 256: 1661-1668, 1981.

MARINHO, J.S. Viçosa: Resposta Bioquímica de Lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* (Lepidoptera: Geometridae), Submetidas ao Inibidor de Serino-Proteases BenzamidinaUFV, 2006. 62p. Dissertação (Mestrado em Entomologia)- Universidade Federal de Viçosa, 2006.

MAZUMDAR-LEIGHTON & BROADWAY, R. M. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 645-657, 2001.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S.; BABU, C. R. & BENNETT, J. Identification of novel serine proteinase gene transcripts in the midguts of two tropical insect pests, *Scirpophaga incertulas* (Wk) and *Helicoverpa armigera* (Hb). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30: 57-68, 2000.

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

MELLO, M.O., SILVA-FILHO, M.C., 2002. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian J. Plant Physiol.* 14(2): 71-81.

- MICHAUD D. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. Trends Biotechnol. 15: 4-6, 1997.
- MICHAUD D., Bernier-Vadnais N., Overney S. and Yelle S. Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the Colorado potato beetle. *Leptinotarsa decemlineata* say (coleoptera: Chrysomelidae). Insect Biochem. Mol. Biol. 25: 1041-1048, 1995.
- MIURA, E.M.Y.; BINOTTI, M.A.R.; CAMARGO, D.S.; MIZUBUTI, I.Y.; IDA, E.I. Avaliação biológica de soja com baixas atividades de inibidores de tripsina e ausência do inibidor Kunitz. Arch. Latinoamericanos de Nutrição 2001, vol 51, n. 2, p.1-8.
- MONTEIRO, M.R.P., COSTA, N.M.B., OLIVEIRA, M.G.A., PIRES, C.V., MOREIRA, M.A., 2004. Qualidade protéica de linhagens de soja com ausência do inibidor de tripsina Kunitz e das isoenzimas lipoxigenases. Rev. de Nutrição da PUECAMP 17(2): 195-205.
- MOREIRA, L.F. Viçosa: Eficiência Alimentar, Atividade Proteolítica e Desenvolvimento Pós-Embrionário de *Anticarsia Gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) Exposta ao Inibidor de Serino-Proteases, Bis-Benzamidina UFV, 2007. 85p. Dissertação (Mestrado em Entomologia)-Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- MUHARSINI, S.; DALRYMPLE, B.; VUOCOLO, T.; HAMILTON, S.; WILLANDSEN, P. & WIJFFELS, G. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae *Chrysomya bezziana*, the old screwworm fly. Insect Biochem. Mol. Biol., 31: 1029-1040, 2001.
- MURDOCK, L.L., SHADE, R.E., 2002. Lectins and protease inhibitors as plant defense against insects. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50(22): 6605-6611.
- NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by lepidoptera. Annu. Rev. Entomol. 47: 57-92, 2002.
- OHTA, H.; IDA, S.; MIKAMI, B.; MORITA, Y. Changes in lipoxigenase components of rice seedling during germination. Plant Cell Physiol.. 22(5): 911-918, 1986.

- OLIVEIRA, C.L. Viçosa: EFEITO DO INIBIDOR DE PROTEASE, BENZAMIDINA, NO FORRAGEAMENTO DE *Thyrinteina leucoceraea* E NO SEU PREDADOR *Podisus nigrispinus*. UFV, 2006. 51p. Dissertação (Mestrado em Entomologia)- Universidade Federal de Viçosa, 20067.
- OLIVEIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. & SOARES, M. J. Morphology and preliminary enzyme characterization of the salivary glands from the predatory bug *Podisus nigrispinus*. Bull. Entomol. Research, 96: 1-8, 2006.
- OLIVEIRA, M. G. A.; DE SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P. & GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. Comparative Biochem. and Physiol., 140 (B): 369-380, 2005.
- 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. J. Biol. Chem. 268(4): 26893-26903.
- ORR, G.L., Strickland, J.A., Walsh, T.A. Inhibition of *Diabrotica* larval growth by a multicystatin from potato tubers. J. of Insect Physiol. 40: 893-900, 1994.
- PANDA, N. e KHUSH, G. S. Host plant resistance to insects. C.A.B. International, Wallingford, 1995.
- PATANKAR, A. G., Giri, A. P., Harsulkar, A. M., Sainani, M. N., Deshpande, V. V., Ranjekar, P. K., Gupta, V. S. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. Insect Biochem. Mol. Biol. 31: 453-464, 2001.
- PAULILLO, L.C.M.S.; LOPES, A.R.; CRISTOFOLETTI, P.T.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA- FILHO, M.C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidade) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. J. Econ. Entomol., v.93, p. 892-896, 2000.
- 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 Biochem. Physiol. 86(1): 23-29.

- POMPERMAYER, P., Terra W. R., Parra J. R. P., Falco M.C., Silva-Filho M.C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. Entomol. Exp. Appl. 99: 79-85, 2001.
- RAKWAL R. e AGRAWAL G.K., Jwa N.S. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2 A inhibitors. Gene. 263: 189-198, 2001.
- ROBERTS, P. e GUILLEBEAU, P. "Velvetbean caterpillar- *Anticarsia gemmatilis* (Hübner)." The University of Georgia Entomology: Georgia IPM- integrated pest management. 1999". <http://www.gaipm.org/top50/velvetbean.html>. Acesso em outubro de 2001.
- ROY I. e GUPTA M. N. Purification of a "double-headed" inhibitor of alpha-amylase/proteinase K from wheat germ by expanded bed chromatography. Bioseparation. 9: 239-245, 2000.
- RUPPERT, E.E. e BARNES, R.D. Zoologia de invertebrados. Sexta edição. São Paulo. Roca. p 804-840, 1996.
- RYAN, C. A. Proteinase inhibitors in plant leaves a biochemical model for pest-induced natural plant protection. TIBS, July 1978. p. 148-50.
- RYAN, C.A. Genes for improving defences against insects and pathogens. Annu. Rev. Phytopathol., 92: 245-449, 1990.
- RYMERSON, R.T., e BODNARYK, R.P. Gut proteinase activity in insect pests of canola. Can. Ent. 127: 41-48, 1995.
- SAKAL, E.; APPLEBAUM, S. W. & BIRK, Y. Purification and characterization of *Locusta migratoria* chymotrypsin. Int. J. Pept. Prot. Res., 32: 590-598, 1988.
- SALES, M.P., GERHARDT, J.R., GROSSI-DE-SÁ, M.F., XAVIER-FILHO, J., 2000. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? Plant Physiol. 124(2): 515-522.
- SANTOS, C. D.; RIBEIRO, a. F. & TERRA W. R. Differential centrifugation, calcium

- precipitation and ultrasonic disruption of midgut cells of *Erinnyis ello* caterpillars. Purification of cell microvilli and interferences concerning secretory mechanisms. *Canadian J. of Zool.*, 64: 490-500, 1986.
- SCOTT J.G. e WEN Z. M. Cytochromes P₄₅₀ of insects: the tip of the iceberg. *Pest Manag. Sci.* 57: 958-967, 2001.
- SILVA C. P. e XAVIER-FILHO J. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus Maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 99B: 529-533, 1991.
- SILVA C. P., Terra W. R., De Sá M. F. G., Samuels R. I., Isejima E. M., Bifano T.D., Almeida J.S. Induction of digestive α - amylases in larvae of *zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α - amylases inhibitor 1. *J. Insect Physiol.* 47: 1283-1290, 2001.
- 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 Agrotec.* 28(2): 409-416.
- 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. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatilis* Hübner.) *Arq. Inst. Biol.*, v.69, p.67-74, 2002.
- SILVA-FILHO, M.C.; FALCO, M.C. Interação planta inseto- Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidas pelas plantas. *Biotecnologia-Ciência e Desenvolvimento*, v.12, p.38-42, 2000.
- SIPOS, T. & MERKEL, J. R. An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. *Biochemistry*, 9 (14): 2766-2775, 1970.
- SMITH, M. C. Expression, mechanisms and chemistry of resistance in soybean, *Glycine max* (L.) Merr. to the soybean looper, *Pseudoplusia includens* (Walker). *Insect Sci. Appl.*, Nairobi, v. 6, n. 3, p. 243-248, 1985.
- SMITH, P.K., KROHN, R.I., HERMANSON, G.T., MALLIA, A.K., GARTNER, F.H.,

- PROVENZANO, M.D., FUJIMOTO, E.K., GOEKE, N.M., OLSON, B.J., KLENK, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.*, 15:76-85.
- SRINIVASAN, GIRI, A.P.; GUPTA, V.S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. *Cellular & Molecular Biology Letters*, v.11, p.132-154, 2006.
- TARRAGÓ, M.F.S., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, S., BARBIN, D., 1977. Influência de fatores ecológicos na flutuação populacional das lagartas da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner e *Rachiplusia nu* (Guen) em Santa Maria-RS. *Anais da sociedade Entomológica do Brasil* 6(2):180-193.
- TERRA, W., FERREIRA, C., BAKER, J.E., 1996. Digestive enzymes. In: Lehane, M. J. and Billingsley, P. F. (eds) *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, Cambridge, pp. 206-235, 1996.
- TERRA, W.R., FERREIRA, C., 2000. A digestão dos insetos. In: Medeiros, M.A. *As pragas também morrem pela boca*. *Pesquisa Fapesp* 54:20-27.
- TERRA, W.R., FERREIRA, C.; BAKER, J.E. Compartmentalization of digestion. In: Lehane, M.J.; Billingsley, R.F., *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, London, p.206-231, 1996a.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, v.109B, p.1-62, 1994.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; JORDÃO, B.P.; DILON, R.J. Digestive enzymes. In: Lehane, M.J.; Billingsley, R.F., *Biol. Insect Midgut*. Chapman & Hall, London, p.154-194, 1996b.
- THIE N. M. R. e HOUSEMAN J. G. Identification of cathepsin B, D, and H in the larval midgut of Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera Chrysomelidae). *Insect Biochem.* 20: 313-318, 1990.
- TIFFIN P. e GAUT B. S. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip 1 in zea and related genera. *Mol. Biol. Evol.* 18: 2092-2101, 2001.

- TIFFIN P. e GAUT B. S. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip 1 in zea and related genera. *Mol. Biol. Evol.* 18: 2092-2101, 2001.
- TOMARELLI, R.M., CHARNEY, J., HARDING, M.L. 1949. *J. Lab. Clinical Med.* 34: 428.
- TROWBRIDGE, C. G.; Krehbiel, A., Laskowshi, M. Jr. Substrate activation of trypsin. *Biochem.*, 2 : 843-50, 1963.
- VALUEVA, T.A., MOSOLOV, V.V., 2004. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochem.* 69 (11): 1305-1309.
- VISOTTÔ, L.E. Viçosa: FUNÇÃO BIOQUÍMICO-CINÉTICA E FISIOLÓGICA DE ENZIMAS DIGESTIVAS PRODUZIDAS PELA MICROBIOTA PRESENTE NO TRATO INTESTINAL DE *Anticarsia gemmatalis* ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE INTERAÇÃO PLANTA-INSETO. UFV, 2007. 88p. Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola)-Universidade Federal de Viçosa, 2007.
- VOLPICELLA, M.; CECI, L.R.; CORDEWENER, J.; AMERICA, T.; GALLERANI, R.; BODE, W.; JONGSMA, M.A.; BEEKWILDER, J. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. *Eur. J. Biochem.*, v.270, p.10-19, 2003.
- WAGNER, W.; MÖHRLÉN, F. & SCHNETTER, W. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Mellontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 32: 803-814, 2002.
- WALLING, L.L., 2000. The myriad plant responses to herbivores. *J. Plant Growth Regulation* 19(2): 195-216.
- WATERS, D.J., BARFIELD, C.S., 1989. Larval development and consumption by *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) fed various legume species. *Environm. Entomol.* 18(6): 1006-1010.
- WATSON, J.R., 1916. Life history of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *J. Econ. Entomol.* 9: 521-528.

- WHITAKER, J. R. Principles of enzymology for the food sciences. New York: M. Dekker, 1994. 625 p.
- WILLE, J.E., 1943. Entomologia Agricola del Peru. Estacion Experimental Agricola de la Molina. 468p.
- WILSON, I.; VOGEL, J. & SOMERVILLE, S. Signalling pathways: A common theme in plants and animals? Current Opinion in Biol., 7 (3): 175-178, 1997.
- WOLFSON, J.L., Murdock, L.L. Suppression of larval Colorado potato beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. Entomologia Exp. Appl.. 44: 235-240, 1987.
- WOLFSON, J.L., Murdock, L.L.. Diversity in digestive proteinase activity among insects. J. Chem. Ecol. 16: 1089-1102, 1990.
- XAVIER, L.P. Viçosa: Caracterização Bioquímica de Proteases do Intestino de *Anticarsia gemmatalis* Envolvidas no Mecanismo de Interação Planta-Inseto. UFV, 2002. 84p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Viçosa, 2002.
- XAVIER, L.P.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, A.V. & DE SIMONE, S.G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). Europ J. Biochem., 102: 147-153, 2005.
- XAVIER-FILHO, J. & CAMPOS, F. A. P. Proteinase inhibitors. In CHEECKE, P. R. (Ed) Toxicants of Plant Origin. Boca Raton, CCR Press. v. 3, 1-27, 1989.
- ZANGERL A. R. Furanocoumarin induction in wild parsnip: evidence for a induced defense against herbivores. Ecology. 71: 1926-1936, 1990.
- ZHAO, Y., Botella, M.A., Subramanian, L., Niu, X.M., Nielsen, S.S., Bressan, R.A. and Hasegawa, P.M. Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. Plant Physiol. 111: 1299–1306, 1996.
- ZHU-SALZMAN, K., Koiwa,H., Salzman, R.A., Shades, R.E. e Ahn, J.E. 2003. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to

overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Mol. Biol.* 12(2): 135-145.