

Anderson Martins Pilon

**RESPOSTA BIOQUÍMICA DA LAGARTA DA SOJA AO
INIBIDOR DE PROTEASE BENZAMIDINA E SEUS
EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO**

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

Viçosa
Minas Gerais - Brasil
2004

Anderson Martins Pilon

**RESPOSTA BIOQUÍMICA DA LAGARTA DA SOJA AO
INIBIDOR DE PROTEASE BENZAMIDINA E SEUS
EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO**

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

APROVADA: 11 de fevereiro de 2004.

Prof. Raul Narciso C. Guedes
(Conselheiro)

Prof. José Eduardo Serrão
(Conselheiro)

Prof^a. Geralda Aldina R. D. Cruz

Dr^a Maria Helena N. Brumano

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

Viçosa
Minas Gerais - Brasil
2004

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.

À CAPES e ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo.

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

Ao professor José Eduardo Serrão, pela colaboração e pelo incentivo na execução deste trabalho.

Ao professor José Cola Zanúncio, pelo espaço cedido e equipamentos disponibilizados para a viabilização do trabalho na criação e manutenção dos insetos no Laboratório de Controle Biológico de Insetos.

A professora Geralda Aldina Rodrigues Dias da Cruz e à doutora Maria Helena Nasser Brumano, pela colaboração e pelo incentivo na execução deste trabalho.

Ao professor José Humberto Queiroz, pelo espaço cedido e equipamentos disponibilizados junto ao laboratório de análises bromatológicas para a viabilização do trabalho.

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

À minha namorada Ana Rute Sales, pelo incentivo, companheirismo e amor, durante todo o decorrer deste curso.

Aos meus companheiros e amigos de república, José Barbosa e Pedro Good God pelas críticas e sugestões durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos Christiano, Luciana, Liliane, Jander, Pedro, Toninho, Alessandro, Arlindo, Bilica, Eduardo, Gisele, Lilian, Angélica, Newton, Anderson, Márcio, Inês, 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 10 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 setembro de 2002, iniciou o curso de Mestrado em Bioquímica Agrícola na UFV, submetendo-se à defesa de tese em 11 de fevereiro de 2004.

ÍNDICE

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. INTERAÇÃO INSETO-PLANTA.....	04
2.2. INIBIDORES DE PROTEASES.....	07
2.3. INIBIDORES DE SERINO PROTEASES.....	11
2.3.1 BENZAMIDINA.....	13
2.4. INIBIDORES DE CISTEÍNO PROTEASES.....	13
2.5. <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner).....	15
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1. CRIAÇÃO DA LAGARTA DA SOJA.....	20
4.2. PREPARO DA DIETA ARTIFICIAL.....	21
4.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	22
4.4. DIGESTIBILIDADE.....	22
4.5. OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DO INTESTINO MÉDIO DE LARVAS DE <i>A. gemmatalis</i>	23
4.6. ATIVIDADE PROTEÁSICA.....	24
4.7. ATIVIDADE AMIDÁSICA.....	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1. CONSUMO DE DIETA ARTIFICIAL.....	25
5.2. DIGESTIBILIDADE PROTEICA.....	27
5.3. CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE <i>A. gemmatalis</i> ALIMENTADA COM INIBIDOR DE PROTEASE.....	29
5.4. DURAÇÃO DE CICLO LARVAL.....	32
5.5. MORTALIDADE DE LARVAS <i>A. gemmatalis</i>	34
5.6. PUPAÇÃO DE <i>A. gemmatalis</i>	35

5.7. ATIVIDADE PROTEOLÍTICA.....	38
5.8. ATIVIDADE AMIDÁSICA.....	41
6. RESUMO E CONCLUSÕES.....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
8. APÊNDICE	61

Resumo

PILON, Anderson Martins, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2004. **Resposta bioquímica da lagarta da soja ao inibidor de protease benzamidina e seus efeitos no desenvolvimento pós-embriônico.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Conselheiros: Raul Narciso Carvalho Guedes, Maurílio Alves Moreira e José Eduardo Serrão.

Dos seres vivos existentes, 72% são insetos, sendo que 50% destes são fitófagos. 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 por 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.

Plantas de soja atacadas por larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) induzem, através da via das lipoxigenases, o aumento na síntese de inibidores de proteases, como uma forma de defesa ao ataque do inseto (FORTUNATO, 2001). Este inseto apresenta proteases tripsinas-like como enzimas digestivas (XAVIER, 2002). Tomando conhecimento destas informações e por ser a soja uma importante cultura para a economia brasileira, buscamos realizar a caracterização bioquímica e fisiológica do efeito do inibidor de tripsina benzamidina na digestibilidade protéica, crescimento e desenvolvimento de *Anticarsia gemmatalis*.

Neste sentido, o presente trabalho baseou-se na determinação da digestibilidade e os efeitos no crescimento e desenvolvimento de larvas de *A. gemmatalis*, assim como a avaliação da atividade das proteases digestivas presentes no intestino médio da lagarta, quando alimentadas com o inibidor de

tripsina benzamidina nas concentrações 0; 0,25; 0,50 e 0,75 (% p/p de dieta artificial). Verificamos, através do teste de Tukey ($p < 0,05$), 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. Verificamos que tanto a atividade proteolítica quanto a atividade amidásica apresentaram maiores índices em lagartas de 5^o instar. Observamos também que a presença do inibidor alterou os perfis de atividades, sugerindo que os insetos, após a ingestão alta de inibidores de proteases, podem apresentar respostas de defesa através da hiperprodução de proteases sensíveis à benzamidina e/ou síntese de proteases insensíveis ao inibidor. Portanto, estes dados sugerem que a utilização de inibidores de protease possa ser uma estratégia promissora no controle de *Anticarsia gemmatilis* na cultura da soja.

Abstract

PILON, Anderson Martins, M.S., Federal University of Viçosa, February of 2004. **Biochemical answer of the soy caterpillar to the inhibitor of protease benzamidine and its effects in the post-embryonic development.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Committee members: Raul Narciso Carvalho Guedes, Maurílio Alves Moreira and José Eduardo Serrão.

From the existent beings living creatures, 72% are insects, and 50% of these are phytophagous. In the co-evolution between plants and insects, the plants developed defense mechanisms against the attack of insects. Among these mechanisms stand out the production of protease inhibitors. It is postulated that, when a plant is attacked or wounded, it propitiates an increase in the levels of proteases inhibitors in the wounded area (local answer) and or for the whole plant (systemic answer). In this interaction insect-plant, the insects can develop defense mechanisms against the proteases inhibitors produced by the plant. This possibility demands an elaborated knowledge of the behavior of the proteolytic enzymes of the medium intestine of the insects, starting from the chronic ingestion of protease inhibitors in the moment of the attack to the plant.

Soy plants attacked by larvas of *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) they induce, through the lipoxigenases way, the increase in the synthesis of proteases inhibitors, as a defense form to the attack of the insect (FORTUNATO, 2001). This insect presents proteases trypsin-like as digestive enzymes (XAVIER, 2002). Becoming aware of these informations and for being the soy an important culture for the Brazilian economy, we tried to accomplish the biochemical and physiologic characterization of the effect of the inhibitor of trypsin benzamidine in the proteic digestibility, growth and development of *Anticarsia gemmatalis*.

In this way, the present work based on the determination of the digestibility and the effects in the growth and development of larvas of

Anticarsia gemmatalis, as well as the evaluation of the activity of the present digestive proteases in the medium intestine of the caterpillar, when fed with the inhibitor of trypsin benzamidine in the concentrations 0; 0,25; 0,50 and 0,75 (% p/p of artificial diet). It was verified, through the test of Tukey ($p < 0,05$), that the benzamidine addition altered the digestibility of the proteic food significantly. Such alteration is correlated with negative impacts caused in the larval phase of that insect, such as increase of the larval cycle, decrease of weight gain and increase of the mortality. It was verified that not only the proteolytic activity but also the starch activity presented larger indexes in caterpillars of 5th urge. It was also observed that the presence of the inhibitor altered the profiles of activities, suggesting that the insects, after the high ingestion of proteases inhibitors, they can present defense answers through the hyper-production of sensitive proteases to the benzamidine and/or synthesis of insensitive proteases to the inhibitor. Therefore, these data suggest that the use of protease inhibitors can be a promising strategy in the control of *Anticarsia gemmatalis* in the culture of the soy.

RESPOSTA BIOQUÍMICA DA LAGARTA DA SOJA AO INIBIDOR DE PROTEASE BENZAMIDINA E SEUS EFEITOS NO DESENVOLVIMENTO PÓS-EMBRIONÁRIO

1. Introdução

Na agricultura mundial as perdas devido ao ataque de insetos perfaz um total de 20% (ROBINSON, 1996). Na tentativa de controlar o ataque de insetos-praga, têm-se utilizado intensivamente agroquímicos, os quais, apesar de manterem a produtividade, causam sérios danos ao meio ambiente e ao homem. Anualmente são gastos com pesticidas mais de 10 bilhões de dólares (KHUSH, 1999). Portanto devemos procurar métodos mais econômicos e menos danosos de controle, sendo a exploração dos mecanismos fisiológicos de defesa da planta uma alternativa potencial.

As plantas possuem um complexo sistema de autodefesa contra patógenos e herbívoros. Algumas das defesas químicas são constitutivas formando barreiras físicas ou biológicas contra os organismos invasores, outras são ativas sendo induzidas por ataque à planta. A resposta ao dano pode ser local ou sistêmica na planta, sendo que muitos destes compostos químicos de defesa são denominados “metabólitos secundários” e produzidos a partir de uma via biossintética especializada. Entretanto algumas moléculas ativas na planta possuem papéis primários na defesa, como os inibidores de protease e lectinas, que funcionam também como proteínas de reserva em sementes, e complexos estruturais, como, a lignina presente em parede celular (RYAN e JAGENDORF, 1995).

É postulado que inibidores de proteases têm função de proteger plantas contra danos causados por vários tipos de insetos, inibindo significativamente atividades proteolíticas de proteases presentes no intestino dos insetos (HILDER

et al., 1987, RYAN, 1990). Quando ocorrem ferimentos em folhas ocorre um grande aumento, pela planta, da síntese de inibidores de proteases no local do ferimento (resposta local), e também por toda a planta (resposta sistêmica) (FARMER e RYAN, 1992). Diversos compostos identificados em plantas que podem regular a expressão dos genes que codificam inibidores de proteases são induzidos por ferimentos; dentre eles estão os oligouronídeos, ácido abscísico, metil jasmonato, ácido jasmônico e a sistemina.

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

As plantas sintetizam diversos inibidores do tipo serino-proteases os quais podem ser divididos em oito famílias: Bowman-Birk, Kunitz, Potato I, Potato II, Curcubita, Superfamília dos cereais, Ragi e família Thaumatin PR-like (RICHARDSON, 1991). Os mais estudados e melhor descritos são os inibidores de tripsina: tipo Kunitz, encontrado em soja; Bowman-Birk; Potato I e Potato II encontrados em tecidos de batata. O significado fisiológico dos inibidores de serino-proteases estão associados a três principais funções nas plantas: regulação de proteinases endógenas, reserva de aminoácidos sulfurados e defesa química.

Considerando o efeito antinutricional dos inibidores, a avaliação da eficiência destes para a produção de plantas resistentes a pragas tem despertado grande interesse. Porém, a eficácia do controle de pragas dependerá do grau de vulnerabilidade da praga em relação ao inibidor, e isto se baseia na importância da proteína-alvo para o ciclo de vida da praga, na eficiência da inibição dessa proteína e na capacidade adaptativa do inseto em resposta a esta ação (KOIWA *et al.*, 1998). Um número crescente de trabalhos têm mostrado que os insetos são capazes de se adaptarem à presença dos

inibidores produzidos pelas plantas (JONGSMA et al., 1995; MICHAUD, 1997; JONGSMA e BOLTER, 1997). Os mecanismos envolvidos neste processo têm despertado muito interesse no meio científico e têm sido tema de trabalhos recentes (PAULLILO et al., 2000; BRITO et al., 2001 e ZHU- SALZMAN et al., 2003).

Na tentativa de controlar o ataque de pragas, têm-se buscado novos métodos que não sejam baseados em agroquímicos, que apesar de aumentar a produtividade, causam sérios danos ao meio ambiente e ao homem. Resistência a pragas está presente em algumas variedades de soja. Vale ressaltar que essa resistência não proporciona uma completa proteção, apenas diminui o consumo da soja pela lagarta que passa a consumí-la lentamente. Neste processo há uma diminuição no ganho de peso da lagarta e conseqüentemente a taxa de crescimento no próximo estágio estará diminuída (BEACH & TODD, 1988).

A utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas para a obtenção de plantas resistentes contra o ataque de insetos é uma estratégia promissora. Entretanto, se fazem necessários estudos que levem em consideração a fisiologia e a bioquímica da digestão dos inibidores pelo inseto. 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 o estudo da digestibilidade protéica da lagarta da soja após ingestão crônica do inibidor de serino protease (benzamidina) e sua relação com possíveis alterações no desenvolvimento e crescimento do inseto. Verificamos o perfil enzimático das proteases digestivas do intestino médio, buscando uma melhor compreensão da bioquímica e fisiologia do inseto durante o mecanismo de interação planta-inseto.

2. Revisão de Literatura

2.1. Interação Inseto-Planta

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 diferentes mecanismos de defesa contra o ataque dos insetos, que incluem 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 1).

Em resposta aos mecanismos de defesa das plantas os insetos desenvolveram estratégias para contornar as barreiras impostas pelas plantas, as quais 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 1).

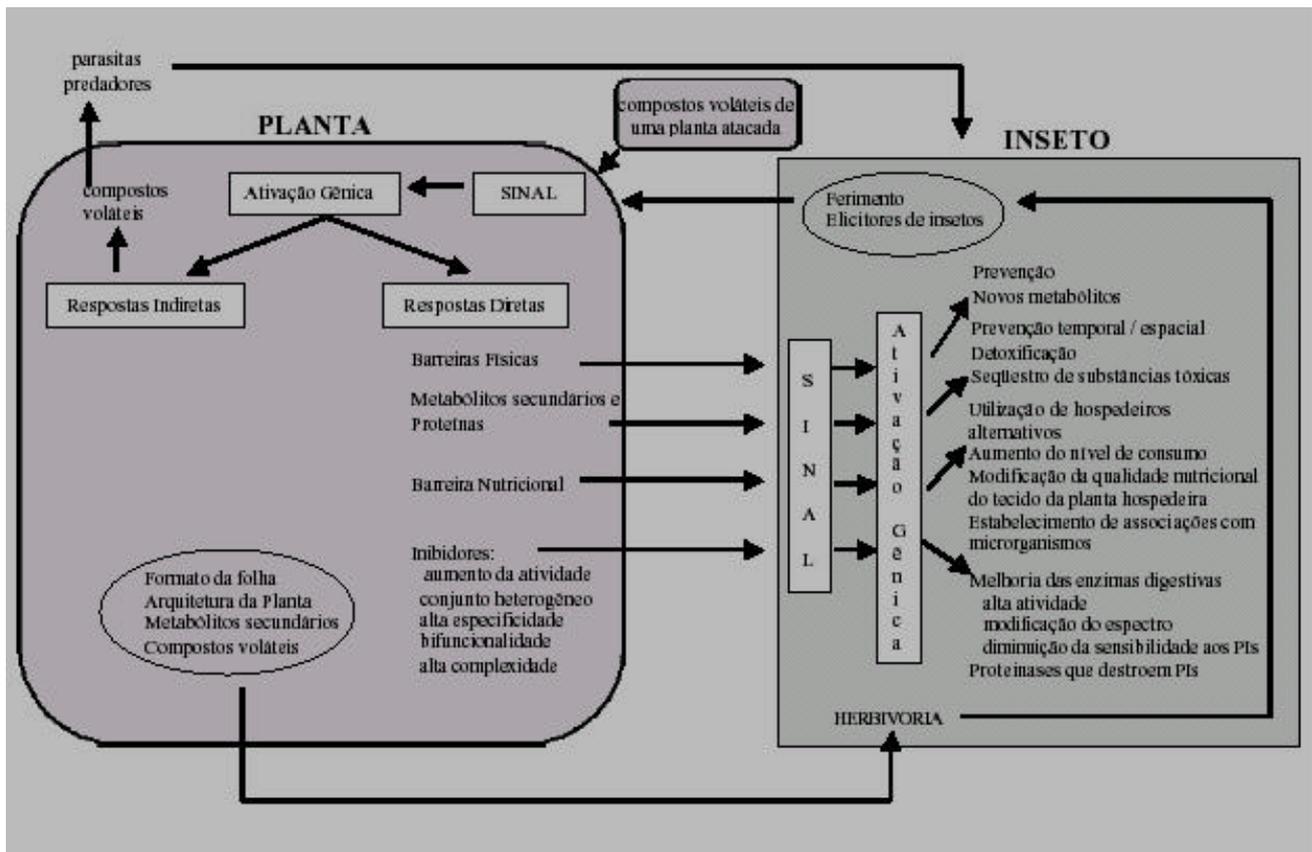


Figura 1 – Interações entre plantas e insetos
 Fonte: MELLO & SILVA-FILHO, 2002.

As proteínas de defesa demonstram ser uma excelente estratégia de controle. Estas podem ser produzidas constitutivamente em tecidos os quais 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 a mamíferos o que indica que devam ser cautelosamente estudadas para o uso como mecanismo de proteção de plantas a insetos (SILVA-FILHO & FALCO, 2000). Entre as proteínas estão incluídas enzimas tais 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 foi verificada-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, o qual influencia no seu crescimento e desenvolvimento, podendo eventualmente ocasionar sua morte devido a 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). Ao tornarem prolongado o desenvolvimento dos insetos herbívoros, os inibidores de protease prolongam o período em que os inimigos naturais (predadores) podem ser atraídos para a planta atacada por meio 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 (polípagos), 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 & 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. Os insetos após ingestão de inibidores de proteases que poderiam sofrer impactos negativos no seu desenvolvimento, 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), a 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 a diminuição da sensibilidade das enzimas aos inibidores através da formação de oligomêros 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), a expressão de inibidores específicos para as enzimas do trato digestivo dos insetos (FALCO et al., 2001) e a síntese de inibidores resistentes a proteólise e ativos sob várias condições de pH no trato digestivo (CHRISTELLER et al., 1998).

2.2. Inibidores de Proteases

É postulado que os inibidores de proteases atuam no mecanismo de defesa de plantas contra infestação de insetos e patógenos. Quando ocorrem ferimentos em folhas de plantas, ocorre rapidamente síntese de inibidores de proteases no local do ferimento (resposta local), como também em folhas mais distantes (resposta sistêmica) (FARMER e RYAN, 1992). Diversos compostos

identificados em plantas que podem regular a expressão dos genes que codificam os inibidores de proteases são induzidos por ferimentos; dentre eles estão os oligouronídeos, o ácido abscísico, o metil jasmonato, o ácido jasmônico e a sistemina. Os inibidores de proteases representam cerca de 6% das proteínas presentes no grão de soja (BRANDON et al., 1987)

Os inibidores de protease exercem uma importante função de defesa das plantas (RYAN, 1990). Danos causados em folhas de tomateiro por insetos mastigadores ou por outros meios mecânicos resultam numa rápida ativação transcricional de inibidores de proteases. O modelo proposto por FARMER e RYAN (1992) para genes que codificam inibidores de proteases em tomateiro mostra que um sinal sistêmico é aparentemente necessário para a indução desses genes de defesa (Figura 2).

Estes inibidores têm efeito de proteger as plantas contra danos causados por vários tipos de insetos, inibindo significativamente atividades proteolíticas no intestino dos insetos (HILDER *et al.*, 1987). Em resposta ao ataque do inseto, foi verificado que folhas de batata induziam à síntese de inibidores de cisteíno protease, Multicystatin e PCPIs (Potato Kunitz type cisteíno protease inibidor) (WALSH e STRICKLAND, 1993; BOLTER, 1993; GRUDEN et al., 1997) e inibidores de serino proteases, PI₁ (Potato proteinase inibidor I), PI₂ (Potato proteinase inibidor II) e PKPIs (Potato Kunitz type serine Proteinase inibidor) (1989; PENA-CORTES et al., 1988; ISHIKAWA et al., 1994).

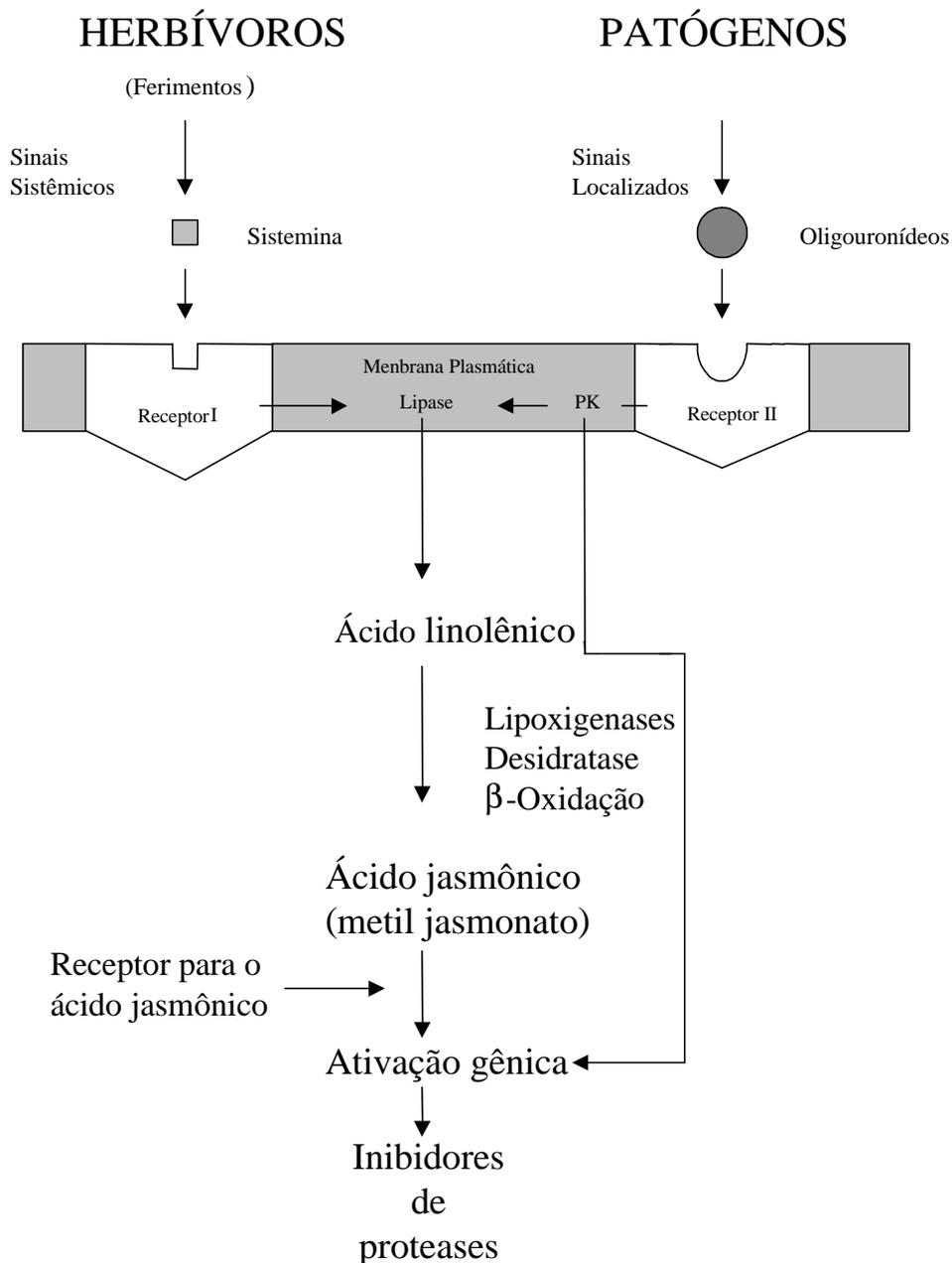


Figura 2: Mecanismo esquemático da ativação da produção de inibidores de proteases por ferimento em folhas de tomate. **PK**=Proteína Quinase (FARMER & RYAN, 1992).

Existem quatro famílias de inibidores de proteases que atuam sobre serino, cisteíno, metalo ou aspartil proteases (XAVIER-FILHO e CAMPOS, 1989). As mais estudadas são aquelas capazes de inibir as serino proteases, tripsina e quimotripsina, enzimas encontradas majoritariamente em insetos da ordem Lepidoptera (TERRA e FERREIRA, 1994) e aqueles que inibem cisteíno

proteases comumente encontrados em insetos da ordem Coleoptera (TERRA e FERREIRA, 1994; MATSUMOTO et al., 1997; KOIWA et al., 2000) .

Inibidores de proteases são importantes na natureza para a regulação da atividade de proteases alvo, para inibição de sua atividade biológica em casos emergenciais, ou para interação com receptores de sinalização ou “clearance”.

Muitos inibidores de proteases possuem um número de propriedades que claramente os distinguem de muitas outras proteínas, pois eles resistem a ação do calor e extremos de pH e também à hidrólise por enzimas proteolíticas. Esta resistência é resultado da sua estrutura tridimensional compacta a qual é geralmente, mas não necessariamente, estabilizada por pontes dissulfeto. Inibidores de proteases de plantas são geralmente caracterizados pelo alto teor de resíduos de cisteína e um baixo percentual de metionina, histidina e triptofano, eles são normalmente ricos nos aminoácidos aspártico e glutâmico, e em resíduos de serina e lisina, podendo ter ponto isoelétrico ácido ou básico (LASKOVSKI e KATO, 1980; BODE e HUBER, 1992).

Geralmente os inibidores se associam fortemente com as enzimas que eles inibem, com constante de associação da ordem de 10^7 a 10^{14} M^{-1} , esta relação é do tipo competitiva abolindo todas as atividades da enzima cognata (LASKOVSKI e KATO, 1980).

Tem sido sugerido que a ingestão de inibidores enzimáticos não elimina a digestão proteolítica no intestino médio dos insetos, em vez disto resulta na hiperprodução de enzimas proteolíticas. O efeito adverso ocorre de acordo com a ingestão crônica de inibidores, o que resulta na hiperprodução perniciososa de proteases alimentares, levando à limitação de aminoácidos essenciais para a síntese protéica, e conseqüentemente, redução do crescimento e do desenvolvimento do inseto (BROADWAY e DUFFEY, 1986; BROADWAY, 1995).

A transferência de genes pode ser considerada como um passo crucial no desenvolvimento de plantas resistentes a insetos, juntamente com vários resultados positivos em plantas transgênicas resistentes à pragas via

expressão de genes de inibidores de proteases (HILDER et al, 1987; DUAN et al, 1996; GATEHOUSE et al, 1997).

A utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas para a obtenção de plantas resistentes contra o ataque de insetos é uma estratégia promissora. Entretanto, para que isto ocorra é necessário que se selecione estes inibidores levando-se em consideração a fisiologia e a bioquímica de sua digestão pelo inseto (FRANCO et al, 2002). Neste sentido, 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.

2.3. Inibidores de serino proteases

As plantas sintetizam diversos inibidores do tipo serino proteases, sendo estes encontrados inicialmente em órgãos de reserva de plantas, tais como sementes e tubérculos, mas, posteriormente, foram detectadas em folhas e frutos (XAVIER-FILHO, 1992). Além de protegerem as plantas contra o ataque de insetos, os inibidores de protease também são utilizados como proteínas de reserva em algumas sementes (SILVA-FILHO & FALCO, 2000).

O número de inibidores de serino proteases bem caracterizados excede o número de inibidores descritos para as outras três classes, podendo ser agrupados em, no mínimo, 16 famílias baseadas na similaridade de seqüência e mecanismo de ligação (LASKOVSKI e KATO, 1980; BODE e HUBER, 1992). Os inibidores de serino proteases de plantas são agrupados em oito famílias: Bowman-Birk, Kunitz, Potato I, Potato II, Curcubita, Superfamília dos cereais, Ragi e família Thaumatin PR-*like* (RICHARDSON, 1991).

Em relação a outros inibidores de proteases, o mecanismo de interação dos inibidores de serino proteases com suas enzimas alvo é bem mais conhecido. Estudos de seqüenciamento e cristalografia por raios-X mostraram que estes inibidores, apesar de não serem homólogos, em sua maioria, interagem com um mesmo mecanismo padrão (LASKOVSKI e KATO, 1980).

Este grupo de inibidores compreende pequenas proteínas de 29 a 190 resíduos de aminoácidos aproximadamente. Todos possuem um *loop* de ligação exposto em conformação bem característica (BODE e HUBER, 1992).

A família de inibidores Kunitz inclui o inibidor de tripsina da soja (SBTI) que é o mais estudado em plantas e que dá nome à família. É comum em Leguminosae mas também é encontrado em Mimosoideae, Papilionideae, Caealpinioideae, dentre outras. Este inibidor possui massa molecular de 21 kDa e as seqüências de aminoácidos de três variantes genéticas são conhecidas – T_i^a , T_i^b e T_i^c . Estas possuem valores de K_i diferentes, T_i^a e T_i^c possuem valores de K_i similares de 1.5×10^{-10} M e 2.0×10^{-10} M respectivamente e T_i^b tem um valor mais alto de 1.0×10^{-8} M (XAVIER-FILHO e CAMPOS, 1989).

A família do inibidor de soja Bowman–Birk (BBI) é típico de Leguminosae podendo ser encontrado também em Fabaceae, Phaseolaceae, Glycinaceae e Viciae (XAVIER-FILHO e CAMPOS, 1989), possui uma massa molecular de 8 kDa e é considerado como um potencial agente anticarcinogênico e quimopreventivo de alguns tipos de cânceres humano, por possivelmente inibir a atividade de um antígeno específico na próstata; o seu uso em tratamento de pacientes com câncer neste órgão está sendo avaliado (ZHANG *et al.*, 1999; WAN *et al.*, 1999). O BBI pode simultaneamente inibir tripsina e quimotripsina em sítios reativos independentes (XAVIER-FILHO, 1992). O BBI de sementes de soja é único, porque possui um sítio inibidor de quimotripsina mais ativo relativo à atividade do sítio de inibição da tripsina em soja (KENNEDY, 1998; SESSA e WOLF, 2001).

A família Curcubita compreende inibidores encontrados em sementes de Curcubitaceae, com inibidores de tripsina e o fator Hagemam caracterizado pelo baixo peso molecular (XAVIER-FILHO, 1992).

O tubérculo de batata (*Solanum tuberosum*) é rico em inibidores de serino proteases e de carboxipeptidases. Potato I possui massa molecular de 8 kDa, associa-se fortemente formando uma molécula pentamérica, é inibidor de

quimotripsina e também pode inibir subtilisina e tripsina (XAVIER-FILHO, 1992).

Sementes de cereais (Gramineae) são ricas em inibidores de serino proteases. A família Ragi compreende inibidores bifuncionais os quais inibem serino protease e α -amilase-like. Cereais que também contém inibidores bifuncionais são relacionados à família da proteína *Thaumatococcus* (XAVIER-FILHO, 1992).

2.3.1. Benzamidina

A benzamidina é uma amidina aromática, inibidor sintético competitivo de tripsina, apresentando K_i de 1,0 mM (MARES-GUIA et al., 1981). A Benzamidina, quando presente no meio de reação em baixas concentrações, posiciona-se no sítio de especificidade, sítio S1, da tripsina, onde é estabilizada por interações hidrofóbicas no bolso hidrofóbico e, por interação eletrostática, entre seu grupamento amidina e entre um resíduo carboxila pertencente a um ácido aspártico presente na porção do fundo do bolso do sítio S1 (MARES-GUIA et al., 1981, OLIVEIRA et al., 1993).

2.4. Inibidores de cisteíno proteases

A classe específica de inibidores de cisteíno proteases está dividida em três categorias: peptídeos sintético diazometanos, epóxidos e os inibidores naturais conhecidos como cistatinas.

Peptídeo diazometanos, são oligopeptídeos no qual o OH-carboxiterminal é substituído por uma molécula de diazometil (CH-N=N). Essa inibição é irreversível sendo intermediada pela via tiohemiacetal com a formação de uma cisteíno com sítio ativo alquilado formando uma ligação tio-éter com o grupo metil do inibidor (ZUMBRUNN et al. 1988).

Peptídeo epóxido pertence a um grupo de inibidores irreversíveis baseado na composição de E64 [N-(L-3-trans-carboxioxiran-2-carbonil)-L-leucil]-amido(4-guanidino)butano], um inibidor de baixo peso molecular 357,4 kDa. O inibidor E 64 foi isolado originalmente a partir de cultura de *Aspergillus japonicus*. Este inibidor caracteriza uma inibição irreversível de cisteíno proteases (HANADA et al., 1978; HASHIDA et al., 1980; BARRETT et al., 1982; PARKES et al., 1985).

Uma forma comumente utilizada para a caracterização de cisteíno protease é a utilização de E-64 (BEYNON e SALVESEN, 1989; BARRETT, 1994). Com a utilização desse inibidor evidenciou-se a presença de cisteíno protease no intestino de lepidópteros (ORTEGO et al., 1996).

É relatado também que E64 diminui a atividade de outras cisteíno proteases (BARRETT et al., 1982; BLACK et al., 1989; KAMENS et al., 1995), assim como algumas serino protease como tripsina e metaloproteases (HANADA et al., 1978; BARRETT et al., 1982).

SREEDHARAN et al. (1996) evidenciou que E64 inibiu tripsina bovina utilizando-se BApNA como substrato. Esta é uma inibição competitiva reversível. Foi verificado que E64 é capaz de inibir enzimas tripsina-like obtidas de insetos pertencentes a ordem Lepidoptera como *Spodoptera littoralis* e *Sesamia nonagrioides*, quando se utiliza BApNA ou BAEE como substrato (LEE e ANSTEE, 1995; ORTEGO et al., 1996).

WOLFSON e MORDOCK (1990) verificaram que níveis subletais de E64 pode ter efeitos notáveis na fecundidade de Coleoptera. Insetos alimentados com E64, inibidor para cisteíno protease (Hanada et al., 1978), propicia um aumento na mortalidade e um atraso no crescimento de larvas de CPB (besouro da batata do Colorado) e uma diminuição da taxa de fecundidade de adultos (WOLFSON e MURDOCK, 1987; BOLTER e LATOSZEK-GREEN, 1997).

Cistatinas pertencem a uma grande família de inibidores de protease e encontram-se divididas em três subfamílias baseado nas características estruturais e localização celular. Em mamíferos estas correspondem

respectivamente a stefins (11 kDa), família II (11-13 kDa) e Kininogens (60-120 kDa) (BARRETT, 1987). Em plantas são conhecidas as fitocistatinas (5-87 kDa), que apresentam características semelhantes à subfamília stefins (família I) e família II (TURK et al., 1997, ARAI et al., 1998).

As fitocistatinas desempenham grande atividade inibitória contra proteases de intestino de insetos. Quando Oryzacistatin I, é incluída em dieta alimentar de *Tribolium castaneum*, esta espécie tem seu crescimento e desenvolvimento retardados (MICHAUD et al., 1995). Da mesma forma o inibidor multicistatina de batata, inibe o crescimento de *Diabrotica virgifera virgifera* (ORR et al., 1994). O inibidor cisteíno protease de soja, Soyacystatin N (ScN), comprometeu a atividade enzimática digestiva de *Diabrotica virgifera virgifera* conturbando o crescimento e desenvolvimento dessas pragas (ZHAO et al., 1996; KOIWA et al., 1998, 2000). Esses resultados sugerem que a utilização de cistatinas é promissor para o controle de pragas que utilizam cisteíno protease como enzima na digestão de proteína.

2.5. *Anticarsia gemmatalis* (Hübner)

A lagarta da soja, *A. gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) é uma das maiores pragas da soja (*Glycine max*). Esta consome a folha iniciando seu ataque pela epiderme inferior e mesófilo, e após o segundo instar a lagarta da soja consome a folha inteira. A lagarta da soja 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). A lagarta da soja 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 vai 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 da 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, 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 brancos 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 de ovos podemos encontrar ovos também na superfície adaxial das folhas, nos pecíolos e até mesmo nos caule (WATSON, 1916).

Larvas recém chocadas se alimentam na casca do ovo do qual irão emergir deixando somente a porção presa à folha. Existem normalmente seis instares no estágio larval da lagarta da soja. As larvas variam extremamente em coloração e marcas durante os instares. 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 claro, 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 os dos segmentos 5 e 6. No segundo instar a borda negra da linha lateral aparece e o primeiro par de pseudopatas abdominais estão cerca de um quarto maior do que o do terceiro par. O Segundo par de pseudopatas estão 50%

maiores do que o terceiro. O segundo instar termina em 3 ou 4 dias tendo larva cerca de 9 mm de comprimento. O terceiro instar também termina em 3 ou 4 dias e a lagarta pode alcançar 16 mm em comprimento. O quarto e o quinto instares terminam em 3 ou 4 dias e podem alcançar 25 mm de comprimento. Durante o sexto instar a lagarta da soja torna-se gradualmente maior e pode chegar a medir 48 mm. O sexto instar termina no quinto dia, até aqui se passaram 25 dias. No estágio pré-pupal a larva reduz em tamanho para 25mm de comprimento e torna-se marrom com poucas linhas longitudinais (WATSON, 1916).

A pupa da *A. gemmatalis* é verde claro por volta de um dia de idade, quando então se torna marrom. A pupa 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 clara com uma linha de pontos claros próximo 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 da lagarta da soja (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, causarem sérios danos ambientais,

contaminação dos operadores rurais e proporcionam a seleção de indivíduos resistentes entre as espécies que se está combatendo. A engenharia genética de plantas oferece a possibilidade de se introduzir genes de resistência às pragas, os quais codificam para inibidores de proteases (JOUANIN et al, 1998).

3. Objetivos:

Este trabalho teve como objetivo geral identificar aspectos bioquímicos e fisiológicos em *A. gemmatalis* alimentadas com o inibidor de protease benzamidina, visando esclarecer o processo envolvido no mecanismo de interação planta-inseto, para propor quais os tipos de substâncias devem ser induzidas na resposta de defesa da planta a insetos-praga.

3.1. Objetivos específicos

- Avaliação da digestibilidade protéica, quando o inseto é alimentado com níveis crescentes de benzamidina em dieta artificial.
- Avaliar os efeitos de benzamidina no desenvolvimento pós-embrionário de *Anticarsia gemmatalis*.
- Avaliação da atividade proteolítica do extrato enzimático obtido a partir do intestino médio do inseto.
- Avaliação da atividade amidásica do extrato enzimático obtido a partir do intestino médio do inseto.
- Estudo da ação de benzamidina sobre as atividades proteasica e amidásica no intestino médio do inseto.

4. Materiais e Métodos

4.1. Criação da lagarta da soja

Ovos de *A. gemmatalis* foram obtidos do Centro Nacional de Pesquisa da Soja (CNPSo), Londrina/ PR e mantidos no laboratório de Controle Biológico de Insetos do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO), da UFV, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 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 50cm revestida internamente com folhas de papel sulfite, tamanho 21 X 29,7cm.

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

As posturas de *A. gemmatalis* ocorreram após três dias na superfície do papel que revestia internamente a gaiola. As folhas de papel que revestem internamente a gaiola foram retiradas e cortadas em tiras de 2,5cm de largura x 10cm de comprimento, colocadas em copos plásticos (500 ml) com um orifício circular na tampa de, aproximadamente 2cm, onde está acoplada uma tela de filó. Esses copos foram então transferidos para uma câmara climatizada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14 horas.

Após dois a três dias ocorreu a eclosão dos ovos, quando se iniciou a alimentação das larvas de *A. gemmatalis* com dieta artificial baseada na metodologia de HOFFMAN-CAMPO *et al.* (1985), colocando-se um cilindro de dieta artificial, em cada copo plástico.

O experimento foi montado em delineamento de blocos ao acaso, sendo cada tratamento composto de 5 repetições, cada uma constituindo-se de grupos de 10 lagartas individualizadas. As lagartas foram colocadas em potes plásticos individuais, onde receberam dietas artificiais, até a fase pupa farato. Foram mantidas em condições de temperatura 25 °C e o monitoramento da dieta assim como a pesagem das lagartas em balança do tipo analítica, foram feitos diariamente.

4.2. Preparo da dieta artificial

Foi preparada uma dieta artificial controle e outras três dietas artificiais, onde foram acrescentados o inibidor de protease benzamidina nas concentrações de 0,25; 0,50 e 0,75%, conforme apresentado no Quadro 1.

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

Ingredientes	Controle	0,25%	0,50%	0,75%
Feijão mulatinho (cozido) ¹	4,80	4,80	4,80	4,80
Levedo de cerveja ¹	2,4	2,4	2,4	2,4
Germe de trigo ¹	3,8	3,8	3,8	3,8
Proteína de soja ¹	3,8	3,8	3,8	3,8
Caseína ²	1,9	1,9	1,9	1,9
Agar-agar ³	1,34	1,34	1,34	1,34
Ácido ascórbico ²	0,23	0,23	0,23	0,23
Ácido sórbico ⁴	0,11	0,11	0,11	0,11
Solução vitamínica ¹	0,38	0,38	0,38	0,38
Nipagin ⁴	0,19	0,19	0,19	0,19
Formol 40% ¹	0,23	0,23	0,23	0,23
Benzamidina ²	0,0	0,25	0,50	0,75

¹ Obtido comércio de Viçosa, MG

² Obtido da Sigma

³ Obtido da Isofar- Indústria e comércio de produtos químicos

⁴ Obtido da Synth- LabSynth produtos para laboratório Ltda

Estes ingredientes foram processados e misturados, nesta ordem, com o auxílio de um liqüidificador industrial. A mistura foi autoclavada por 1 hora à pressão de 1,5 kgf/cm², em seguida foi transferida novamente para o liqüidificador, 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. Determinação da concentração de proteína.

A determinação de proteínas foi realizada, segundo o método de KJELDAHL, para a quantificação de nitrogênio total, descrito pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985. Na fase de digestão, após obtenção do material aparentemente digerido, foi adicionado peróxido de hidrogênio 30%, levando a mistura a aquecimento por mais 30 minutos. Na fase de destilação, a amônia liberada foi recolhida em solução de ácido bórico 4%. O material recolhido foi titulado com HCl 0,01 N. Para a conversão do nitrogênio em proteínas foi utilizado o fator 6,25.

4.4. Digestibilidade protéica

Para determinação da digestibilidade, as lagartas foram trocadas de potes e supridas com dieta *ad libitum*, sendo esta dieta pesada em balança analítica, o que possibilitou a obtenção da quantidade de proteína ingerida.

As fezes foram coletadas a partir da introdução da dieta até a fase pupa farato, colocadas em recipientes individuais e mantidas sobre refrigeração.

Ao término do experimento, as fezes foram secas em estufa com circulação de ar, à 105 °C por 24h. Em seguida foram resfriadas, pesadas e trituradas em multiprocessador para determinação da concentração de nitrogênio pelo método micro-Kjeldahl, com amostras em triplicata.

A digestibilidade foi calculada como mostrado abaixo, determinando-se a quantidade de nitrogênio ingerido na dieta menos a quantidade de nitrogênio excretada nas fezes.

$$\% \text{Digestibilidade(app.)} = \frac{\text{PI} - (\text{PE}) \times 100}{\text{PI}}$$

PI – Proteína ingerida.

PE – Proteína excretada.

4.5. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio de larvas de *A. gemmatalis*

O intestino médio foi extraído após dissecação de larvas de 1º, 2º, 3º, 4º, 5º e 6º instar, em presença de HCl 10⁻³ M a 4 °C. O extrato enzimático foi obtido através do rompimento celular resultante de nove ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C. 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 análises posteriores.

4.6. Determinação da concentração de proteína do extrato

A concentração de proteína foi determinada pelo método descrito por BRADFORD (1976), utilizando-se como padrão uma solução 0,2 mg/ml de Albumina do Soro Bovino(BSA).

4.7. Atividade proteásica

A atividade proteásica foi determinada utilizando-se caseína como substrato na concentração final de 1% (p/v). A atividade foi monitorada espectrofotometricamente a 280 nm utilizando-se o método descrito por KUNITZ (1947). A reação foi realizada em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 a 37 °C.

O tempo de incubação foi de 3 minutos, o qual foi interrompido por adição de ácido tricloroacético 5% (p/v). Após a interrupção, as amostras foram centrifugadas para remover a proteína precipitada e a atividade do sobrenadante pôde, então, ser determinada a 280 nm. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

4.8. Atividade amidásica

A atividade amidásica foi realizada pelo método descrito por ERLANGER *et al.* (1961), utilizando-se o substrato cromogênico N-benzoil-L-argininil *p*-nitroanilida (L-BApNA, substrato para enzimas tripsina-*like*) na concentração final de 0,5mM, a 25 °C em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,2 contendo 20mM de CaCl₂ e 1% (v/v) de dimetilformamida (DMF).

As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto *p*-nitroanilida, através da medida da absorvância a 410 nm em função do tempo (2,5 min), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de 8800 M⁻¹cm⁻¹ para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

5. Resultados e Discussão

5.1. Consumo de dieta artificial

Uma alimentação rica em inibidores de protease, tende a comprometer a degradação de proteínas, uma vez que inibe as enzimas digestivas proteolíticas do trato intestinal, comprometendo deste modo a absorção de peptídeos e aminoácidos. Ao longo do tempo isto pode comprometer o crescimento e desenvolvimento de *A. gemmatalis* e posteriormente a sua transformação em adulto.

Podemos verificar que larvas de *A. gemmatalis* quando recebem dieta artificial rica em inibidor, apresentaram um pico no seu consumo alimentar no décimo primeiro dia quando alimentados com as concentrações 0,0; 0,25 e 0,75 % de benzamidina (figura 1). Neste período, correspondente entre o quarto e quinto instar larval, o inseto apresenta alta atividade de enzimas proteolíticas no seu intestino médio (XAVIER, 2002). Portanto é neste período que ocorre a maior absorção proteica, para atingir o seu máximo desenvolvimento larval, e seja desencadeada sua metamorfose e transformação em adultos viáveis. Deste modo neste período também ocorre o seu maior consumo alimentar.

No entanto, o tratamento 0,50% de bezamidina apresentou um pico de consumo alimentar tardio, no décimo terceiro dia, sendo este pico de maior grandeza que os demais tratamentos incluindo o que não recebeu benzamidina. Assim os tratamento 0,50% e 0,25% apresentaram maiores índices de consumo no décimo segundo e décimo quarto dia do que o tratamento que não recebeu benzamidina. Esses resultados obtidos para estas concentrações sugerem que estes insetos tiveram a necessidade de aumentar o seu consumo alimentar, na tentativa de suprir a menor atividade proteolítica devido a alta concentração de benzamidina no trato intestinal da lagarta da

soja. Com isso ocorreria uma maior absorção de peptídeos e aminoácidos essenciais, o que possibilitaria o inseto atingir seu peso crítico necessário para que este possa assegurar a sua transformação para adulto. Esses resultados são condizentes aos encontrados por GIRARD et al. (1998b), os quais verificaram que larvas de *Psylliodes chrysocephala* L. alimentadas com plantas transgênicas que expressam inibidores de cisteíno protease, tiveram um aumento significativo no seu consumo alimentar, buscando compensar a super produção de proteases digestivas para possibilitar a digestão protéica. Da mesma forma *Melanoplus sanguinipes*, quando alimentada com inibidor de tripsina de soja (SBTI), teve uma estimulação no seu consumo alimentar (HINKS e HUPKA, 1995).

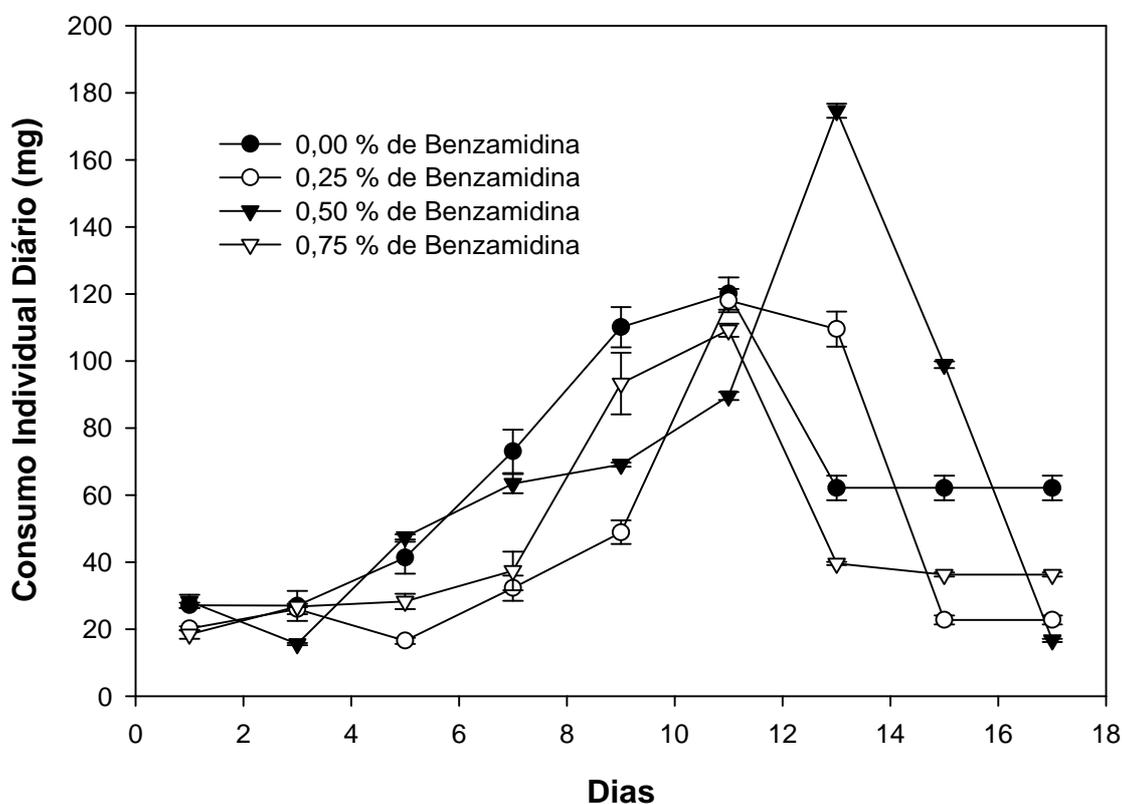


Figura 1- Perfil de consumo, com a adição de benzamidina, de dieta artificial durante o ciclo larval de *A. gemmatalis*. Símbolos representam os resultados comuns de 5 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,0000002; F = 130,30; $df_{\text{numerador}} = 24$; $df_{\text{denominador}} = 15$; P < 0,0001). Os períodos compreendidos entre dias 0 e 2; 2 e 5; 5 e 9; 9 e 12; 12 e 15; 15 e 17 correspondem respectivamente aos 1^o; 2^o; 3^o; 4^o; 5^o e 6^o instares.

5.2. Digestibilidade protéica

A ingestão de dieta protéica estimula a síntese e secreção de enzimas proteolíticas no trato digestivo dos animais (LIDDLE et al., 1986; TSUZUKI et al., 1991, SHARARA et al., 1993; NORIEGA et al., 1994). Na figura 2 verificamos que o acréscimo de benzamidina na concentração 0,25 (% p/p) à dieta proteica, reduziu significativamente a digestibilidade proteica de *A. gemmatalis*. Já nas concentrações 0,50 e 0,75 (%) de benzamidina houve um aumento significativo na digestão de proteínas, sendo que essas duas concentrações não diferiram significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey (figura 2). A ingestão de benzamidina em concentrações acima de 0,25% parece estar ativando a síntese de enzimas proteolíticas no intestino médio da lagarta da soja, causando o aumento da digestibilidade protéica. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por BROADWAY (1995), o qual verificou que dieta acrescentada de inibidores de proteases de repolho resultam na elevação da digestão proteolítica de *Trichoplusia ni*, mas estes não influenciam na digestibilidade *in vivo* de *Helicoverpa zea*, sugerindo que a hiperprodução de enzimas proteolíticas ocorre apenas na primeira espécie.

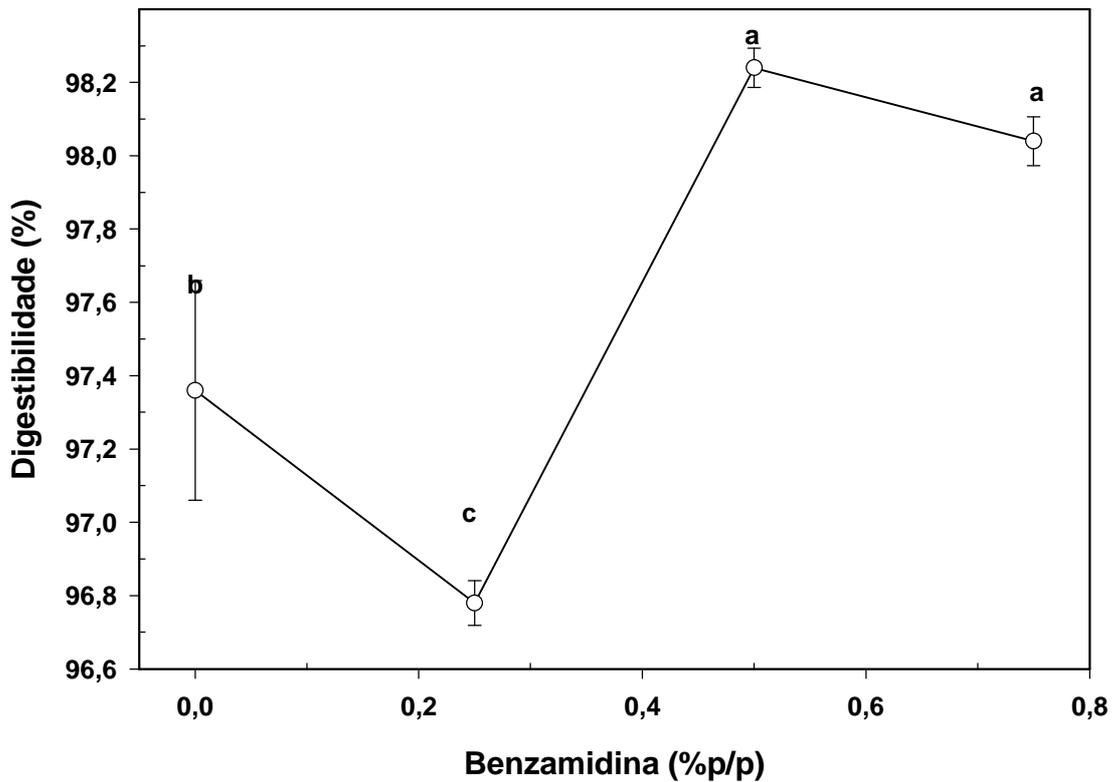


Figura 2 – Média percentual de digestibilidade protéica aparente versus concentração de benzamida (0,0; 0,25; 0,50 e 0,75%). Médias seguidas por um mesma letra não diferenciam entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Outra hipótese seria a ativação de enzima tripsina-*like* com aumento da concentração de inibidor na dieta. MARES-GUIA et al. (1981), com o objetivo de fazerem um modelo quantitativo para a ativação da hidrólise trípica para qualquer modificador químico e não só por substrato como é o modelo proposto por TROWBRIDGE et al (1963), estudaram a ativação da tripsina usando L-TAME como substrato e benzamida como modificador. A benzamida é um inibidor clássico da hidrólise trípica. Em concentrações maiores que 1,0 mM de benzamida ocorre ativação da hidrólise esterásica. Na literatura já existia uma discussão sobre um equilíbrio alostérico da tripsina mas nenhum modelo qualitativo foi proposto, este foi o primeiro.

5.3. Crescimento e Desenvolvimento de *A. gemmatalis* alimentada com inibidor de protease.

A ingestão crônica de benzamidina por larvas de *A. gemmatalis*, ocasionou um decréscimo no crescimento uma vez que seu peso larval foi reduzido cerca de 13,5% na maior concentração de inibidor. Verificamos que o aumento, da digestibilidade, ao contrário do que se esperava, ocasionou uma redução no crescimento (figura 3). O aumento da digestibilidade pode ter ocorrido devido ao aumento da síntese de proteases. Assim 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.

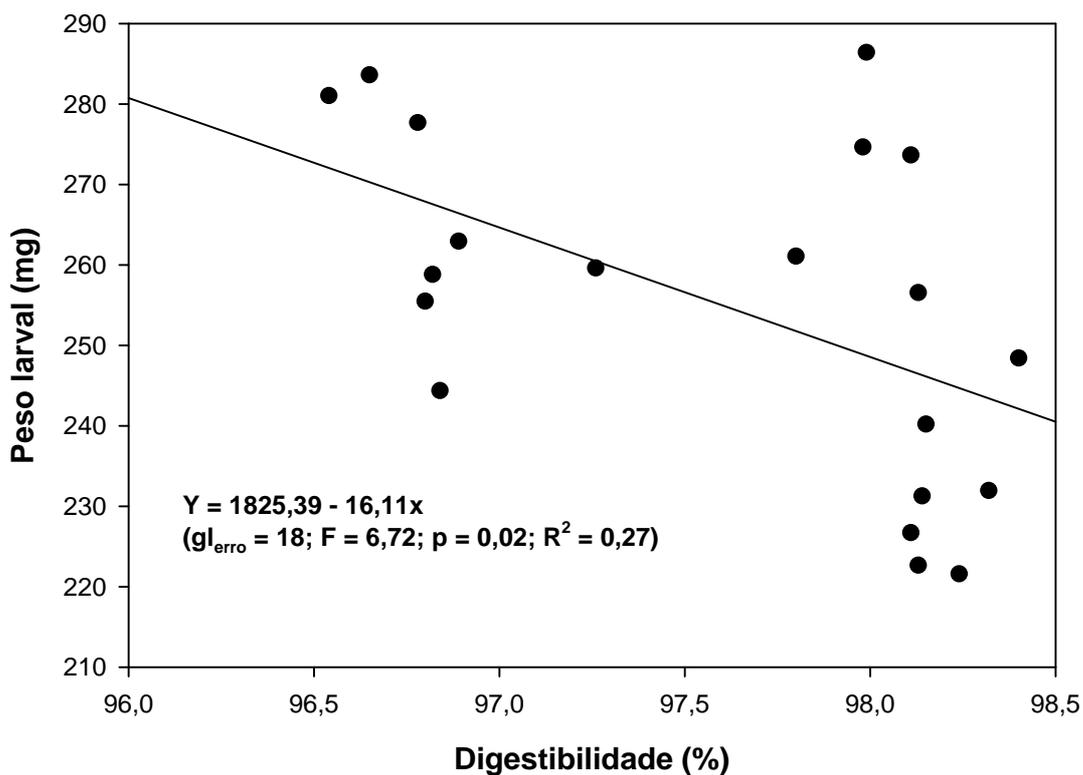


Figura 3 – Variações no peso larval de *A. gemmatalis* em função da percentagem de digestibilidade aparente. Indicando uma correlação negativa, uma vez que o aumento da digestibilidade reduz o crescimento larval.

Estes resultados são condizentes com BROADWAY e DUFFEY (1986 a), no qual a incorporação do inibidor de tripsina de soja(SBTI) e o inibidor de protease de batata em dieta resultou em um decréscimo na taxa de crescimento dos Lepidoptera *Heliothis zea* e *Spodoptera exigua*. Outros inibidores têm dados resultados semelhantes como oryzacistatina I, que retarda o crescimento de *Tribolium castaneum* (MICHAUD et al., 1995), da mesma forma que o inibidor multicistatina de batata, reduz o crescimento de *Diabrotica virgifera virgifera* (Orr et al., 1994). Esta espécie, 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).

Observando o perfil de ganho de peso durante o ciclo larval (figura 4), verificamos que a ingestão de inibidores pela lagarta da soja afetou o desenvolvimento desde o início, o que implicou em uma maior diferença de peso no final do ciclo larval, esse menor crescimento parece mesmo estar relacionado com uma diminuição na biodisponibilidade de aminoácido essencial para a síntese de outras proteínas necessárias para o crescimento e desenvolvimento do inseto, resultante de uma hiperprodução de enzimas proteolíticas.

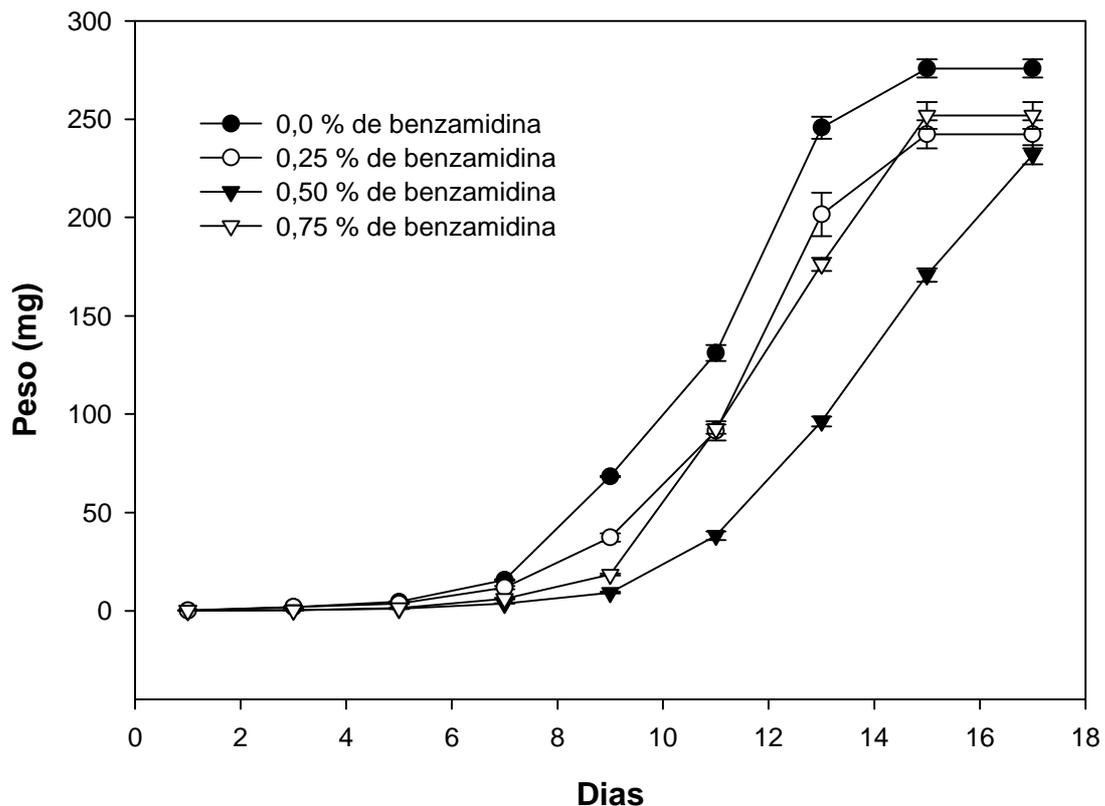


Figura 4 - Perfil de ganho de peso diário durante o ciclo larval de *A. gemmatilis* alimentada com as concentrações 0,0; 0,25; 0,50; 0,75% de benzamidina. Símbolos representam os resultados de 5 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,0000001; F = 154,9; $df_{\text{numerador}} = 24$; $df_{\text{denominador}} = 15$; $P < 0,0001$). Os períodos compreendidos entre dias 0 e 2; 2 e 5; 5 e 9; 9 e 12; 12 e 15; 15 e 17 correspondem respectivamente aos 1º; 2º; 3º; 4º; 5º e 6º instares.

Contrário ao observado por MCMANUS e BURGESS (1995), que observaram observaram redução de crescimento apenas no 1º instar de larvas de *Spodoptera litura* após ingestão crônica de inibidores, o que acarretou menores ganhos de peso até 12 dias e o seu desenvolvimento foi incrementado de um dia de atraso. Já 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, já a partir do quarto instar até a fase pupa farato o inseto demonstrou ter uma taxa de recuperação aos efeitos negativos dos 3 primeiros instares.

Um fato interessante é que alguns insetos não tenham essa deficiência de crescimento. BROADWAY (1995) por exemplo, alimentando larvas de *Trichoplusia ni* com inibidores de serino proteases semi-purificado de repolho, verificou uma redução de crescimento larval de 35% e 66% de emergência de adulto.

De fato, trabalhos recentes indicam que a falta de aminoácidos necessários à biossíntese protéica é resultado de um grande aumento na síntese de enzimas proteolíticas devido a presença de inibidores no intestino médio dos insetos, razão para a supressão de crescimento de larvas *Spodoptera exigua* e *Helicoverpa zea* (JONGSMA et al., 1995 e BROADWAY, 1996).

5.4. Duração de ciclo larval

Observamos que o aumento na digestibilidade devido a presença de benzamidina, além de acarretar um decréscimo no crescimento, aumentou a duração do ciclo larval de *A. gemmatallis* (figura 5).

Em larvas de *A. gemmatallis*, a ingestão de inibidores enzimáticos não elimina a digestão proteolítica no intestino médio dos insetos, ao invés disso parece resultar em uma hiperprodução de enzimas proteolíticas, o que resultaria em uma limitação da biodisponibilidade de aminoácidos essenciais para a síntese protéica e, conseqüentemente, na redução do crescimento e atraso no desenvolvimento do inseto.

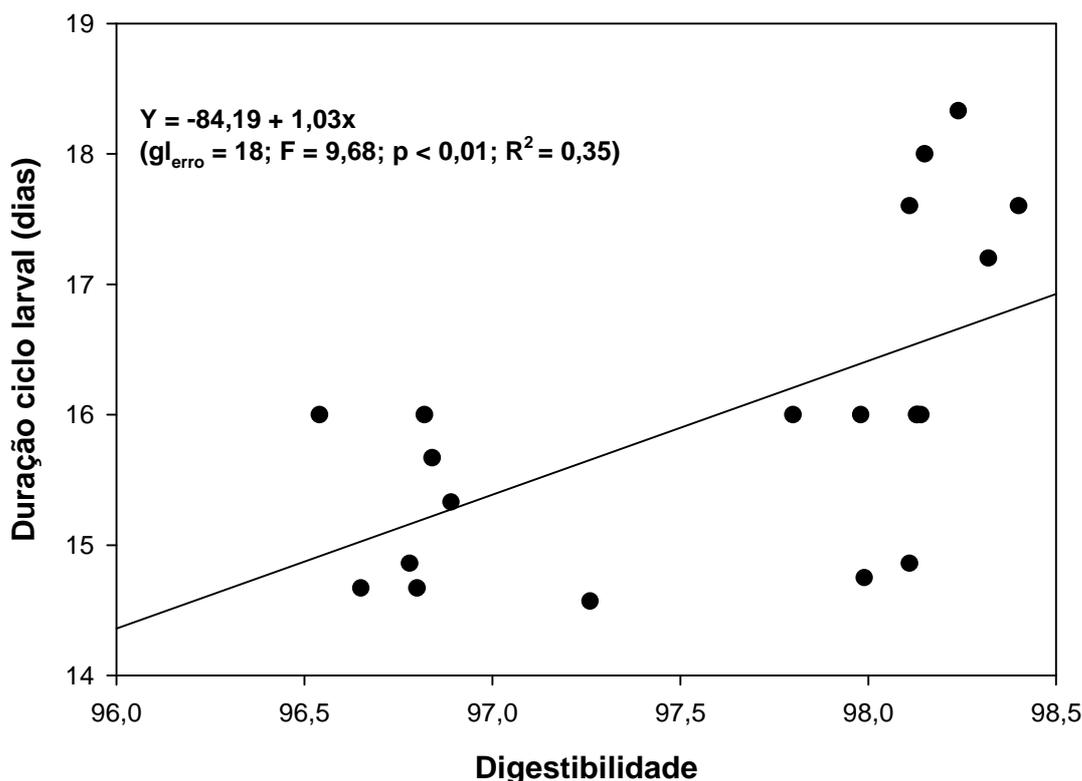


Figura 5 - Variações no tempo de duração do ciclo larval de *Anticarsia gemmatalis* em função da percentagem de digestibilidade aparente. Indicando uma correlação positiva, uma vez que o aumento da digestibilidade aumenta o tempo de crescimento larval.

O mesmo foi demonstrado por BOLTER e JONGSMA (1995) quando submeteram *Leptinotarsa decemlineata* a alimentação com folhas de batata tratadas com metil jasmonato gasoso, as quais induziam altos níveis de inibidores proteolíticos de cisteíno e aspartil protease, ocasionando atraso significativo no crescimento. Já KOIWA et al. (1998) expressaram dois inibidores de cistatina de soja na superfície de fagos e selecionaram as partículas expressando estes dois inibidores contra a papaína. O inibidor foi selecionado, e mostrou ter efeito retardador do crescimento comprometendo o desenvolvimento do gorgulho do caupi (*Callosobruchus maculatus*).

5.5. Mortalidade de larvas *A. gemmatalis*

Verificamos em nossos estudos que o aumento da duração larval se correlaciona muito mais com a mortalidade do que com a ingestão crônica de inibidores diretamente, sendo portanto uma resposta indireta, uma vez que os inibidores não causam a morte das larvas de *A. gemmatalis*. Os inibidores proporcionam sim um aumento na produção de enzimas digestivas, contribuindo para uma deficiência na absorção de aminoácidos essenciais, desta forma proporcionando uma redução de crescimento e aumento no ciclo larval o que acarretou em um aumento na mortalidade (figura 6).

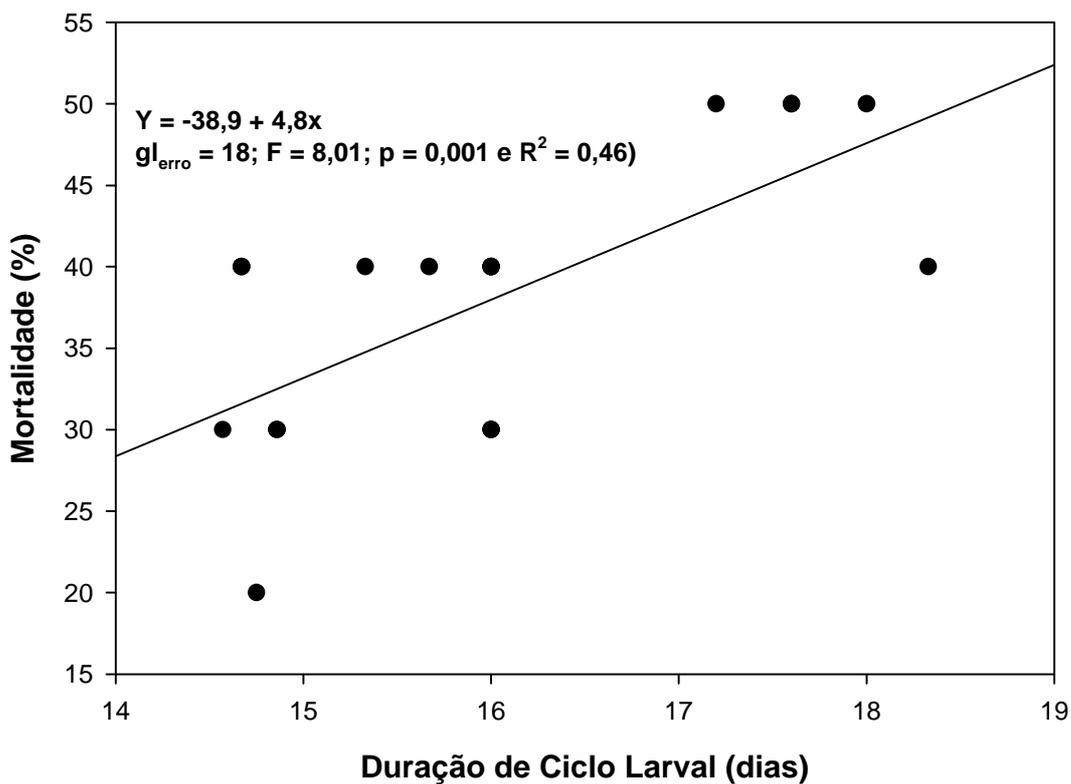


Figura 6 - Variações na mortalidade de larvas em função do peso larval de *A. gemmatalis*. Indicando uma correlação positiva, uma vez que o aumento do ciclo larval aumentou a mortalidade.

Resultados semelhantes foram encontrados quando alimentou-se *Leptinotarsa decemlineata* com E64 inibidor sintético de cisteino protease, isto resultou em um atraso no crescimento e conseqüentemente um aumento na mortalidade, assim como uma diminuição da taxa de fecundidade de adultos (WOLFSON e MURDOCK, 1987; BOLTER e LATOSZEK – GREEN, 1997).

5.6. Pupação de *A. gemmatalis*

A adição de benzamidina acarretou um aumento da digestibilidade protéica, no entanto houve uma redução no ganho de peso larval de *A. gemmatalis* durante o seu ciclo, o qual a posteriori irá provocar fracasso na transformação de pupa (figura 7), redução no peso final de pupa (figura 8) e uma deficiência na emergência de adulto (figura 9). Nenhum destes sendo uma resposta direta pela ingestão de benzamidina e sim uma debilitação ocasionada pela deficiência na absorção de aminoácidos para a síntese de novas proteínas, unido com um maior gasto de energia necessária para a alta produção de enzimas digestivas no intestino médio da lagarta da soja, na tentativa de compensar alta concentração de inibidores no trato digestivo.

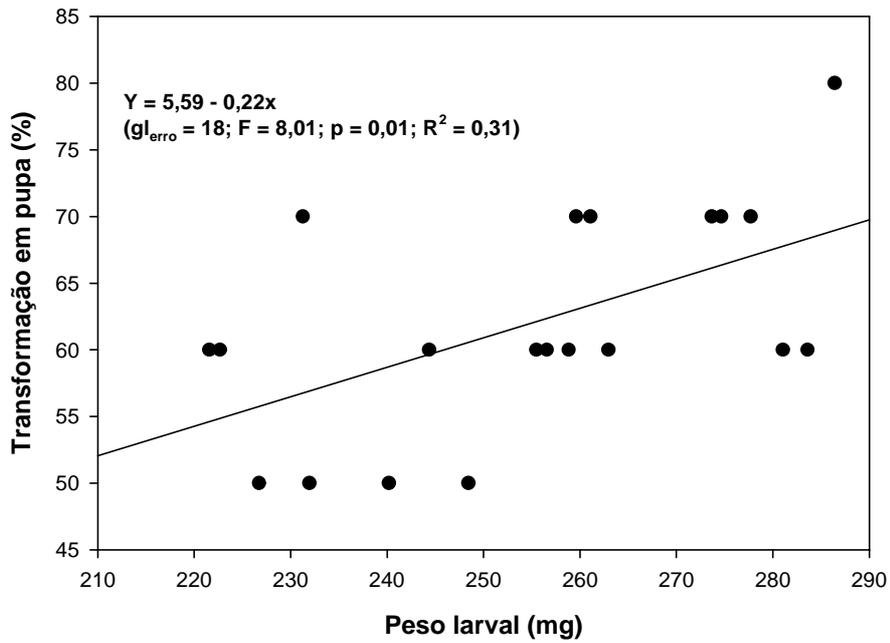


Figura 7 - Variações na transformação em pupa de *A. gemmatalis* em função do peso larval. Indicando uma correlação positiva, uma vez que o aumento do peso larval acarreta em aumento na transformação em pupa.

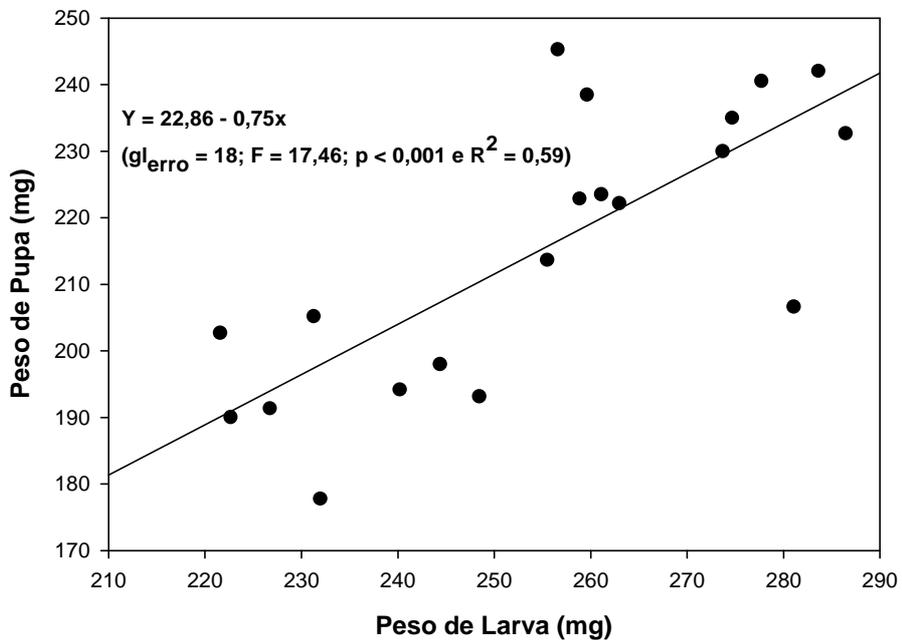


Figura 8 - Variações no peso de pupa de *A. gemmatalis* em função do peso larval. Indicando uma correlação positiva, uma vez que o aumento do peso larval acarreta em aumento no peso de pupa.

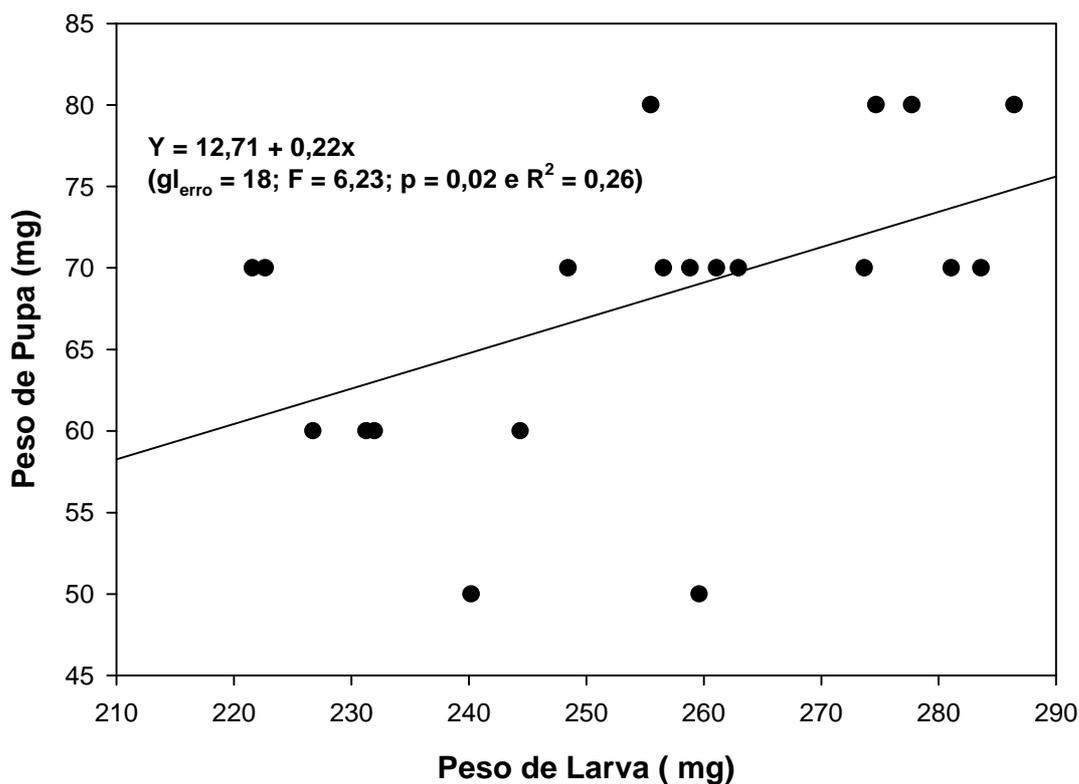


Figura 9 - Variações na emergência de mariposas de *A. gemmatalis* em função do peso larval. Indicando uma correlação positiva, uma vez que o aumento do peso larval acarreta em aumento na emergência de adulto.

Pragas generalistas como *Spodoptera exigua*, como é o caso também de *A. gemmatalis*, sobrevivem a muitas respostas de defesa de plantas, uma vez que atacam diferentes plantas, sugerindo que tenham um potencial de respostas, produzindo diferentes proteases alternativas e/ou possuem um número limitado de proteases resistentes a inibidores proteolíticos das plantas. Até o presente vem sendo relatado como uma defesa dos insetos a altos níveis de inibidores a alta produção de proteases sensíveis e a indução de proteases insensíveis aos inibidores utilizados no ensaio (JONGSMA et al., 1995 e ZHU-SALZMAN et al.,2003). Este fato poderá acarretar em uma baixa absorção de aminoácidos essenciais com baixa eficiência, juntamente com uma hiperprodução de enzimas proteolíticas, comprometendo desta forma o

desenvolvimento larval e implicará em eventual fracasso na transformação de pupa, redução no peso de pupa e decréscimo na emergência de adulto.

5.7. Atividade proteolítica

A figura 10 mostra o perfil de atividade proteolítica obtida a partir dos extratos enzimáticos do intestino médio de *A. gemmatalis*. Após doze dias de alimentação de *A. gemmatalis* com dieta artificial verificamos que é neste período, correspondente ao 5º instar de desenvolvimento que ocorreram os maiores picos de atividade proteolítica deste inseto, em todos os tratamentos. Para os tratamentos de 0,25 e 0,50% de benzamidina, observou-se que a atividade proteolítica foi superior ao grupo controle (0,0% de benzamidina).

Decorridos 5 dias, podemos observar que para a concentração 0,50% de benzamidina, o seu perfil de atividade proteolítica foi superior aos insetos alimentados com dieta proteica sem benzamidina e nas concentrações 0,25% e 0,75%. Esse fato, caracteriza uma hiperprodução enzimática no intestino médio de *A. gemmatalis*.

Para a maior concentração (0,75%) de inibidor, o mesmo não pode ser observado, uma vez que o seu perfil de atividade proteolítica mostrou-se inferior aos demais tratamentos. No entanto quando observamos o perfil de ganho de peso (figura 4) verificamos que houve um comportamento de ganho de peso equivalente ao tratamento 0,25% e superior ao tratamento 0,50% de benzamidina. Curiosamente a digestibilidade entre os tratamentos 0,50 e 0,75% não diferiu significativamente (figura 2). Esses dados permitem inferir que possa haver uma outra forma de protease atuando na digestão proteica.

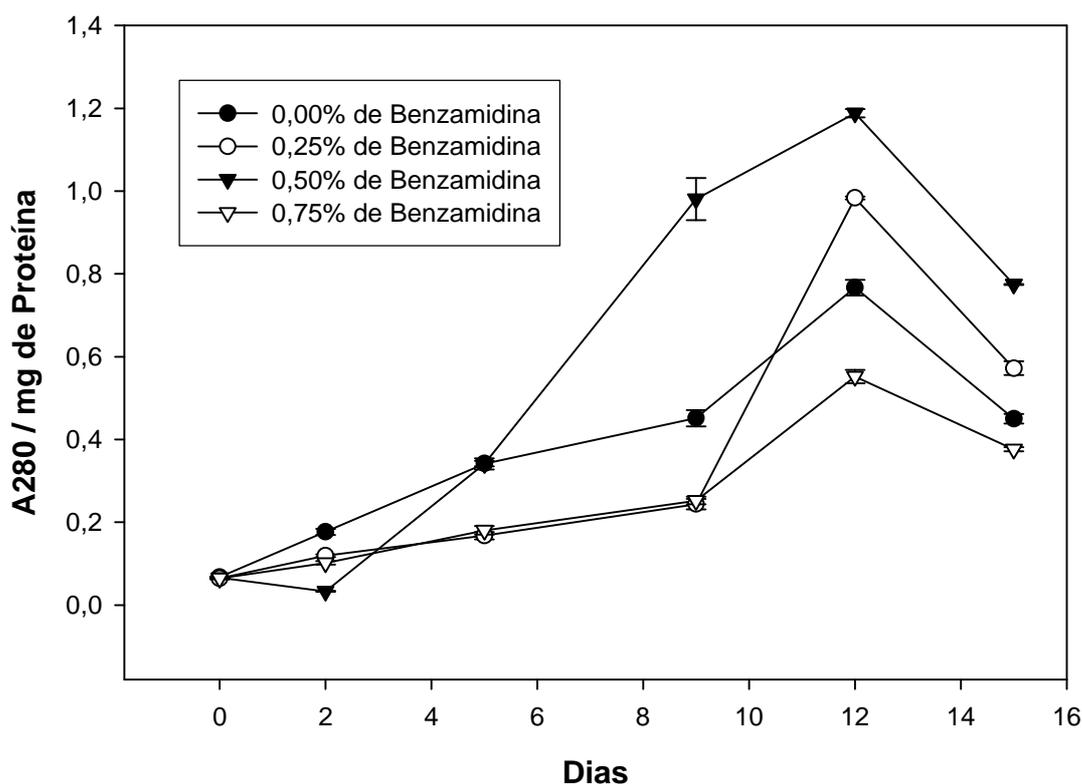


Figura 10- Perfil de atividade proteolítica com a adição de benzamidina nas concentrações 0,0; 0,25; 0,50 e 0,75 % (g/100g) em dieta artificial durante o ciclo larval de *A. gemmatalis*. Símbolos representam os resultados de 3 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,00000011; F = 132,31; $df_{\text{numerador}} = 15$; $df_{\text{denominador}} = 6$; P < 0,0001). Os períodos compreendidos entre dias 0 e 2; 2 e 5; 5 e 9; 9 e 12; 12 e 15; 15 e 17 correspondem respectivamente aos 1º; 2º; 3º; 4º; 5º e 6º instares.

Como observado neste experimento em *A. gemmatalis* quando alimentada com altas concentrações de inibidor de tripsina, outros Lepidoptera como *Spodoptera littoralis*, se adaptam a inibidores de proteases com uma grande produção de proteases digestivas (DE LEO et al., 1998).

Quando ocorrem fermentos em folhas de plantas, ocorre rapidamente síntese de inibidores de proteases no local do fermento, como também em folhas mais distantes (FARMER e RYAN, 1992). Neste sentido, GRUDEN et al.

(1998), provocaram ferimentos em folhas de batata para induzir um aumento nos níveis de inibidores de protease. Estes inibidores, quando ingeridos por larva de *Leptinotarsa decemlineata* Say, propiciaram um aumento nos níveis de atividade proteolítica como uma forma de defesa contra os inibidores de protease produzidos pelas plantas.

Da mesma forma, plantas de soja quando injuriadas por ataque de larvas de *A. gemmatalis*, induzem através da via das lipoxigenases, uma super expressão de inibidores de tripsina (FORTUNATO, 2001; SILVA et al., 2002). Portanto, uma vez que larvas de *A. gemmatalis* após a ingestão crônica de inibidor de tripsina, respondem com incremento em sua atividade enzimática no trato intestinal, é provável que quando esta se alimenta de folhas de soja com altos níveis de inibidores de tripsina desencadeiam como resposta fisiológica observada no trato intestinal, uma super produção de proteases digestivas, propiciando assim a digestão de dieta protéica e com isso assegurando o seu desenvolvimento, crescimento e transformação em adultos.

Um fato interessante é que na necessidade de aumentar a síntese de proteases digestivas, em presença de altos níveis do inibidor de tripsina no trato intestinal de *A. gemmatalis*, tenha ocasionado a redução no crescimento. No entanto, essa redução parece realmente estar ligada com o alto gasto de energia necessário nesta síntese, uma vez que a presença do inibidor na dieta protéica aumentou a digestibilidade que não foi suficientemente capaz de suprir a absorção de aminoácidos essenciais para que este inseto tivesse um desenvolvimento semelhante ao tratamento livre de benzamida.

5.8. Atividade amidásica

Como podemos observar (figura 11) os maiores picos de atividade de tripsinas-*like* aconteceram no décimo segundo dia, o qual corresponde ao 5º instar de desenvolvimento. Verificamos também que o inibidor de benzamidina não foi capaz de inibir toda a atividade de tripsina-*like* em todos os tratamentos. Ao contrário, verificamos que a concentração 0,50% (figura 11) apresentou um pico de atividade superior aos insetos que não receberam benzamidina e os tratamentos 0,25 e 0,75%, o que sugere que com essa concentração de inibidor no trato digestivo, a lagarta da soja primoriza a produção de tripsina-*like* como sua principal enzima digestiva conforme sugerido por XAVIER (2002).

No entanto, a ingestão crônica de benzamidina não foi capaz de inibir toda atividade triptica, ao contrário, para o tratamento 0,50% o residual de atividade no trato intestinal foi superior ao tratamento sem benzamidina. Portanto este parece induzir a síntese de tripsinas-*like* insensíveis ao inibidor, como foi determinado para outros Lepidoptera. MAZUMDAR-LEIGHTON e BROADWAY (2001a) por exemplo observaram que insetos da ordem Lepidoptera, após a ingestão de inibidores de proteases apresentavam tripsinas constitutivas e tripsinas induzidas insensíveis aos inibidores. Resultados semelhantes foram encontrados para as quimotripsinas (MAZUMDAR-LEIGHTON e BROADWAY, 2001a) e para as alfa-amilases (SILVA et al., 2001).

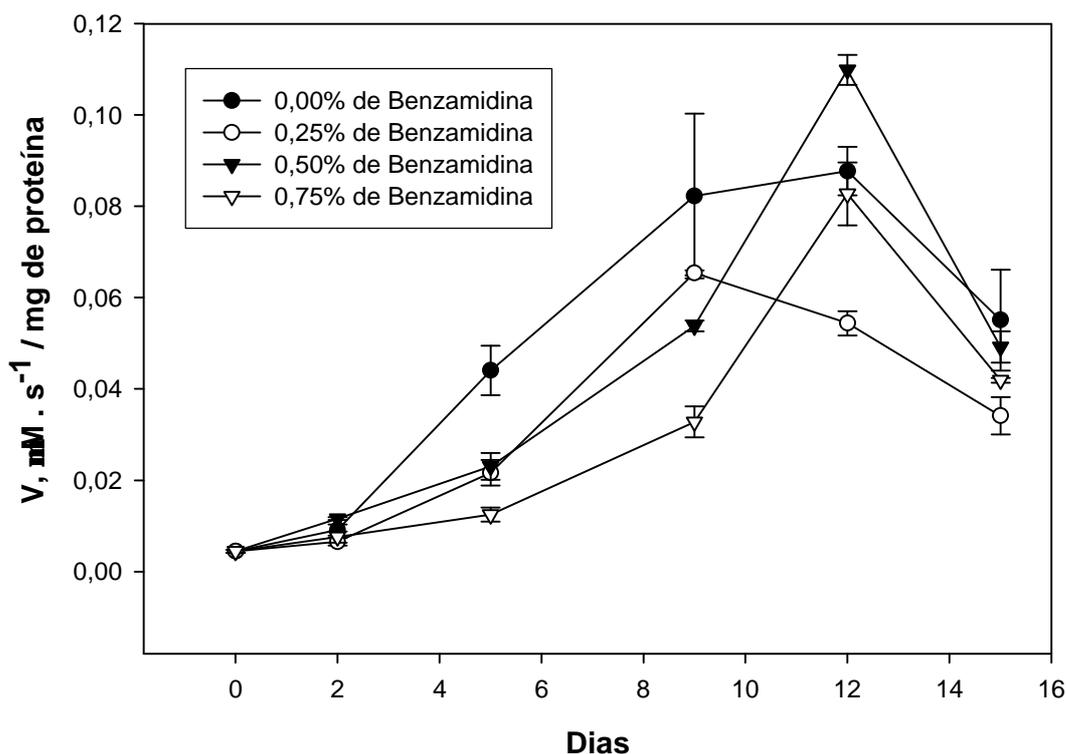


Figura 11 - Perfil de atividade trípica com a adição de benzamidina nas concentrações 0,0; 0,25; 0,50 e 0,75 % (g/100g) em dieta artificial durante o ciclo larval de *A. gemmatalis*. Símbolos representam os resultados comuns de 3 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,00011; F = 10,20; $df_{\text{numerador}} = 15$; $df_{\text{denominador}} = 6$; P = 0,0048). Os períodos compreendidos entre dias 0 e 2; 2 e 5; 5 e 9; 9 e 12; 12 e 15; 15 e 17 correspondem respectivamente aos 1º; 2º; 3º; 4º; 5º e 6º instares.).

ZHU–SALZMAN et al. (2003) estudando *C. maculatus*, o qual utiliza cisteíno protease como principal enzima na digestão de proteínas. Verificou que altas concentrações de Soyacistatina N (ScN) na dieta deste inseto, induziam a síntese de cisteíno protease diferenciada e resistente ao inibidor.

Uma dúvida adveio quando comparamos os perfis de atividade (figura 10 e 11). Por que para o tratamento 0,50% seu perfil de atividade proteásica é

superior ao tratamento ausente de benzamidina a partir do quinto dia de tratamento, uma vez que o perfil de atividade amidásica foi superior ao controle apenas no décimo primeiro dia. O inseto sintetizaria outras proteases além de tripsinas-*like* atuando? A alta concentração de benzamidina ativaria a hidrólise-esteárica como observado por MARES-GUIA et al.(1981)?

Estudos tem indicado que Coleoptera sintetizam naturalmente mais de uma classe de proteases. Como observado por GIRARD et al. (1998), em *P. cochleariae* que em sua digestão protéica utiliza múltiplas enzimas proteolíticas, sendo detectado em gel de atividade 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 encontrados em *L. decemlineata* (THIE e HOUSEMAN,1990; MICHAUD et al., 1995 A) e em larvas de *P. cruciferae* (RYMERSON e BODNARYK, 1995). Outros resultados mostram que *C. maculatus* requer. a presença conjunta de aspartil, cisteíno e serino proteases na sua digestão protéica (GATEHOUSE e BOULTER, 1983; SILVA e XAVIER-FILHO, 1991; ZHU-SALZMAN et al.,2003). O mesmo é observado em *T. 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, logo estando sujeitos a uma diversidade de inibidores.

No entanto em Lepidoptera, estudos têm indicado que tripsinas-*like* são as responsáveis pela digestão protéica, igualmente observado em nossos experimentos que mostram uma alta de atividade residual tríptica, (Figura11) mesmo com uma presença de alta concentração de benzamidina no trato intestinal. Semelhante ao encontrado por BRODWAY (1995), este estudando as espécies de Lepidoptera *P. rapae*, *P. napi*, *P. xylostella*, *T. ni*, *L. dispar* e *H. zea*, observou atividades de tripsina e quimotripsina nestas espécies, sendo que índices muito maiores de atividade eram atribuídas a tripsinas. Inibidores de tripsina mostraram-se também muito mais eficientes, sugerindo que inibidores de tripsina na defesa de plantas ao ataque de Lepidoptera são muito eficientes, uma vez que a digestão desses insetos é mais dependente de tripsinas-*like*.

Verificamos então que *A. gemmatalis* responde a ingestão crônica de inibidores com aumento na síntese de tripsinas-*like* insensíveis à benzamidina. O questionamento sobre a produção de outras proteases foi feito e na tentativa de responder esta pergunta vimos a necessidade de verificar a correlação da atividade geral versus atividade tríptica (figura 12). Observamos que não houve diferença significativa na correlação de atividade proteolítica versus amidásica para os diferentes instares ($p > 0,05$), por análise de covariância tendo-se instares como covariável. Portanto foi estabelecida uma única curva para todos os tratamentos e pudemos verificar que essa foi uma correlação positiva, ou seja a medida que o inseto crescia esse se alimentava mais e sua atividade amidásica e proteásica aumentavam conjuntamente independente do tratamento.

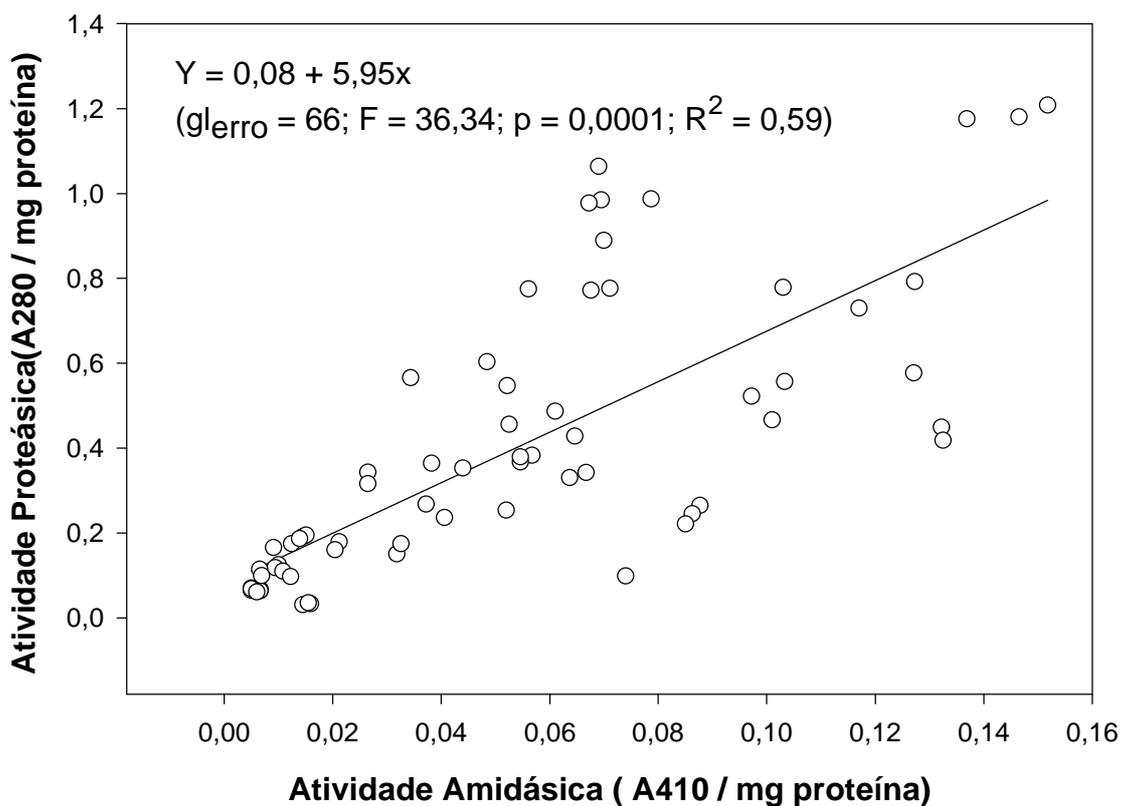


Figura 12 - Variações na atividade proteásica em função da atividade amidásica. Não diferenciando a correlação dessas atividades para os instares.

No entanto, quando avaliamos a correlação dessas duas atividades quanto aos tratamentos com benzamidina (figura 13), verificamos que o tratamento com benzamidina 0,50% proporcionou uma curva de regressão significativamente diferente em relação aos tratamentos 0,0; 0,25; e 0,75% de benzamidina os quais propiciaram uma única curva. Tais resultados foram obtidos a partir de análise de covariância tendo-se concentração de benzamidina como covariável ($p < 0,05$). Dessa forma podemos concluir que para uma concentração de 0,50%, apresenta atividade de outras proteases ou ativação da atividade tripsinas-like.

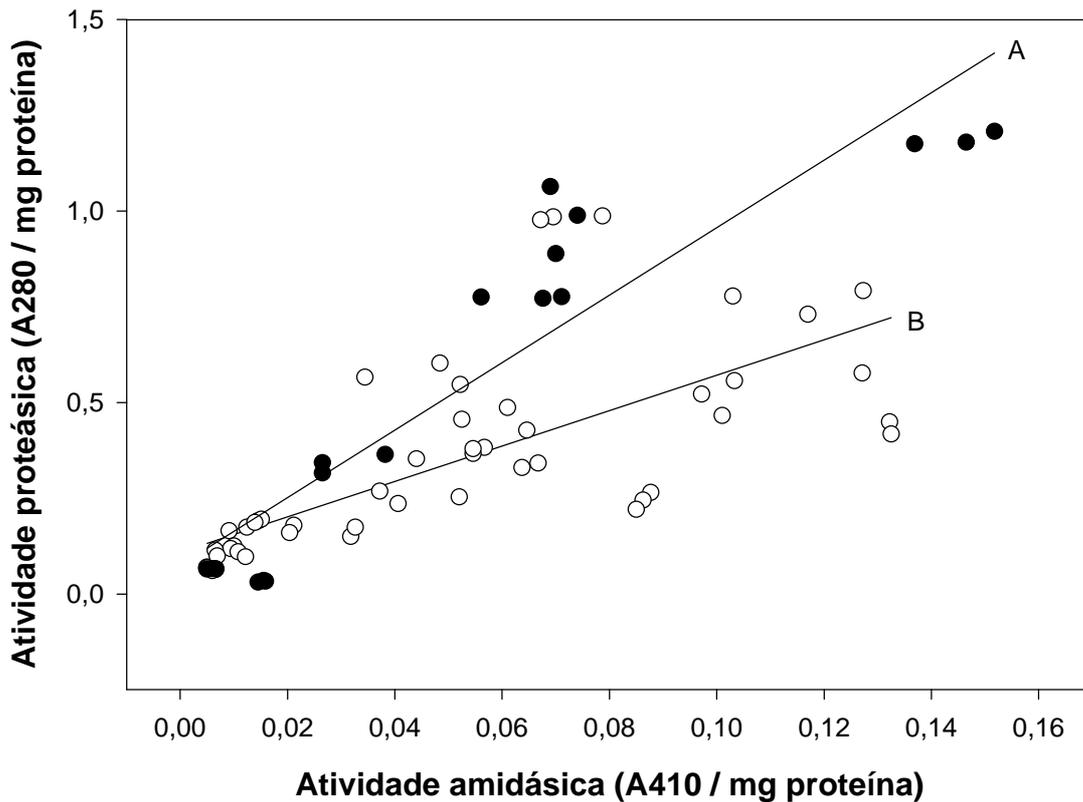


Figura 12 - Variações na atividade proteásica em função da atividade amidásica. Indicando uma correlação positiva, uma vez que o aumento da atividade equivale com o aumento da atividade proteásica. Diferenciando as correlações dessas atividades para o tratamento 0,50 [A: $Y = 0,07 + 8,81x$, $gl_{\text{erro}} = 16$, $F = 96,96$, $p = < 0,0001$ e $R^2 = 0,86$] e os tratamentos 0,0; 0,25 e 0,75 [B: $Y = 0,11 + 4,62x$, $gl_{\text{erro}} = 52$, $F = 55,90$, $p = < 0,0001$ e $R^2 = 0,52$].

O mesmo foi observado por Patankar et al. (2001), estes demonstraram que lagartas de *H. armigera* eram capazes de superar os efeitos negativos de vários inibidores de protease de plantas hospedeiras alterando a composição das enzimas do trato digestivo após a ingestão crônica destes inibidores. Resultados semelhantes foram observados em *Agrotis ipsilon*, *H. zea* (MAZUMDAR – LEIGHTON & BRODWAY, 2001 a) e *Heliothis virescens* (BRITO et al., 2001).

6. Resumo e Conclusões:

Verificamos que larvas de *A. gemmatalis* apresentam um pico no seu consumo alimentar no décimo primeiro dia, entre quarto e quinto ínstaes, quando alimentados com as concentrações 0.0, 0.25 e 0.75 % de benzamidina. No entanto, o tratamento 0,50% apresentou um pico de consumo alimentar tardio, no décimo terceiro dia, entre quinto e sexto instar.

Diagnosticamos que apenas a adição de dieta proteica com inibidores de protease em baixa concentração 0,25 (% p/p) de benzamidina, reduz a digestibilidade proteica de *A. gemmatalis*. Já nas concentrações 0,50 e 0,75 (%) de benzamidina há um aumento da digestão protéica, sendo que essas duas concentrações não diferiram significativamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A ingestão crônica de benzamidina ocasionou um decréscimo no crescimento, uma vez que o peso larval foi reduzido cerca de 13.5% para a maior concentração de inibidor. Verificamos que o aumento da digestibilidade, ao contrário do que se esperava, ocasionou uma redução no crescimento e conseqüentemente aumentou o período larval para os insetos alimentados com benzamidina.

A digestibilidade por sua vez não está correlacionada com mortalidade, transformação de pupa, peso de pupa e emergência. A alteração destes está relacionada diretamente com a redução do crescimento. Uma explicação para este fato seria que um possível aumento na síntese de enzimas proteolíticas no intestino médio da lagarta da soja, buscando contornar a presença da benzamidina, a qual teria aumentado à digestibilidade protéica, mas a absorção de aminoácidos essenciais não seria o suficiente para suprir o aumento na síntese proteolítica, ocasionando uma redução no peso final das larvas de *A. gemmatalis* alimentadas com o inibidor.

Determinamos que o pico de atividades tanto proteolítica quanto amidásica ocorre no 5º instar de desenvolvimento que é coincidente com o período de maior alimentação.

Verificamos que *A. gemmatalis* responde à ingestão crônica de benzamidina com um aumento na atividade proteolítica do intestino médio. Com isso utilizamos um substrato específico para serino protease (BApNa) para averiguar se esse aumento na atividade proteolítica estava atribuída a hiperprodução de tripsinas-*like*. Com essas duas atividades, podemos diagnosticar que *A. gemmatalis* pode responder a ingestão do inibidor benzamidina com uma hiperprodução de tripsinas-*like* sensíveis ao inibidor e sugere apresentar a síntese de formas insensíveis, além de poder dispor da síntese de outras proteases. O que explica a adaptabilidade desta praga em uma vasta gama de plantas hospedeiras, estando dessa forma submissas a uma variedade de inibidores.

As observações relatadas neste trabalho possibilitam explicar o sucesso da *A. gemmatalis* na cultura da soja, permitindo a sobrevivência com altos níveis de inibidores de protease nas folhas de soja os quais são induzidos após o ataque através da via das lipoxigenases (Fortunato, 2001).

Este trabalho também explica uma das dificuldades encontradas para as tentativas de controle de pragas generalistas como *A. gemmatalis*, através da introdução genes que expressam inibidores de protease em plantas transgênicas. Estudos futuros devem ser baseados na caracterização dos fatores que regulam a secreção de proteases, para que se possa utilizar os inibidores de protease como uma importante ferramenta no controle da lagarta da soja.

7. Referências Bibliográficas

- ARAI, S., Matsumoto, I., Abe, K. Phytocystatins and their target enzymes: From molecular biology to practical application: **A. review. J. Food Biochem.** 22, 287-299, 1998.
- BALDWIN, I.T. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. **Plant Physiol.** 127: 1449-1458, 2001.
- 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.
- BARRET, A. J., Classification of peptidases. **Meth. Enzymol.** 244: 1-15, 1994.
- BARRET, A.J., Kembhavi, A.A., Brown, M. A., Kirschke H., Knight, C. G., Tamai M. and Hanada K. L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. **Biochem. J.** 201: 189-198, 1982.
- BARRETT, A. J., The cystatins; a new class of peptidase inhibitors. **TIBS** 12, 193-196, 1987.
- BEACH, R.M. e TODD, J.W. Foliage consumption and developmental parameters of the soybean looper and the velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae) reared on susceptible and resistant soybean genotypes. **J. Econ. Entomol.** 81: 310-316, 1988.
- BEYNON, R.J. e SALVESEN, G. commercially available protease inhibitors. **In Proteolytic Enzymes: A Practical Approach** (Edited by Beynon R. and Bond J.S.), pp. 241-249, 1989.
- 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.

- BLACK R. A., Kronheim S.R., Sleath P.R. Activation of interleukin-1b by a c0-induced protease. **FEBS Lett.** 247, 386-390, 1989.
- 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.
- BODE, W. e HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinase. **Eur. J. Bioch.** 204: 433-451, 1992.
- BOLTER, C. J. Methyl jasmonate induces papain inhibitor(s) in tomato leaves. **Plant Physiol.** 103: 1347-1353, 1993.
- BOLTER, C.J. e LATOSZEK – GREEN, M. Effect of chronic ingestion of the cysteine proteinase inhibitor E-64, on Colorado Potato Beetle gut Proteinase. **Ent. Exp. Appl.** 83: 295-303, 1997.
- 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.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248, 1976.
- BRANDON, D.L., HAQUE, S., FRIEDMAN, M. Interaction of monoclonal antibodies with soybean trypsin inhibitors. **J. Agric. Food. Chem.**, 35:195-200, 1987.
- 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 synthesis of new proteinases. **Comp. Biochem. Physiol.** 128: 365-375, 2001.
- BROADWAY, R.M. e 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(2): 107-116, 1995.

- BROADWAY, R.M. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** 32: 39-53, 1996.
- CHEN, M. S., Johnson, B., Wen, L., Muthukrishnan, S., Kramer, K. J., Morgan, T.D., Reek, G.R. Rice cystatine-bacterial expression, purification, cysteine proteinase inhibitory activity and insect growth suppressing activity of a truncated form of the protein. **Protein Expr. Purif.** 3: 41-49, 1992.
- 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.
- DE LEO, F., Bonade-Bottino, M. A. Ceci, L.R., Gallerani, R. and Jouanin, L. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. **Plant Physiol.** 118: 997-1004, 1998.
- DUAN, X.; Xiaogang, L.; Quingzhong, X; Abo-El-Saad, M.; Xu, D.; Wu, R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. **Nat. Biotechnol.**14: 494-498, 1996.
- 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. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Bioph.** 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.
- FARMER, E.E. e RYAN, C.A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the syntesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **The Plant Cell**, 4: 129-134, 1992.
- 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.: Mecanismo de resposta de plantas de soja ao ataque de *Anticarsia gemmatilis* pela via das lipoxigenases. UFV, viçosa 2001. 80p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica)-Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- FRANCO, O. L., Rigdn, D.J., Melo FR, Grossi-de-Sá, M.F. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect alpha-amylase. **Eur. J. Biochem.** 269: 397-412, 2002.
- 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.; Davison, G.M.; Newell, C.A.; Merryweather, A.; Hamilton, W.D.O., Burgess, E.P.J.; Gilbert, R.J.C.; Gatehouse, J.A. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato north, *Lacanobia oleoracea*: growth room trials. **Molecular Breed.** 31:49-63, 1997.
- 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.
- GRUDEN, K., Strukelj, B., Popovic, T., Lenarcic, B., Bevec, T., Brzin, J., Kregar, I., Velikonja, J.H., Stiekema, W.J., Bosch, D., Jongsma, M.A.. The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 28: 549-560, 1998.
- GRUDEN, K., Strukelj, B., Ravnikar, M., Poljsak-Prijatelj, M., Mavric, I., Brzin, J., Pungercar, J., Kregar, I. Potato cysteine proteinase inhibitor gene family; molecular cloning. Characterization and immunocytochemical localisation studies. **Plant Mol. Biol.** 34: 317-323, 1997.
- HANADA K., Tamai M., Yamagishi M., Ohmura S., Sawada J. and Tanaka I. Isolation and characterization of E-64, a new thiol protease inhibitor. *Agric. Biol. Chem.* **42**, 523-528, 1978.

- 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.
- HASHIDA S., Towatari T., Kominami E. and Katunuma N. Inhibitions by E-64 derivatives of rat liver cathepsin B and cathepsin L *in vitro* and *in vivo*. **J. Biochemical(Tokyo)**. 88: 1805-1811, 1980.
- HILDER, V.A.; Gatehouse, A.M.R.; Sheerman, S.E.; Barker, R.F.; Boulter, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**. 330:160-163, 1987.
- HINDS, W.E. e OSTERBERGER, B.A. The soybean caterpillar in Louisiana **J. Econ. Entomol.** 24:1168-1173, 1931.
- HINKS, C. F., e HUPKA, D. The effects of feeding leaf sap from oats and wheat with and without soybean trypsin inhibitor, on feeding behaviour and digestive physiology of adult males of *Melanoplus sanguinipes*. **J. Insect Physiol.** 41: 1007-1015, 1995.
- HOFFMAN-CAMPO, C.B.; Oliveira, E.B.; Moscardi, F. Criação massal de lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). Londrina, **EMBRAPA-CNPSO**, 10, Documentos, 23p, 1985.
- ISHIKAWA, A., Ohta, S., Matsuoka, K., Hattori, T., Nakamura K. A family of potato genes that encode Kunitz-type proteinase inhibitor: Structural comparisons and differential expression. **Plant Cell Physiol.** 35: 303-312, 1994.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz;** métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed..São Paulo, 1985. v. 1, 533p.
- JONGSMA, M.A. e BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **J. Insect Physiol.** 43 (10): 885-895, 1997.
- JONGSMA, M.A., Bakker, P.L., Peters, J., Bosch, D. and 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.** 92: 8041-8045, 1995.

- JOUANIN L.; Bonadé-Bottino, M.; Girard, C.; Morrot, G.; Giband, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**. 131:1-11, 1998.
- KAMENS J., Paskind M., Hugunin M., Talanian R. V., Allen H. Banach D., Bump N., Hackett M., Johnston C.G., Li P., Mankovich J. A., Terranova M. and Ghayur T. Identification and characterization of ICH-2, a novel member of the interleukin-1 β -converting enzyme family of cysteine proteases. **J. Biol. Chem**. 270: 15250-15256, 1995.
- KENNEDY, A.R. Chemopreventive Agents: Protease Inhibitors. **Pharmacol. Therapeutic**. 78 (3): 167–209, 1998.
- KHUSH, G.S. Green revolution preparing for the 21 st century. **Genome**. 42: 646-655, 1999.
- 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.
- 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.
- KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II – General properties. **J. of Genet. Physiol.**, 30:291-310, 1947.
- LASKOWSKI, Jr M. e KATO, I., (1980). Protein inhibitor of proteinases. **Ann. Rev. Biochem.**, 49:593-626.
- LEE, M.J. e 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.

- 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.
- LIDDLE, R. A., Green G. M., Conrad, C. K. and Williams, J.A. Proteins but not amino acids, carbohydrates, or fats stimulate cholecystokinin secretion in the rat. **Ame. J. Physiol.** 251, G243-G248, 1986.
- 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. **The Journal of Biological Chemistry.** 256: 1661-1668, 1981.
- MATSUMOTO, I., Emori, Y., Abe, K., Arai, S. Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (maize weevil), and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells. **J. Biochemical.** 121: 464-476, 1997.
- MAZUMDAR – LEIGHTON, S. e BRODWAY, 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, 2001a.
- McMANUS, M.T. e BURGESS, E.P.J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. **J. Insect Physiol.** 41 (9):731-738, 1995.
- MELLO, M.O., e SILVA-FILHO, M.C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Braz. J. Plant Physiol.** 14(2): 71-81 2002.
- 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.
- NISHIDA, R. Sequestration of defensive substances from plants by lepidoptera. **Annu. Rev. Entomol.** 47: 57-92, 2002.
- NORIEGA, F.G., Barillas-Mury C. and Wells, M.A. Dietary control of late trypsin gene transcriptional in *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 24: 627-631, 1994.

- 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.
- ORTEGO F., Novillo C. and Castañera P. Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae). **Arch. Insect Biochem. Physiol.** 33: 163-180, 1996.
- PANDA, N. e KHUSH, G. S. Host plant resistance to insects. **C.A.B. International, Wallingford**, 1995.
- Parkes C., Kembhavi A. A. and Barrett A.J. Calpain inhibition by peptide epoxides. **Biochem. J.** 230: 509-516, 1985.
- 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.; Cristofolletti, P.T.; Parra, J.R.P.; Terra, W.R.; Silva-Filho, M. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **J. of Econ. Entomol.** 93(3): 892-896, 2000.
- PEÑA-CORTES H., Sánchez-Serrano J. J. and Willmitzer L. Systemic induction of proteinase-inhibitor-II gene expression in potato plants by wounding. **Planta** 174, 84-89, 1988.
- 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.
- RICHARDSON, M. Seed storage proteins : the enzyme inhibitors . **Meths Plant Biochem.** 5: 259-305, 1991.
- 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.

ROBINSON, R. A. **Return to resistance:** breeding crops to reduce pesticide dependence. Davis: Ag.acess, 1996. 490 p.

ROY I. e GUPTA M. N. Purification of a “doublehesded” 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. e JANDENDORF, A. Self Defense by Plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 92:4075, 1995.

RYAN, C.A. Genes for improving defences against insects and pathogens. **Annu. Rev. Phytopathol**. 28:245-449, 1990.

RYMERSON, R.T., e BODNARYK, R.P. Gut proteinase activity in insect pests of canola. **Can. Ent**. 127: 41-48, 1995.

SCOTT J.G. e WEN Z. M. Cytochromes P₄₅₀ of insects: the tip of the iceberg. **Pest Manag. Sci**. 57: 958-967, 2001.

SESSA, D.J. e WOLF, W.J. Bowman– Birk inhibitors in soybean seed coats. **Ind. Crops Prod**. 14:73– 83, 2001.

SHARARA, A.I., Bouras, E.P., Misukonis, M.A. and Liddle, R.A. Evidence for indirect dietary regulation of cholecystokinin release in rats. **Am. J. of Physiol**. 265: G107-G112, 1993.

SILVA, F. B.; Oliveira, M.G.A.; Batista, R. B.; Pires, C. V.; Xavier, L. P.; Piovesan, N. D.; Oliveira, J. A.; Josè, I. C.; Moreira, M. A. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). **Arq. Inst. Biol**. 60(1): 67-74, 2002.

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-FILHO, M.C. e FALCO, M.C. Interação Planta-inseto – Adaptação dos Insetos aos Inibidores de Proteinases Produzidas pelas Plantas. **Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento.** 12: 38-42, 2000.
- SREEDHARAN S. K., Verma C., Caves L. S. D., Brocklehurst S. M., Gharbias S. E., Sahah H. N. and Brocklehurst K. Demonstration that *l-trans*-epoxysucciny-L-leucilamido-(4-guanidino)butane (E-64) is one of the most effective low Mr inhibitors of trypsin-catalysed hydrolysis. Characterization by kinetic analysis and by energy minimization and molecular dynamics simulation of the E-64- β -trypsin complex. **Biochem. J.** 316: 777-786, 1996.
- 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. **An. Entomol. Brasil.** 6(2):180-193.
- TERRA, W.R. e FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol.** 109B(1): 1-62, 1994.
- 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.
- TROWBRIDGE, C. G.; Krehbiel, A., Laskowshi, M. Jr. Substrate activation of trypsin. **Biochemistry**, 2 : 843-50, 1963.
- TSUZUKI, S., Fushiki, T., Kondo A., Murayama, H. and Sugimoto, E. Effect of a high-protein diet on the gene expression of a Trypsin-sensitive, cholecystokinin-releasing peptide (monitor peptide) in the pancreas. **Eur. J. Biochem. Mol. Biol.** 199: 245-252, 1991.

- TURK, B., Turk, V., Turk, D., Structural and functional aspects of papain-like e cysteine proteinases and their protein inhibitors. **Biol. Chem.** 378: 141-150, 1997.
- WALSH, T.A., e STRICKLAND, J. Á. The 85-Kd crystalline cysteine protease inhibitor from potato contains 8 cystatin domains. **Protein Engng** 6: 53-56, 1993.
- WAN, X.S.; Ware, J.H.; Zhang, L.; Newberne, P.M.; Evans, S.M.; Clark, L.C; Kennedy, A.R. Treatment with soybean-derived Bowman Birk inhibitor increases serum prostate-specific antigen concentration while suppressing growth of human prostate cancer xenografts in nude mice. **Prostate.** 41(4): 243-252, 1999.
- WANG, C., Zien, C.A., Afithile, M., Welti, R., Hildebrand, D.F. Wang, X. Involvement of phospholipase D in wound-induced accumulation of jasmonic acid in Arabidopsis. **The Plant Cell.** 12: 2237-2246, 2000.
- WATERS, D.J. e BARFIELD, C.S. Larval development and consumption by *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) fed various legume species. **Environ. Entomol.** 18: 1006-1010, 1989.
- WATSON, J.R. Life history of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Huebner). **J. Econ. Entomol.** 9: 521-528, 1916.
- WILLE, J.E., (1943). **Entomologia Agricola del Peru.** Lima, Estacion Experimental Agricola de la Molina. 468p.
- 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 mong 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-FILHO, J. & CAMPOS, F.A.P. Proteinase inhibitors. In: CHEEKE, P.R. (ed). **Toxicants of Plant Origin.** Boca Raton, CCR Press. v. 3, p 1-27, 1989.

- XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitor in plants. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.** 4(1): 1-6, 1992.
- ZANGERL A. R. Furanocoumarin induction in wild parsnip: evidence for a induced defense against herbivores. **Ecology.** 71: 1926-1936, 1990.
- ZHANG, L.; WAN, X. S., DONAHUE, J. J., WARE, J. H., KENNEDY, A. R. Effects of the Bowman-Birk inhibitor on clonogenic survival and cisplatin- or radiation-induced cytotoxicity in human breast, cervical, and head and neck cancer cells. **Nutr. Cancer.** 33 92): 165-173, 1999.
- 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.
- ZUMBRUNN, A., Stone, S. and Shaw, E. **Biochem. J.**, 250: 621 1988. *In Proteolytic Enzymes: A Practical Approach* (Edited by Beynon R. and Bond J.S.), pp. 103, 1989. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

8. Apêndice

Tabela 1A – Na tabela abaixo estão apresentados os dados obtidos no experimento utilizados para obtenção da correlação de Pearson.

Concentração de benzamidina (%p/p)	Repetição	Consumo (mg)	Digestibilidade (%)	Peso final da lagarta (mg)	Peso de pupa (mg)
0	1	0,469	96,651	283,600	242,050
0	2	0,461	97,259	259,614	238,471
0	3	0,497	96,783	277,700	240,557
0	4	0,492	97,989	286,425	232,688
0	5	0,482	98,105	273,671	229,986
0,25	1	0,386	96,894	262,953	222,167
0,25	2	0,396	96,818	258,837	222,850
0,25	3	0,434	96,801	255,503	213,650
0,25	4	0,380	96,542	281,063	206,617
0,25	5	0,415	96,836	244,382	198,000
0,5	1	0,572	98,242	221,567	202,700
0,5	2	0,581	98,108	226,720	191,360
0,5	3	0,624	98,148	240,200	194,180
0,5	4	0,605	98,321	231,960	177,780
0,5	5	0,621	98,399	248,440	193,140
0,75	1	0,543	97,800	261,100	223,514
0,75	2	0,566	97,979	274,673	235,000
0,75	3	0,587	98,142	231,271	205,186
0,75	4	0,591	98,132	222,667	190,033
0,75	5	0,585	98,129	256,567	245,283

Tabela 1B– Na tabela abaixo estão apresentados os dados obtidos no experimento utilizados para obtenção da correlação de Pearson.

Concentração de benzamidina (%p/p)	Repetição	Duração da fase larval (dias)	transformação em pupa(%)	Eclosão(%)
0	1	14,667	60	70
0	2	14,571	70	50
0	3	14,857	70	80
0	4	14,750	80	80
0	5	14,857	70	70
0,25	1	15,333	60	70
0,25	2	16,000	60	70
0,25	3	14,667	60	80
0,25	4	16,000	60	70
0,25	5	15,667	60	60
0,5	1	18,333	60	70
0,5	2	17,600	50	60
0,5	3	18,000	50	50
0,5	4	17,200	50	60
0,5	5	17,600	50	70
0,75	1	16,000	70	70
0,75	2	16,000	70	80
0,75	3	16,000	70	60
0,75	4	16,000	60	70
0,75	5	16,000	60	70

Tabela 2A– Na tabela abaixo estão apresentados os dados obtidos no experimento referente ao ganho de peso diário, utilizados para obtenção da análise de Variância com medidas repetidas.

Concentração de benzamidina (%p/p)	Repetição	Peso Diário (mg)								
		1	3	5	7	9	11	13	15	17
0	1	0,23	2,06	4,67	16,28	69,71	132,46	255,36	280,11	280,11
0	2	0,17	1,79	4,17	15,38	68,17	121,79	236,60	258,60	258,60
0	3	0,14	2,04	4,65	15,94	67,97	125,78	240,57	275,90	275,90
0	4	0,18	1,78	4,29	14,47	67,58	130,31	233,40	277,95	277,95
0	5	0,15	2,08	5,21	16,54	68,37	145,54	262,45	286,61	286,61
0,25	1	0,27	1,78	3,54	8,53	30,31	75,09	184,23	226,20	226,20
0,25	2	0,21	1,74	3,74	11,76	37,44	102,06	228,83	249,14	249,14
0,25	3	0,15	2,19	3,57	13,40	40,93	89,98	202,12	224,07	224,07
0,25	4	0,16	1,88	4,13	12,24	35,56	89,69	170,40	257,18	257,18
0,25	5	0,16	1,80	3,40	13,20	42,34	100,54	222,30	254,81	254,81
0,5	1	0,14	0,43	1,07	3,50	9,31	32,71	89,03	160,25	217,87
0,5	2	0,14	0,49	1,23	4,03	9,81	42,49	104,03	181,35	232,46
0,5	3	0,13	0,48	1,35	3,83	10,19	43,67	98,55	172,58	228,92
0,5	4	0,16	0,30	0,82	3,44	7,78	33,84	93,76	168,77	248,44
0,5	5	0,14	0,43	1,12	3,70	9,27	38,18	96,34	170,74	231,92
0,75	1	0,12	0,23	1,33	5,12	17,35	96,58	173,85	266,52	266,52
0,75	2	0,17	0,30	1,38	6,12	17,82	92,06	165,71	263,64	263,64
0,75	3	0,17	0,37	1,56	7,44	20,44	98,70	184,24	256,91	256,91
0,75	4	0,19	0,44	1,31	5,74	18,10	85,98	182,25	230,12	230,12
0,75	5	0,16	0,34	1,37	6,26	18,90	88,86	174,81	242,16	242,16

Tabela 2B– Na tabela abaixo estão apresentados os dados obtidos no experimento referente ao consumo diário, utilizados para obtenção da análise de Variância com medidas repetidas.

Concentração de benzamidina (%p/p)	Repetição	Consumo diário(mg)								
		1	3	5	7	9	11	13	15	17
0	1	25,21	20,22	33,32	62,17	93,57	109,57	58,10	58,10	58,10
0	2	27,83	20,80	33,17	65,80	105,26	116,56	61,71	61,71	61,71
0	3	25,80	20,98	36,01	67,80	105,33	112,14	50,99	50,99	50,99
0	4	29,41	29,19	46,74	70,96	116,92	126,84	70,57	70,57	70,57
0	5	27,37	43,69	57,49	98,43	129,22	135,32	69,36	69,36	69,36
0,25	1	20,22	22,67	14,68	44,59	47,15	115,03	96,66	26,49	26,49
0,25	2	22,53	30,46	19,62	34,17	61,09	131,64	96,88	25,39	25,39
0,25	3	20,15	27,20	15,48	23,83	40,71	114,17	119,00	20,39	20,39
0,25	4	18,98	27,36	15,66	25,10	44,37	112,46	115,30	19,80	19,80
0,25	5	19,20	22,33	17,16	33,58	51,19	116,85	119,71	21,65	21,65
0,5	1	25,86	16,29	45,28	73,83	67,17	85,36	182,41	102,37	15,52
0,5	2	29,97	15,38	49,95	60,60	68,95	89,48	174,22	99,11	16,96
0,5	3	22,81	16,18	46,62	56,74	69,37	90,10	172,32	96,87	15,96
0,5	4	34,53	14,47	48,31	62,51	70,85	93,22	169,69	97,12	18,35
0,5	5	28,29	15,58	47,54	63,42	69,09	89,54	174,66	98,87	16,70
0,75	1	19,43	26,10	22,43	28,51	83,32	107,76	39,68	37,95	37,95
0,75	2	19,54	26,86	23,14	30,00	81,58	108,75	39,74	35,54	35,54
0,75	3	21,56	27,55	31,08	35,03	85,22	109,88	39,58	34,36	34,36
0,75	4	14,15	26,47	31,68	33,49	86,46	103,59	40,97	36,97	36,97
0,75	5	17,49	26,90	33,11	59,88	129,86	115,80	38,15	36,88	36,88

Tabela 2C– Na tabela abaixo estão apresentados os dados obtidos no experimento referente à atividade proteolítica durante a fase larval, utilizados para obtenção da análise de Variância com medidas repetidas.

Concentração de benzamidina (%p/p)	Repetição	A280 / mg de proteína								
		1º dia	3º dia	5º dia	7º dia	9º dia	11º dia	13º dia	15º dia	17º dia
0	1	0,0700	0,1910	0,3300	0,4490	0,7920	0,4560	0,0700	0,1910	0,3300
0	2	0,0670	0,1740	0,3420	0,4180	0,7300	0,4280	0,0670	0,1740	0,3420
0	3	0,0660	0,1650	0,3530	0,4870	0,7780	0,4660	0,0660	0,1650	0,3530
0,25	1	0,0680	0,1250	0,1500	0,2650	0,9870	0,5660	0,0680	0,1250	0,1500
0,25	2	0,0640	0,1180	0,1790	0,2450	0,9850	0,5470	0,0640	0,1180	0,1790
0,25	3	0,0620	0,1140	0,1740	0,2210	0,9770	0,6030	0,0620	0,1140	0,1740
0,5	1	0,0650	0,0310	0,3640	0,0989	1,1800	0,7750	0,0650	0,0310	0,3640
0,5	2	0,0660	0,0330	0,3430	1,0640	1,2080	0,7760	0,0660	0,0330	0,3430
0,5	3	0,0660	0,0350	0,3160	0,8890	1,1760	0,7720	0,0660	0,0350	0,3160
0,75	1	0,0680	0,1100	0,1600	0,2530	0,5770	0,3830	0,0680	0,1100	0,1600
0,75	2	0,0640	0,0970	0,1950	0,2360	0,5570	0,3670	0,0640	0,0970	0,1950
0,75	3	0,0610	0,0990	0,1870	0,2680	0,5220	0,3790	0,0610	0,0990	0,1870

Tabela 2D– Na tabela abaixo estão apresentados os dados obtidos no experimento referente à atividade trípica durante a fase larval, utilizados para obtenção da análise de Variância com medidas repetidas.

Concentração de benzamidina (%p/p)	Repetição	V, $\mu\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$ / mg de proteína								
		1º dia	3º dia	5º dia	7º dia	9º dia	11º dia	13º dia	15º dia	17º dia
0	1	0,0038	0,0110	0,0483	0,1002	0,0964	0,0398	0,0038	0,0110	0,0483
0	2	0,0050	0,0094	0,0505	0,1004	0,0886	0,0489	0,0050	0,0094	0,0505
0	3	0,0045	0,0069	0,0333	0,0462	0,0780	0,0765	0,0045	0,0069	0,0333
0,25	1	0,0038	0,0076	0,0241	0,0664	0,0596	0,0261	0,0038	0,0076	0,0241
0,25	2	0,0050	0,0071	0,0161	0,0654	0,0527	0,0395	0,0050	0,0071	0,0161
0,25	3	0,0045	0,0049	0,0247	0,0644	0,0509	0,0367	0,0045	0,0049	0,0247
0,5	1	0,0038	0,0110	0,0289	0,0561	0,1110	0,0425	0,0038	0,0110	0,0289
0,5	2	0,0050	0,0120	0,0201	0,0523	0,1150	0,0539	0,0050	0,0120	0,0201
0,5	3	0,0045	0,0117	0,0201	0,0530	0,1037	0,0512	0,0045	0,0117	0,0201
0,75	1	0,0038	0,0082	0,0155	0,0394	0,0963	0,0430	0,0038	0,0082	0,0155
0,75	2	0,0050	0,0092	0,0114	0,0308	0,0783	0,0414	0,0050	0,0092	0,0114
0,75	3	0,0045	0,0052	0,0105	0,0282	0,0736	0,0414	0,0045	0,0052	0,0105