

**JEANNE SCARDINI MARINHO**

**RESPOSTA BIOQUÍMICA DE LAGARTAS DE *Thyrinteina leucoceraea*  
(LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE), SUBMETIDAS AO INIBIDOR DE  
SERINO-PROTEASES BENZAMIDINA**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2006**

**JEANNE SCARDINI MARINHO**

**RESPOSTA BIOQUÍMICA DE LAGARTAS DE *Thyrintina leucoceraea*  
(LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE), SUBMETIDAS AO INIBIDOR DE  
SERINO-PROTEASES BENZAMIDINA**

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

APROVADA: 15 de fevereiro de 2006.

---

Prof. Raul Narciso Carvalho Guedes  
(Conselheiro)

---

Prof. Angelo Pallini Filho  
(Conselheiro)

---

Prof. Joel Antônio de Oliveira

---

Prof<sup>a</sup>. Andréa de Oliveira Ribon

---

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

*“O louvor, e a glória, e a sabedoria, e as ações de graças, e a honra, e o poder,  
e a força sejam ao nosso Deus, pelos séculos dos séculos. Amém!”*

Apocalipse 7:12

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela vida, pela providência, pelo amor e por ter cuidado de cada detalhe para a conclusão deste trabalho.

Agradeço aos meus pais, Julinho e Judismar, pelo incentivo, pelo apoio, pelo amor e pela presença mesmo à distância. Aos meus irmãos Néa, Jucimar e Meire, e cunhados Marlene e Flávio, pela amizade e incentivo. Aos meus sobrinhos Guilherme, Bruno, Caio, Brenda, Gustavo e Lucas, pelo carinho e alegria.

Ao meu namorado e amigo Fred, pelo carinho, incentivo e companheirismo.

À Prof<sup>a</sup> Maria Goreti de Almeida Oliveira pela orientação deste trabalho, pela disposição, pelos conhecimentos dispensados e pela amizade.

Ao Prof. Raul Narciso Guedes, pela atenção e disposição, pelas sugestões ao trabalho e pelo auxílio na análise estatística dos dados.

Ao Prof. Angelo Pallini, pelas sugestões ao trabalho, pela atenção e pelo espaço cedido junto ao Laboratório de Acarologia para a criação dos insetos.

Ao Prof. Joel Antônio de Oliveira e à Prof<sup>a</sup> Andréa de Oliveira Ribon pela aceitação ao convite para compor a banca de defesa e pelas sugestões ao trabalho. Agradeço também ao Prof. Joel pelas correções gramaticais da dissertação.

Às estudantes de iniciação científica, Nathália e Kênia, que muito me ajudaram na execução deste trabalho. Obrigada pela disposição, pelo carinho e pela amizade.

Ao Anderson Pilon, à Liliane, ao Eduardo, à Rubia e a todos os colegas do laboratório de Enzimologia pela receptividade, pelo auxílio e pela amizade. Ao Sr. Fausto pelo carinho e atenção.

Aos colegas do laboratório de Acarologia pela disposição e aos colegas de curso pelo companheirismo.

Às secretárias da pós-graduação em Entomologia, Paula e Miriam, que estavam sempre prontas a ajudar.

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

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Aos amigos e irmãos da Igreja Presbiteriana de Viçosa, obrigada pelo apoio e pelas orações, e a todos que, de alguma forma, colaboraram para que este trabalho fosse concluído.

## **BIOGRAFIA**

JEANNE SCARDINI MARINHO, filha de Julinho Alves Marinho e Judismar Scardini Marinho, nasceu em Vitória, ES, no dia 07 de junho de 1980.

Em janeiro de 2004 graduou-se Engenheira Agrônoma pela Universidade Federal de Viçosa.

Em março de 2004 iniciou o curso de Mestrado em Entomologia na Universidade Federal de Viçosa e submeteu-se à defesa de tese para obtenção do título de “Magister Scientiae” em fevereiro de 2006.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	04
2.1. INTERAÇÃO INSETO-PLANTA.....	04
2.2. INIBIDORES DE PROTEASES.....	05
2.2.1. INIBIDORES DE SERINO-PROTEASES.....	07
2.3. <i>Thyrinteina leucoceraea</i> (LEPIDOPTERA: GEOMETRIDAE).....	08
2.4. OCORRÊNCIA DA <i>Thyrinteina leucoceraea</i> NAS CULTURAS DE GOIABA E EUCALIPTO.....	09
3. OBJETIVOS.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1. INSTALAÇÕES, MANUTENÇÃO E CRIAÇÃO DE <i>Thyrinteina leucoceraea</i> .....	11
4.2. OBTENÇÃO DAS MUDAS.....	11
4.3. TESTES BIOQUÍMICOS.....	11
4.3.1. APLICAÇÃO DO INIBIDOR DE PROTEASES NAS PLANTAS.....	11
4.3.1.1. GAIOLAS COM PLANTAS DE EUCALIPTO.....	11
4.3.1.2. GAIOLAS COM PLANTAS DE GOIABA.....	12
4.3.1.3. APLICAÇÃO DA SOLUÇÃO COM INIBIDOR DE PROTEASE.....	12

4.3.2. OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO DO INTESTINO MÉDIO DA LAGARTA DE <i>Thyrinteina leucoceraea</i> .....	12
4.3.2.1.DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA DO EXTRATO.....	13
4.3.2.2. ATIVIDADE PROTEÁSICA.....	13
4.3.2.3. ATIVIDADE AMIDÁSICA DE TRIPSINA-LIKE.....	13
4.3.2.4. ATIVIDADE ESTERÁSICA DE TRIPSINA-LIKE.....	13
4.3.2.5. ATIVIDADE DE CISTEINO-PROTEASES.....	14
4.3.2.6. DETERMINAÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEASES.....	14
4.3.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO FOLIAR.....	15
4.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5.1. ANÁLISE DOS EXTRATOS FOLIARES DE EUCALIPTO E GOIABEIRA.....	17
5.2. ANÁLISE DO INTESTINO MÉDIO DE LAGARTAS DE <i>Thyrinteina leucoceraea</i> PROVENIENTES DE PLANTAS DE GOIABA.....	21
5.2. ANÁLISE DO INTESTINO MÉDIO DE LAGARTAS DE <i>Thyrinteina leucoceraea</i> PROVENIENTES DE PLANTAS DE EUCALIPTO.....	32
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43



## RESUMO

MARINHO, Jeanne Scardini, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Fevereiro de 2006. **Resposta bioquímica de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* (Lepidoptera: Geometridae), submetidas ao inibidor de serino-proteases benzamidina.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Conselheiros: Angelo Pallini Filho e Raul Narciso Carvalho Guedes.

Os insetos são responsáveis por grandes perdas nas plantas, por isso há a necessidade de controlá-los. Entretanto, alguns insetos convivem com as plantas sem causarem danos, não havendo, portanto, necessidade de se realizar o controle. Esse é o caso da *Thyrinteina leucoceraea* se alimentando da goiabeira, espécie nativa da família das Myrtaceae. O *Eucalyptus* ssp., entretanto, é exótico, vindo da Austrália, também pertence à família das Myrtaceae, e tem sofrido danos pela *T. leucoceraea*, que se tornou uma praga séria à eucaliptocultura brasileira. Sabe-se que as plantas, em geral, reagem aos danos que sofrem. Existem nas plantas compostos chamados inibidores de proteases que podem ser produzidos nelas como resposta ao ataque de insetos. A introdução de genes que codificam a produção de inibidores de proteases em plantas constitui em método que vem sendo muito estudado por conferir resistência a insetos; além disso, muitas pesquisas vêm demonstrando o potencial dos inibidores de proteases introduzidos na dieta com a finalidade de prejudicar o desenvolvimento do inseto. Assim, o presente trabalho teve por objetivo verificar a produção de inibidores de proteases pelas plantas de goiaba, hospedeiro aparentemente resistente, e de eucalipto quando atacadas pela *T. leucoceraea*, bem como a resposta bioquímica dessas lagartas quando ingeriram o inibidor de serino-proteases benzamidina em ambos os hospedeiros, em três diferentes concentrações: 0,12, 0,25 e 0,5%, para avaliar sua possibilidade de uso no controle do inseto. Verificamos que as plantas de eucalipto produziram mais inibidores de proteases do que as plantas de goiaba. A capacidade da *T. leucoceraea* em se desenvolver bem no eucalipto mesmo com a alta concentração de inibidores, pode ser explicada observando as atividades das enzimas nos intestinos das lagartas. A *T. leucoceraea* parece ter desenvolvido uma adaptação ao inibidor produzido pela planta de eucalipto e

responde com uma elevação da atividade das serino-proteases, o que pode ser devido a uma ativação enzimática frente à ingestão crônica do inibidor. A benzamidina interferiu na resposta bioquímica das lagartas, entretanto não se mostrou eficiente em reduzir a atividade enzimática no intestino médio delas, provavelmente devido à adaptação das mesmas ao inibidor de proteases.

## ABSTRACT

MARINHO, Jeanne Scardini, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February of 2006. **Biochemistry answer of caterpillars of *Thyrintaina leucoceraea* (Lepidoptera: Geometridae), fed with the serine-proteinases inhibitor benzamidine.** Adviser: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Committee members: Angelo Pallini Filho and Raul Narciso Carvalho Guedes.

The insects may cause considerable losses to plants, necessitating the control of these pests. However, some insects inhabit plants without causing considerable losses. For example, *Thyrintaina leucoceraea*, native insect, inhabit guava plants, native Myrtaceae harbor, and don't need to be controlled. The *Eucalyptus* ssp., however, is a novel Myrtaceae host in Brazil, from Austrália, and suffer attacks by *T. leucoceraea*, that became a severe pest to this plant. Plants can defend themselves and use proteinase inhibitors for defense against insects. The introduction of genes that encode proteinase inhibitors into plants can confer significant insect pest resistance to the transformants, moreover, researches have demonstrated the potential of the proteinase inhibitors in the insect food to reduce its development. Thus, the objectives of this work was to verify the production of proteinase inhibitors by guava plants, host apparently resistant, and eucalyptus plants upon *T. leucoceraea* attack, and to analyse the biochemistry answer of these caterpillars to the serine-proteinase inhibitor benzamidine, in both hosts, in three concentrations: 0.12, 0.25 and 0.5%, to evaluate its possibility use to control this insect. Eucalyptus plants produced more proteinase inhibitors than guava plants. The good development of *T. leucoceraea* in eucalyptus plants despite the high concentration of proteinase inhibitors, may be due to the elevation to the enzymes activity into the midgut of the caterpillars. The data suggest that *T. leucoceraea* developed an adaptation to the proteinase inhibitor produced by eucalyptus plants, by increasing the serine-proteinase activity. This increase may be due to the ativation of the secondary site of the enzymes. The benzamidine interfered the biochemistry answer of the caterpillars, but didn't reduce its proteinase activity, probably due to the adaptation capacity of these insects to the inhibitor.

## 1. INTRODUÇÃO

Na agricultura mundial, as perdas devidas ao ataque de insetos podem chegar a 20% da produção (Robinson, 1996). Os insetos herbívoros provocam severos danos às plantas. Estes danos se refletem numa menor produção de sementes pelas mesmas, diminuindo seu potencial vegetativo e reprodutivo (Marquis *et al.*, 1992; Agrawal, 1998; Cortesero *et al.* 2000). Por isso, há a necessidade real de controle dessas pragas.

Na tentativa de controlar o ataque de pragas, têm-se buscado novos métodos que não sejam baseados em pesticidas, os quais, apesar de manterem a produtividade, causam sérios danos ao meio ambiente e ao homem. O controle biológico é uma boa alternativa. No controle da *Thyrinteina arnobia*, por exemplo, utiliza-se o percevejo *Podisus nigrispinus*. Esse tipo de controle, porém, pode implicar em impacto ambiental indesejado na área sujeita ao mesmo (van Lenteren *et al.*, 2006).

Um dos métodos que tem sido empregado mais recentemente é a introdução de genes que codificam inibidores de proteases em plantas, como forma de conferir resistência a insetos (Hoffman *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1996; De Leo *et al.*, 2001; Delledonne *et al.*, 2001), bem como a utilização desses inibidores diretamente na dieta do inseto (Kuroda *et al.*, 1996; Koiwa *et al.*, 1998; Bell *et al.*, 2001; Nandeesh & Prasad, 2001). Juntamente com vários resultados positivos obtidos em plantas transgênicas resistentes a pragas via expressão de genes de inibidores de proteases ou com o uso desses inibidores em dietas, um número crescente de trabalhos mostram que os insetos são capazes de adaptarem-se à presença dos inibidores produzidos pelas plantas (Broadway, 1995; Jogsma *et al.*, 1995; Bolter & Jogsma, 1995; Michaud *et al.*, 1995).

Alguns insetos, entretanto, convivem com determinadas plantas sem causarem danos, não havendo, portanto, necessidade de controle dos mesmos. Esse é o caso das Myrtaceae nativas do Brasil (goiabeira, guabirobeira, etc.), que abrigam insetos nativos que sobrevivem nesses hospedeiros aparentemente sem apresentarem surtos populacionais (Zanuncio *et al.*, 1990). *Eucalyptus ssp.*, que também pertence à família das Myrtaceae, quando chegou ao Brasil, criou expectativas de que também não sofresse surtos

populacionais de pragas, pois o mesmo contém altas concentrações de compostos secundários que defenderiam as plantas contra o ataque de herbívoros (Anjos et al., 1986). Porém, tem ocorrido o contrário e muitos insetos pertencentes às ordens Lepidoptera, Coleoptera e Isoptera, que se alimentavam de mirtáceas nativas como a jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) e a goiabeira (*Psidium guajava*), tornaram-se sérias pragas da eucaliptocultura brasileira (Bragança et al., 1998).

Somente da ordem Lepidoptera já foram encontradas mais de 280 espécies alimentando-se das folhas de eucaliptos no Brasil (Santos *et al.*, 1986). Destas, destacam-se duas do gênero *Thyrintina* ssp. (Lepidoptera: Geometridae), a *T. arnobia* e a *T. leucoceraea*.

As plantas, em geral, reagem aos danos que sofrem. Já se tem conhecimento de que as plantas possuem um complexo sistema de defesa com o objetivo de reduzir os danos provocados pelos herbívoros (Karban & Baldwin 1997; Agrawal, 1998). Este sistema de defesa de plantas contra insetos herbívoros pode se expressar de modo constitutivo (presente na planta independente da ocorrência de ataques) e/ou induzido (manifestando-se após algum dano) (Cortesero et al., 2000).

Holtz (2001) observou que lagartas do gênero *Thyrintina* tiveram o desempenho prejudicado (maior mortalidade, menor número de descendentes, etc.) quando criadas em folhas de goiabeira se comparadas àquelas criadas sobre folhas de eucalipto, o que sugere que a goiabeira se defenda melhor contra esses insetos do que o eucalipto. As razões que explicam esse fato ainda não são conhecidas e demandam mais investigações. Sendo assim, por que as lagartas de *Thyrintina* ssp. têm sido mais prejudicadas pela defesa da goiabeira do que pela defesa do eucalipto?

Estudos têm revelado que as plantas possuem compostos conhecidos por inibidores de proteases (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002). Os inibidores de proteases desenvolvem nas plantas o papel de defesa em resposta ao ataque de insetos através da inibição da protease no intestino dos mesmos (Lawrence & Koundal, 2002). Assim, a inibição de proteases irá diminuir a biodisponibilidade de aminoácidos para a síntese de proteínas necessárias ao crescimento e desenvolvimento do inseto acarretando, desta forma, sua morte (Hilder *et al.*, 1987; Ryan, 1990; Vila *et al.*, 2005). Quando ocorrem ferimentos

em folhas de plantas, há um grande aumento na síntese de inibidores de proteases no local do ferimento (resposta local), e também por toda a planta (resposta sistêmica) (Farmer & Ryan, 1992).

Tem sido observado que insetos que se alimentam de inibidores de proteases artificialmente introduzidos na dieta ou já presentes naturalmente no tecido da planta, geralmente apresentam crescimento, desenvolvimento e/ou sobrevivência prejudicados (Malone *et al.*, 1998; Vila *et al.*, 2005), como foi observado em lagartas da soja (*Anticarsia gemmatalis*) (Pilon, 2004). É possível, portanto, que as goiabeiras produzam maiores quantidades de inibidores de proteases quando atacadas pelos herbívoros em relação às plantas de eucalipto, e por isso estejam obtendo maior sucesso na defesa contra esses insetos.

Neste contexto, este trabalho teve o objetivo de verificar a presença de inibidores de proteases nas folhas de goiabeira (*Psidium guajava*) e eucalipto (*Eucalyptus* ssp.), bem como a ação desses sobre a resposta bioquímica de *Thyrintina leucoceraea*. Foi estudada também a ação das proteases digestivas do intestino médio do inseto para que se conhecesse melhor a interação bioquímica entre o inseto e a planta, bem como as diferentes respostas das plantas de eucalipto e goiaba ao inseto, com a finalidade de esclarecer o processo envolvido no mecanismo de interação bioquímica inseto-planta.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Interação inseto-planta

As plantas são o recurso básico para organismos em muitas teias alimentares (Agrawal & Karban, 2000). Como consequência, a maioria delas é consumida por inúmeros herbívoros e, quando estes as atacam, a seleção natural favorece a evolução dos mecanismos de defesa das mesmas (Agrawal & Karban, 2000).

As estratégias de defesa das plantas contra os herbívoros podem ser classificadas em diretas ou indiretas (Arimura *et al.*, 2005) e se expressam de forma química ou física (Karban & Baldwin, 1997).

A defesa direta age exercendo um impacto negativo sobre o herbívoro que ataca a planta (Karban & Baldwin, 1997; Agrawal & Karban, 2000; Arimura *et al.*, 2005). Este tipo de defesa pode evitar a alimentação do herbívoro via barreiras físicas tais como espinhos, pêlos, tricomas e ceras (Arimura *et al.*, 2005); ou barreiras químicas com compostos do metabolismo secundário das plantas (como por exemplo fenilpropenóides, alcalóides e terpenóides) ou via proteínas especializadas (como os inibidores de proteases) (Haukioja *et al.*, 2002; Arimura *et al.*, 2005; Rodriguez-Saona & Thaler, 2005).

A defesa indireta da planta atua atraindo os inimigos naturais do herbívoro que ataca a mesma (Agrawal *et al.*, 2002). Por exemplo, alguns atributos da planta podem atrair os inimigos naturais dos herbívoros ou facilitar a sua ação, tais como: presença de néctar (Koptur, 1992), emissão de voláteis pelas plantas (Dicke & Sabelis, 1988) ou presença de domáceas em folhas (Agrawal *et al.*, 2000b).

Ambas as estratégias (diretas e indiretas) podem ser expressas constitutivamente ou de forma induzida (Karban & Baldwin, 1997; Agrawal, 1998; Agrawal & Karban, 2000; Arimura *et al.*, 2005).

A defesa constitutiva de plantas é formada por compostos ou substâncias produzidas pela planta, independente de ter sofrido algum dano, os quais podem afetar a biologia, o desenvolvimento e a reprodução dos insetos herbívoros (Karban & Baldwin, 1997; Agrawal, 1998; Thaler *et al.*, 2001). Estes compostos podem ser utilizados, inclusive, como inseticidas. Lara

(1991) cita como exemplo a nicotina, que é um excelente aficida e parece ser a causa de resistência de algumas variedades de *Nicotiana* a certos insetos.

A resistência induzida é um fenômeno encontrado em muitas plantas e se caracteriza pela redução da preferência ou do desempenho de herbívoros em plantas previamente atacadas se comparadas a plantas limpas (que não foram atacadas) (Karban & Baldwin, 1997; Agrawal, 2000a). Thaler *et al.* (2001) verificaram que a indução da produção de inibidores de proteases (proteínas de defesa das plantas) através da aplicação de ácido jasmônico em plantas de tomate levou à redução da abundância de insetos herbívoros atacando essas plantas.

As proteínas de defesa demonstram ser uma excelente estratégia de controle, pois podem ser produzidas constitutivamente em tecidos que são particularmente vulneráveis ao ataque de insetos, como sementes, ou podem ser induzidas 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 as enzimas quitinases e lectinas, e os inibidores de protease (Ryan, 1990; Silva *et al.*, 2002).

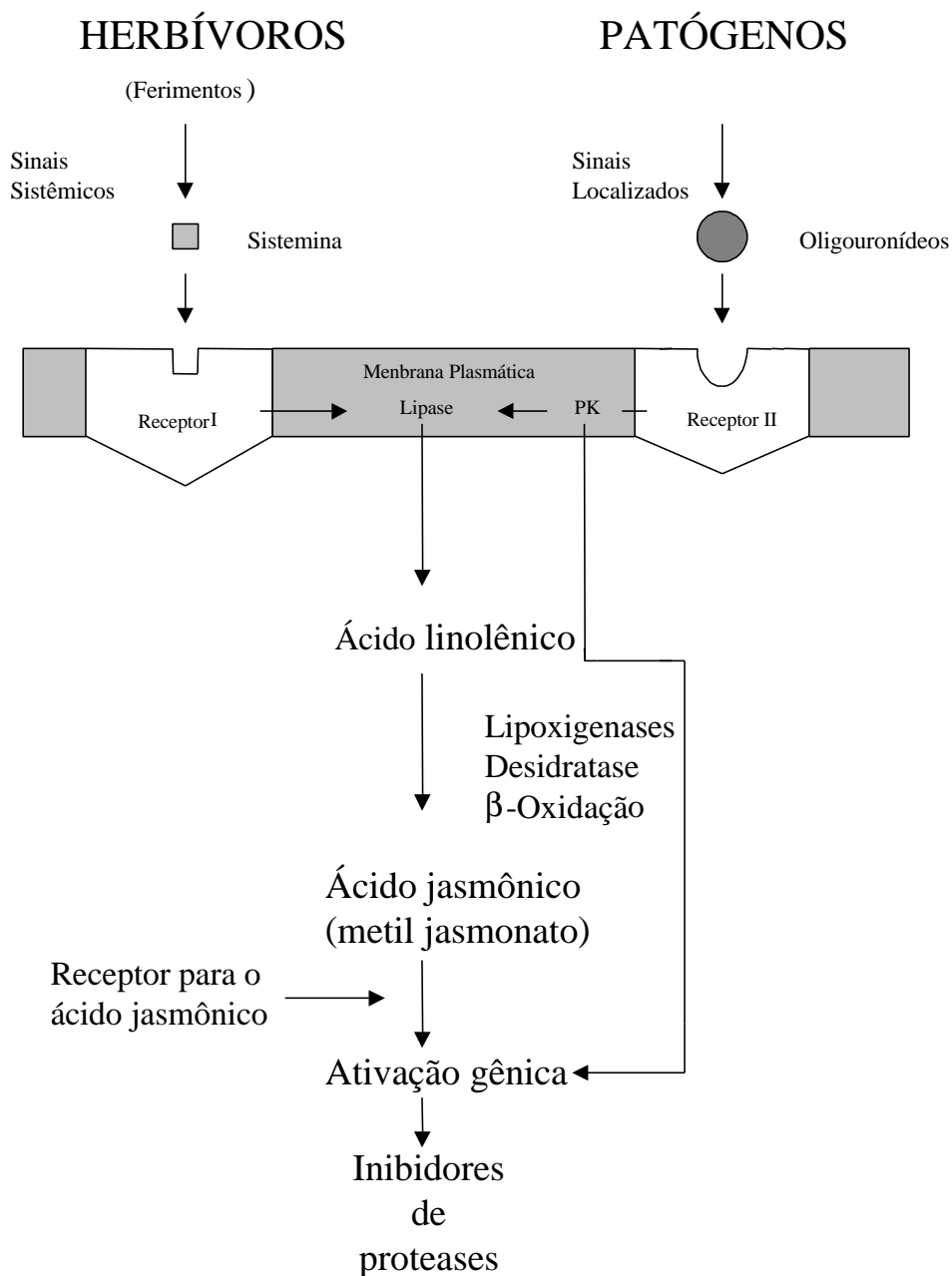
## **2.2. Inibidores de protease**

As proteases são enzimas presentes no intestino do inseto que realizam a degradação da proteína do alimento ingerido pelos mesmos. As proteases são classificadas em quatro tipos de acordo com os aminoácidos ativos e o centro de reação (Koiwa *et al.*, 1997): serino, cisteíno, aspartil e metallo-proteases. Elas degradam a proteína alimentar e biodisponibilizam os aminoácidos necessários ao crescimento e desenvolvimento normais do inseto (Vila *et al.*, 2005).

Espécies de insetos das ordens Coleoptera e Heteroptera tendem a utilizar cisteino-proteases (Murdock *et al.*, 1987), enquanto espécies de Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera e Diptera usam principalmente serino-proteases (Ryan, 1990; Wolfson & Murdock, 1990; Lawrence & Koundal, 2002).



Os inibidores de proteases 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 da transcrição de genes que codificam inibidores de proteases. O modelo proposto por Farmer & 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 1).



**Figura 1.** Mecanismo esquemático da ativação da produção de inibidores de proteases por ferimento em folhas de tomate. **PK**=Proteína Quinase (Farmer & Ryan, 1992).

A ingestão de inibidores de proteases inibe a atividade dessas enzimas (Shulke & Murdock, 1983), mas não elimina a digestão proteolítica no intestino médio dos insetos, ao contrário, resulta na hiperprodução dessas enzimas (Broadway & Duffey, 1986; Broadway, 1995). O efeito adverso ocorre com a ingestão crônica de inibidores, o que resulta na hiperprodução de proteases alimentares levando à limitação de aminoácidos essenciais para a síntese protéica (Shulke & Murdock, 1983) e à consequente redução do crescimento e do desenvolvimento do inseto podendo levá-lo à morte (Lawrence & Koundal, 2002).

### **2.2.1. Inibidores de serino-proteases**

A classe das serino-proteases, à qual pertencem proteases como tripsina, quimiotripsina e elastase, é responsável pela digestão inicial de proteínas de muitos animais. Todos os inibidores de serino-proteases de plantas realizam inibição competitiva e todos eles inibem a protease pelo mesmo mecanismo (Laskowski & Kato, 1980).

As serino-proteases têm sido identificadas em extratos do trato digestivo de muitas famílias de insetos, particularmente nas pertencentes à ordem Lepidoptera (Houseman *et al.*, 1989; Pompermayer, 2000; Pompermayer *et al.*, 2001). Os insetos dessa ordem, à qual pertencem muitas pragas de culturas importantes, apresentam pH ótimo no intestino numa faixa de 9-11 (Applebaum, 1985), onde serino-proteases e exopeptidases são mais ativas.

As plantas sintetizam diversos inibidores de serino-proteases, sendo estes encontrados inicialmente em órgãos de reserva de plantas, tais como sementes e tubérculos, e, posteriormente, detectados 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).

Pompermayer *et al.* (2003) verificaram a interferência negativa da ingestão de inibidores de proteases sobre o desenvolvimento de lagartas de *Diatraea saccharalis* e muitos outros estudos têm demonstrado o efeito anti-nutricional desses inibidores contra insetos da ordem Lepidoptera, quando oferecidos na alimentação (Shulke & Murdock, 1983; Applebaum, 1985).

### 2.3. *Thyrinteina leucoceraea* (Lepidoptera: Geometridae)

Duas espécies pertencentes ao gênero *Thyrinteina* apresentam grande importância como pragas florestais, são elas: *T. arnobia* e *T. leucoceraea*. Ambas são extremamente semelhantes em suas características morfológicas e comportamentais, mas são diferenciadas pela cor das antenas, brancas em *T. leucoceraea* e pretas em *T. arnobia* (Zanuncio *et al.*, 1993).

Suas lagartas são conhecidas por “lagarta de cor parda”, “lagarta parda” e “lagarta mede-palmo”. Ocorre em quase toda a América do Sul e parte da América Central, com registro de ocorrência em vários estados brasileiros (Zanuncio *et al.*, 1993).

Como hospedeiros exóticos são citadas, no Brasil, as espécies de eucalipto: *Eucalyptus rostrata*, *E. resinifera*, *E. urophylla*, *E. citriodora*, *E. grandis*, *E. tereticomis*, *E. saligna* e *E. cloesiana*. Como hospedeiros nativos são citados: congonha dos sertões (*Villaresia congonha*), laranjeira (*Citrus* sp.), além de espécies florestais nativas localizadas ao redor ou no sub-bosque de eucaliptais, tais como pau-terra (*Qualea* sp.), tingui (*Mogonia pubescens*), goiabeiras (*Psidium guajava*), cagaiteira (*Eugenia disinterica*), murici (*Byrsonima* sp.), assa-peixe (*Vernonia* sp.) e angico cangalha (*Peltophorum* sp.) (Zanuncio *et al.*, 1993).

Na fase adulta, esses insetos são mariposas cujas fêmeas apresentam asas brancas, com pontuações esparsas; na anterior existem duas linhas escuras que dividem as asas em três partes. As antenas são filiformes e curtas. Os machos apresentam asas de coloração castanha e antenas pectinadas, além de serem menores que as fêmeas (Gallo *et al.*, 2002).

A postura geralmente é feita circundando ramos finos e cada fêmea deposita cerca de 1000 ovos. O período de incubação é de 10 dias, após os quais eclodem as lagartas (Gallo *et al.*, 2002).

As lagartas apresentam seis estágios, com duração média da fase jovem de 26,8 dias. Logo após a eclosão, a lagarta mede 2-3 mm de comprimento, apresenta-se com coloração preta e torna-se castanho-escura ao atingir os últimos estágios, chegando a medir 50 mm ao final desta fase. Em repouso assumem uma posição ereta, usando de camuflagem contra os inimigos naturais.

Essas lagartas são ávidas comedoras de folhas de eucalipto. O ataque se inicia da base para o ápice da copa das árvores e das margens para o interior dos talhões. Nos quatro primeiros estádios, uma lagarta consome em média 12,09 cm<sup>2</sup> de área foliar, enquanto que nos dois últimos, este consumo se eleva para 108,49 cm<sup>2</sup> (Zanuncio *et al.*, 1993). Portanto, normalmente o ataque só é percebido quando a maioria das lagartas já atingiu os últimos instares, pelo súbito aumento de desfolhamento e pelo ruído da queda de suas fezes. O desfolhamento ocorre em plantios jovens e velhos (Zanuncio *et al.*, 1993).

O período pupal dura cerca de 10 dias. As lagartas transformam-se em pupas nas folhas, dobrando-as para sua proteção (Gallo *et al.*, 2002).

#### **2.4. Ocorrência da *Thyrinteina leucoceraea* nas culturas de goiaba e eucalipto**

A goiabeira (*P. guajava*) é uma planta nativa pertencente à família Myrtaceae. Nessa espécie podem ser encontrados alguns indivíduos do gênero *Thyrinteina*, mas esses insetos não chegam a ser considerados pragas na cultura da goiaba (Manica *et al.*, 2001) por não sofrerem surtos populacionais (Holtz, 2001) nem causarem danos econômicos à mesma, o que a transforma numa importante fonte de estudo a fim de elucidar as defesas das plantas contra os insetos.

O gênero *Eucalyptus* possui cerca de 600 espécies e variedades. As primeiras mudas, oriundas da Austrália, foram trazidas para o Brasil em 1824. A partir de 1904, o eucalipto foi plantado com fins econômicos (Andrade, 1961). Porém, só na década de 1970, devido à expansão da indústria siderúrgica, que utilizava carvão vegetal, e a indústria de papel e celulose, observou-se a implantação dos grandes maciços florestais no Brasil (Freitas, 1988). Além de exótica, a cultura do eucalipto é relativamente recente no Brasil e quando ela começou a ser plantada em grandes áreas de monocultivo, os insetos fitófagos que antes se alimentavam exclusivamente de mirtáceas nativas (como a goiabeira) passaram também a atacá-la (Zanuncio & Lima 1975), como é o caso da *Thyrinteina leucoceraea*. Esses insetos encontram-se em processo de franca adaptação ao eucalipto, causando danos consideráveis a este tipo de reflorestamento em surtos populacionais (Holtz, 2001).

### 3. OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivos verificar a presença de inibidores de proteases nas folhas de goiabeira (*Psidium guajava*) e eucalipto (*Eucalyptus* ssp.), bem como estudar sua ação sobre a resposta bioquímica de *Thyrinteina leucoceraea* a fim de comparar as diferentes respostas de uma espécie aparentemente resistente (goiabeira) com as de outra suscetível (eucalipto). Foi estudada, também, a ação das proteases digestivas do intestino médio do inseto em resposta à ação dos inibidores de proteases das plantas e do inibidor sintético de serino-proteases benzamidina. Estes estudos, em conjunto, visam auxiliar no esclarecimento do processo envolvido no mecanismo de interação bioquímica inseto-planta.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Instalações, criação e manutenção de *Thyrinteina leucoceraea***

As lagartas foram obtidas das criações mantidas no Departamento de Biologia Animal (DBA) da Universidade Federal de Viçosa, onde foram alimentadas com o seu hospedeiro de origem (eucalipto ou goiabeira). As criações foram formadas a partir de adultos provenientes de coleta em campo em plantios de eucalipto e goiaba no Estado de Minas Gerais. As lagartas, provenientes da mesma postura, foram criadas em copos individuais de 500mL tampados com tecido tipo organza e mantidos em uma sala de criação do prédio da Entomologia, UFV – MG. Dentro dos copos foi colocado substrato tipo vermiculita, para maior duração das folhas e duas folhas de eucalipto ou goiaba, de acordo com o tratamento e a origem das lagartas. As folhas eram trocadas quando necessário, de acordo com a voracidade apresentada em cada instar larval. Quando atingiram o 5º instar, as lagartas foram retiradas dos copos e utilizadas para montar o experimento.

### **4.2. Obtenção das mudas**

As mudas de plantas de goiaba e de eucalipto foram padronizadas com aproximadamente 50 cm de altura e com histórico livre de aplicação de qualquer produto via foliar ou infestação de insetos.

### **4.3. Testes Bioquímicos**

#### **4.3.1. Aplicação do inibidor de proteases nas plantas**

##### **4.3.1.1. Gaiolas com plantas de eucalipto**

Foram preparadas 4 gaiolas (1,0x 0,75x 0,70cm) contendo em cada uma 16 mudas de eucalipto, sendo que cada gaiola correspondia a um tratamento. As plantas de uma gaiola foram pulverizadas com uma solução controle aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v); as plantas das demais gaiolas foram pulverizadas com uma solução aquosa contendo Triton X-100 0,01% (v/v) acrescentada do inibidor de proteases benzamidina nas concentrações de 0,12, 0,25 e 0,5% conforme o tratamento. A solução de Triton X-100 0,01% (v/v) tem por objetivo somente aumentar a aderência da solução à folha.

#### **4.3.1.2. Gaiolas com plantas de goiaba**

Foram preparadas 4 gaiolas contendo em cada uma 16 mudas de goiaba, sendo que cada gaiola corresponde a um tratamento. Os tratamentos foram os mesmos descritos para as gaiolas de eucalipto.

#### **4.3.1.3. Aplicação da solução com inibidor de protease**

Em cada muda foram colocadas 3 lagartas de 5<sup>o</sup> instar (estágio em que a lagarta se alimenta mais vorazmente) totalizando 48 lagartas por gaiola.

A pulverização das mudas de acordo com os tratamentos foi realizada já com as lagartas nas folhas, como ocorreria em uma aplicação do produto no campo. De cada gaiola foram retiradas 3 mudas (totalizando 9 lagartas) em cada um dos seguintes períodos: 6, 12, 24 e 48 horas depois de realizada a pulverização. As mudas retiradas não retornaram à gaiola e tiveram suas folhas recolhidas para obtenção do extrato foliar. As lagartas retiradas tiveram os intestinos extraídos para obtenção do extrato enzimático.

Para cada horário de cada tratamento foram realizadas 3 repetições do extrato intestinal da lagarta (sendo utilizadas 3 lagartas para cada repetição) e do extrato foliar das mudas retiradas (uma muda por repetição).

#### **4.3.2. Obtenção do extrato enzimático do intestino médio da lagarta de**

##### ***Thyrinteina leucoceraea***

O intestino médio foi extraído após dissecação de larvas em presença de HCl 10<sup>-3</sup> 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, conforme metodologia utilizada no laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos – BIOAGRO/UFV. Após os ciclos, frações de 1,0 mL do extrato foram centrifugadas em tubos plásticos de 1,5 mL com tampas a 10.000 g por 30 min a 4°C.

O sobrenadante contendo o material solúvel foi retirado e mantido a -18°C para análises posteriores.

#### **4.3.2.1. Determinação da concentração de proteína do extrato**

A concentração de proteína foi obtida pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando como padrão uma solução 0,2 mg/mL de soroalbumina bovina (BSA).

#### **4.3.2.2. Atividade proteásica**

A atividade proteásica foi determinada utilizando-se azocaseína como substrato na concentração final de 2% (p/v). A atividade foi monitorada espectrofotometricamente a 440 nm utilizando-se o método descrito por Tomarelli *et. al* (1949). A reação foi realizada em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 a 37°C.

O tempo de reação foi de 30 minutos, o qual foi interrompido por adição de ácido tricloroacético 10% (v/v). Após a interrupção, as amostras foram centrifugadas para remover a proteína precipitada e os peptídeos do sobrenadante foram, então, determinados a 440 nm. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

#### **4.3.2.3. Atividade amidásica de tripsina-like**

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

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

#### **4.3.2.4. Atividade esterásica de tripsina-like**

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



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

#### **4.3.2.5. Atividade de cisteíno-proteases**

A determinação da atividade de cisteíno-proteases foi realizada na presença de inibidores, adaptando-se o método de Erlanger et al. (1961). Foram pipetados 0,59 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, 10  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático do intestino médio da lagarta e 0,1 mL do inibidor benzamidina 10 mM. Essa mistura foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado 0,5 mL do substrato L-BApNA 1,2 mM.

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

#### **4.3.2.6. Determinação de inibidores de proteases**

A presença de inibidores de proteases no extrato foliar e no extrato do intestino médio de *Thyrinteina leucoceraea* foi determinada utilizando-se tripsina bovina. A atividade tríptica, na presença de inibidores, consistiu no seguinte procedimento analítico para a análise do teste: 50  $\mu\text{L}$  do extrato; 500  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio, e 50  $\mu\text{L}$  da solução de tripsina  $4,7 \times 10^{-5} \text{ M}$  foram adicionados a um tubo de ensaio. Para o controle da enzima foram adicionados, a outro tubo de ensaio, 550  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 50  $\mu\text{L}$  da solução de tripsina  $4,7 \times 10^{-5} \text{ M}$ .

A mistura contida em ambos os tubos (teste e controle da enzima, respectivamente) foi incubada por cinco minutos, à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, 500  $\mu\text{L}$  da mistura de incubação, do teste e do respectivo controle, foram retirados e adicionados a outro tubo com 500  $\mu\text{L}$  de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 500  $\mu\text{L}$  da solução de L-BApNA 1,2 mM. A absorvância da solução foi determinada a

410 nm durante 2,5 minutos de reação. As análises foram feitas numa série de três repetições.

Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com a seguinte equação:

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

em que

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

B = diluição da amostra;

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

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

#### **4.3.3. Obtenção do extrato foliar de plantas de goiaba e eucalipto**

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

As análises da concentração de proteína total e de inibidores de proteases foram realizadas de forma semelhante à descrita para o extrato do intestino das lagartas.

#### **4.4. Análises estatísticas**

As análises de variância com medidas repetidas no tempo foram realizadas utilizando o procedimento PROC ANOVA do SAS com a especificação PROFILE (SAS Institute 1989). Os pressupostos da análise de variância foram testados usando o procedimento PROC UNIVARIATE do SAS

(SAS Institute 1989) e todos os dados tiveram que ser transformados para  $\log_{10}(X + 1)$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

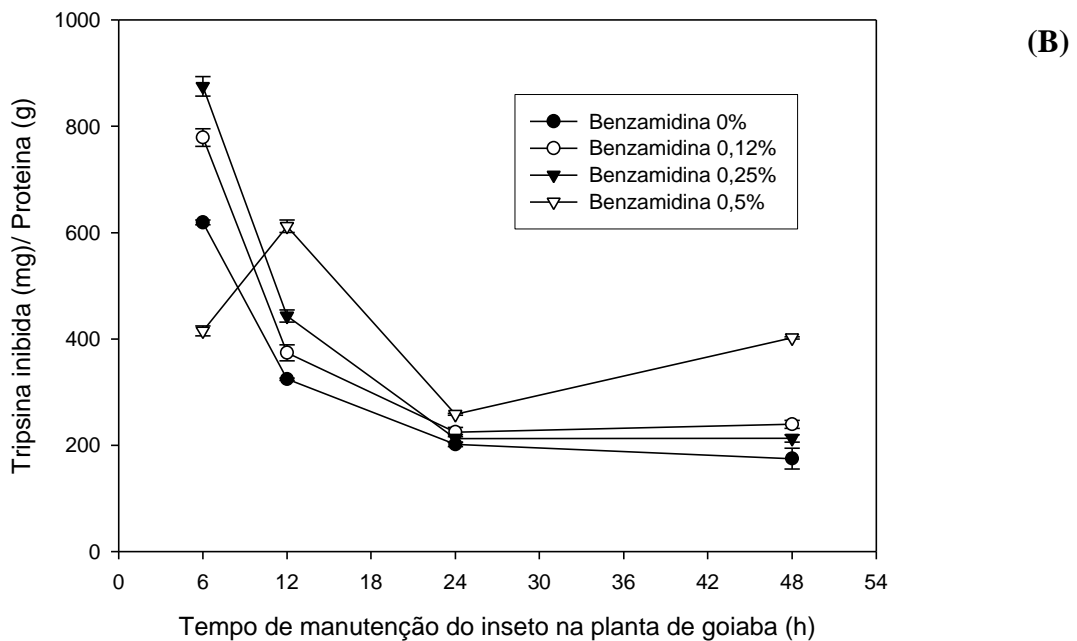
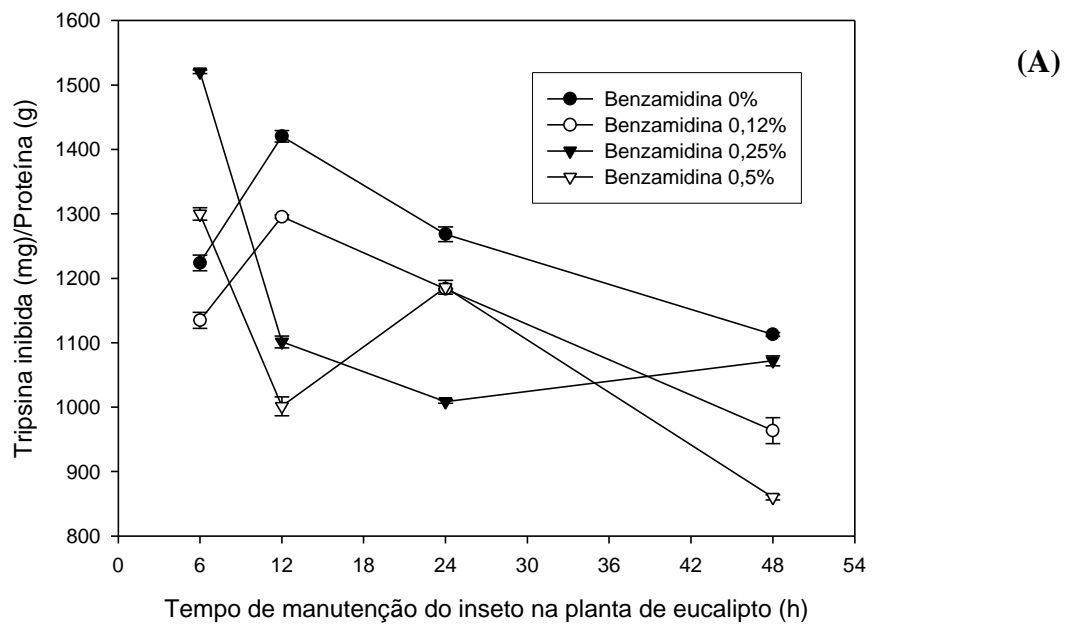
### 5.1. Análise dos extratos foliares de eucalipto e goiabeira

As concentrações de inibidores de proteases (IP) nos extratos foliares de eucalipto e goiabeira, quantificadas através da inibição de serino-proteases, podem ser verificadas na Figura 2.

Analisando os gráficos da Figura 2, observa-se que em geral as plantas apresentaram redução da concentração de IPs nas folhas de eucalipto e goiabeira com 48 horas de ataque dos insetos em relação ao primeiro tempo avaliado, de 6 horas. O contrário observou Silva *et al.* (2002) em plantas de soja, cujas folhas apresentaram aumento significativo na produção de inibidores de proteases com o decorrer do tempo em resposta ao ataque da lagarta *A. gemmatilis*. Plantas de amieiro (*Alnus glutinosa*) também responderam ao ataque de *Agelastica alni* com aumento da produção de inibidores de proteases (Tschardt *et al.*, 2001).

A produção de inibidores pelas plantas apresentou pico quando aplicada a solução com 0,5% de benzamidina tanto para as plantas de eucalipto (12 horas de ataque do inseto), quanto para as de goiaba (24 horas de ataque do inseto), mas em ambas o declínio dessas concentrações é observado a seguir.

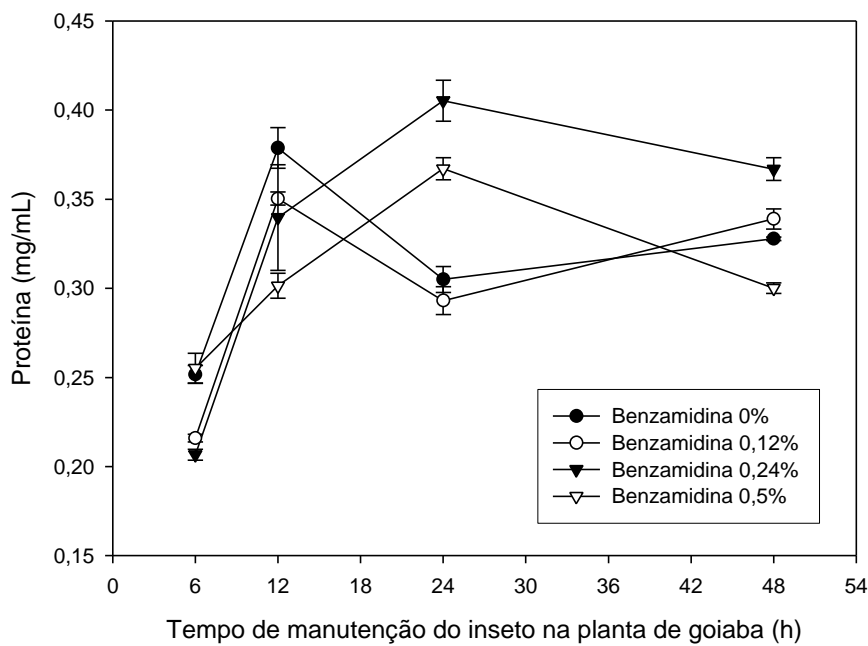
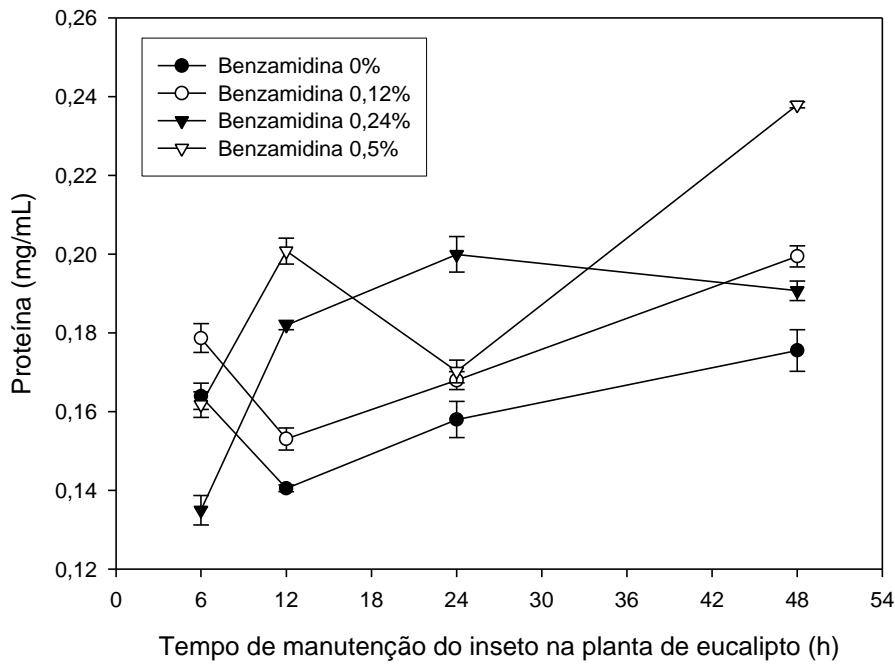
Comparando os dois gráficos da Figura 2, nota-se que as quantidades de tripsina inibida pelos extratos foliares das plantas de eucalipto são maiores do que aquelas observadas nos extratos de plantas de goiabeira. Esses dados indicam que as plantas de eucalipto produzem maior quantidade de inibidores de proteases em relação às plantas de goiaba. Entretanto, Holtz *et al.* (2003a) verificaram que lagartas de *Thyrntaina* ssp. apresentam dificuldade em se desenvolver e estabelecer populações em plantas de goiaba, mas se desenvolvem bem e mantêm suas populações em plantas de eucalipto. Sendo assim, por que as plantas de eucalipto, mesmo produzindo mais inibidores de proteases, são atacadas com mais voracidade pelas lagartas de *Thyrntaina* ssp. do que as plantas de goiaba?



**Figura 2** – Inibição de serino-proteases presentes no extrato foliar de plantas de eucalypto (A) e plantas de goiaba (B), quando atacadas por *Thyrintea leucoceraea* e submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias 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\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,000089; F = 171,63;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ;  $P < 0,0001$ ).

Para entender o sucesso ou o fracasso da interferência dos IPs no desenvolvimento de insetos herbívoros através de dieta artificial ou diretamente em plantas, muitos fatores devem ser considerados como: a concentração do IP, o  $K_i$  para a interação com as proteases, a estabilidade do IP no intestino do inseto, a presença de outros inibidores que possam inibir outras classes de proteases do intestino e da habilidade do inseto para se adaptar à inibição (Jongsma & Bolter, 1997). Também inúmeros fitoquímicos presentes ou induzidos nas plantas podem afetar a toxicidade dos IP nos insetos (Broadway & Duffey, 1988; Felton *et al.*, 1989; Jongsma & Bolter, 1997). Além disso, fatores alimentares também desempenham um papel importante na severidade dos sintomas. Os inibidores de proteases agem causando uma deficiência de aminoácidos por impedirem a hidrólise proteica pelas enzimas proteolíticas, portanto, a concentração de proteína alimentar (Broadway, 1997) e a sua qualidade proteica (Broadway & Duffey, 1986, 1988; Markwick *et al.*, 1995; Mollema & Cole, 1995) determinarão se as deficiências serão efetivas. Por isso, fez-se necessário investigar a concentração proteica no extrato foliar de ambas as plantas.

A concentração de proteínas dos extratos foliares foi quantificada e pode ser observada na Figura 3. Por essa análise, podemos observar que as plantas de eucalipto apresentaram menor concentração de proteínas no extrato foliar do que as plantas de goiaba. Entretanto, mais importante do que a quantidade de proteína da dieta, é a qualidade dessa proteína ingerida pelos insetos. O valor nutricional de uma proteína está relacionado com sua composição de aminoácidos e sua digestibilidade. Segundo Broadway & Duffey (1988), a qualidade da proteína na dieta alterou a toxicidade do inibidor de tripsina-like da soja para a lagarta *Spodoptera exigua* (quanto maior o valor nutricional, menor a toxicidade do IP), sendo que o aspecto que mais afeta é o perfil aminoacídico, principalmente de lisina e arginina. Assim, possivelmente as plantas de eucalipto possuam proteínas com melhor valor nutricional do que as plantas de goiaba, o que estaria prejudicando a toxicidade dos seus inibidores de proteases.



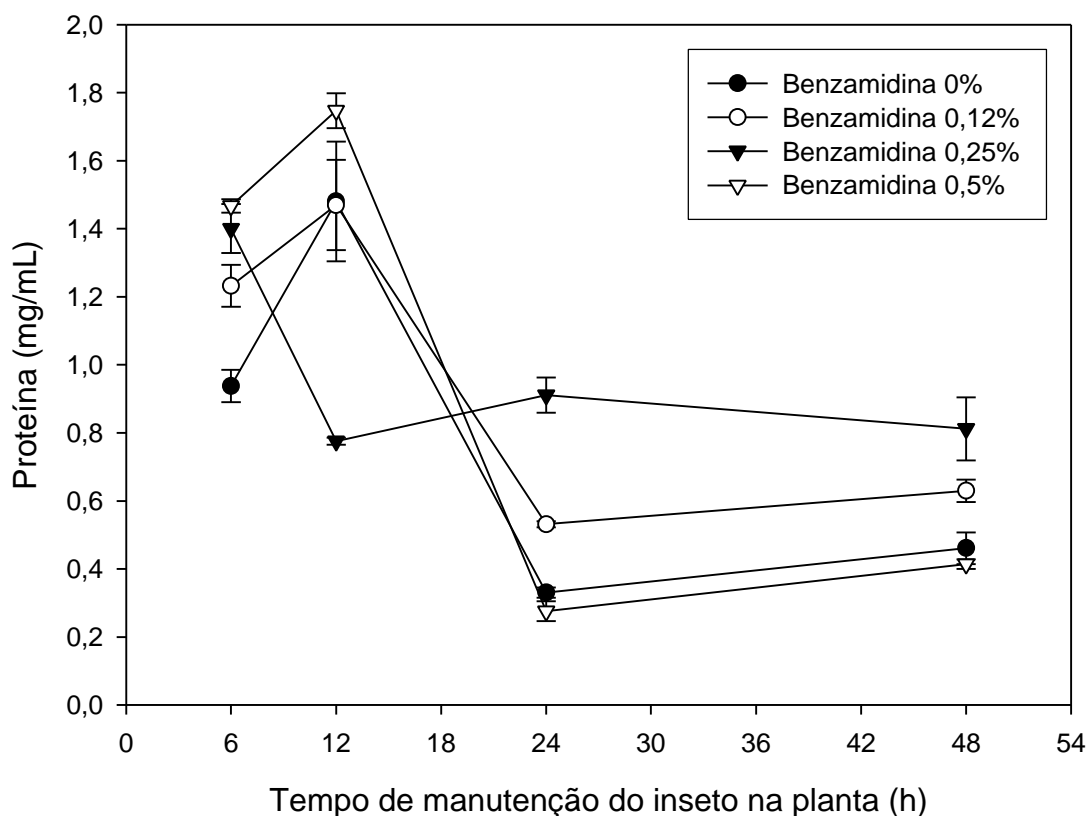
**Figura 3** – Concentração de proteína em folhas de plantas de eucalipto (A) e plantas de goiaba (B), quando atacadas por *Thyrinteina leucoceraea* e submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias de 3 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,012219; F =19,43;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ;  $P < 0,0001$ ).

Entretanto, outro fator importante que pode afetar a severidade do IP é a habilidade de o inseto suplantar a inibição das proteases (Jongsma & Bolter, 1997). Portanto, faz-se necessário analisar as respostas bioquímicas da *Thyrinteina leucoceraea* aos inibidores de proteases.

## **5.2. Análise do intestino médio de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* provenientes de plantas de goiaba**

Os resultados obtidos da concentração de proteínas do intestino médio de *Thyrinteina leucoceraea* estão apresentados na Figura 4. Observa-se que, em geral, para todos os tempos de manutenção do inseto na planta, a concentração de proteína foi baixa nos intestinos dos insetos que não ingeriram benzamidina. Isto sugere que, como descrito na literatura, é possível que em presença de inibidor de proteases ocorra aumento da síntese de mais moléculas de proteases para fazer a digestão do inseto, fato este que compromete a fisiologia do inseto porque os aminoácidos biodisponíveis passam a ser utilizados para a biossíntese de proteases em vez de serem usados para a biossíntese de proteínas necessárias ao crescimento e desenvolvimento do inseto (Shulke & Murdock, 1983, Broadway, 1995, 1997; Jongsma *et al.*, 1995; Broadway, 1996; Brown *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997).





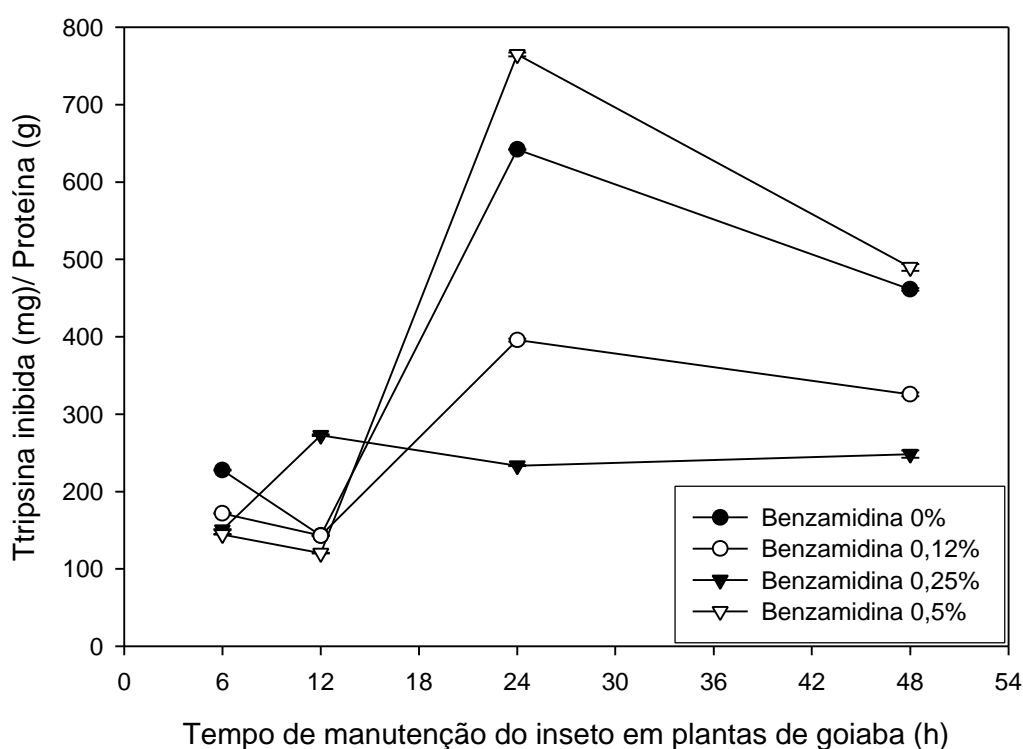
**Figura 4** – Concentração de proteína do intestino médio de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* alimentadas com folhas de goiaba submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias de 3 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,00; F = infity;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ;  $P < 0,0001$ ).

Analisando a Figura 4, podemos observar uma variação na concentração de proteína total no intestino da lagarta alimentada com folhas de goiaba. Há um aumento da concentração de proteína entre 6 e 12 horas após o início do experimento. A partir desse tempo, há uma redução na concentração de proteína em todos os tratamentos em relação à primeira análise realizada no tempo de 6 horas após a pulverização da solução nas folhas.

Observa-se ainda queda na concentração de proteína do intestino do inseto 24 horas após a pulverização das plantas. Essa queda pode comprometer o fornecimento de aminoácidos para a produção de proteínas do inseto, o que poderia afetar na sua fisiologia.

Essa variação na concentração de proteína é observada em organismos vivos possivelmente devida à utilização dos aminoácidos livres para biossíntese proteica do inseto. Deve ser considerado, também, que o ambiente do inseto foi alterado; as lagartas, que antes viviam em potes, alimentadas com folhas, passaram a viver diretamente na planta e tiveram que se adaptar a essa nova situação e dieta.

Foi também analisada a inibição de serino-proteases para verificar o nível de inibição das proteases no intestino do inseto (Figura 5).



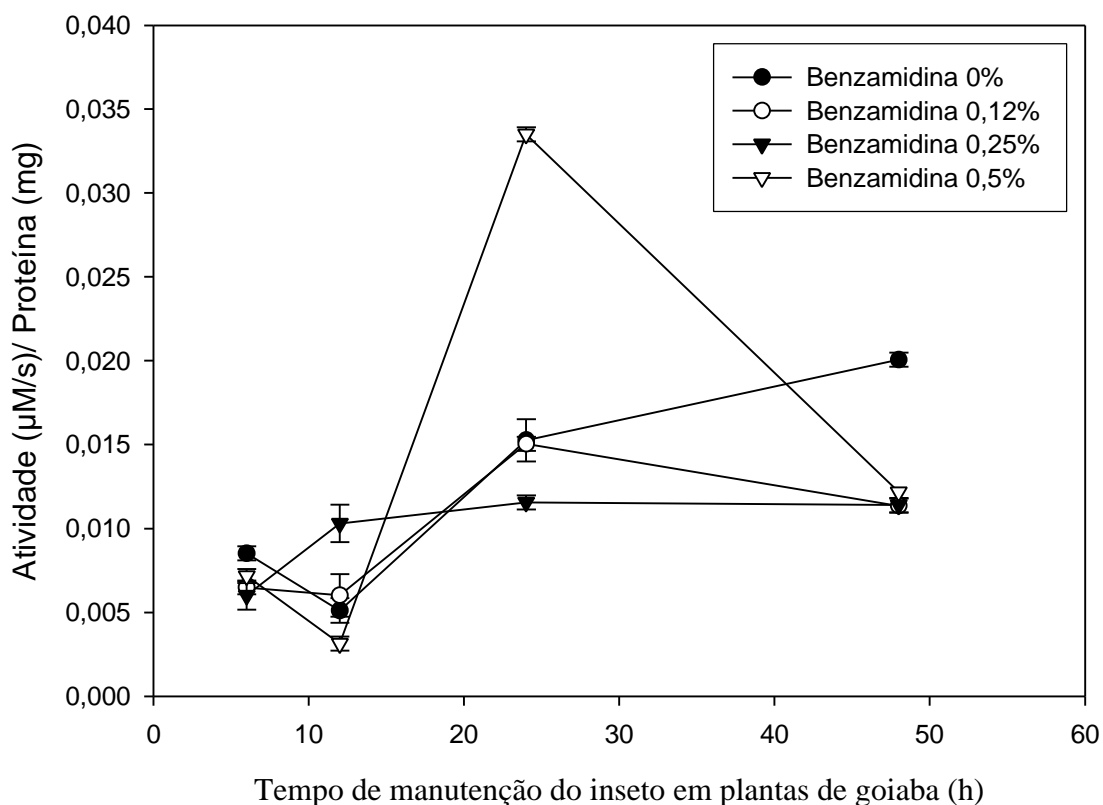
**Figura 5** – Inibição de serino-proteases presentes no intestino médio de lagartas de *Thyrntea leucoceraea* alimentadas com folhas de goiaba submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias de 3 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,00000057; F = 1397,41;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ;  $P < 0,0001$ ).

A concentração de inibidores de proteases, em geral, foi semelhante para os tratamentos nas 12 primeiras horas em que a lagarta permaneceu se alimentando das plantas de goiaba com as respectivas soluções.

O nível de inibição de proteases tripsina-*like* também apresentou um pico após 24 horas de o inseto estar se alimentando das folhas com as soluções, exceto nas lagartas que receberam a solução com 0,25% de benzamidina. Observando-se o perfil da concentração de 0,25% de benzamidina, nota-se que, apesar de não apresentar pico de inibição como os demais, foi o que se manteve mais constante, sem declínio após as 24 horas.

Nota-se que o maior pico de inibição no intestino é relativo aos insetos que ingeriram as folhas com a solução na concentração de 0,5% de benzamidina, no tempo de 24 horas, sugerindo uma maior concentração de inibidores de proteases nessa dieta. Entretanto, a segunda maior inibição apresentada é relativa à solução controle, sem benzamidina, fato este sugestivo de que as plantas de goiaba produzem inibidores de proteases quando atacadas por insetos. Segundo Rakwal *et. al* (2001), as plantas aumentam sua síntese de inibidores de proteases em presença de insetos como mecanismo de defesa contra o ataque desses. Silva *et. al* (2002) também verificaram que plantas de soja ativam a expressão de genes que codificam inibidores de proteases como um mecanismo de defesa em resposta ao ataque da lagarta de *Anticarsia gemmatalis*.

As enzimas tripsina-*like* possuem atividade amidásica sobre substratos que possuem ligações amida, semelhantes à ligação peptídica. Assim, a Figura 6 apresenta a hidrólise do substrato amida L-BApNA pelas enzimas tripsina-*like*, as quais são as principais proteases presentes em intestinos de Lepidoptera (Applebaum, 1985; Murdock *et al.*, 1987; Purcell *et al.*, 1992; Terra & Ferreira, 1994).



**Figura 6** – Atividade específica de hidrólise do substrato L-BApNA pelas enzimas tripsina-*like* no intestino médio de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* alimentadas com folhas de goiaba, submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias 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\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,004155; F = 32,38;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ;  $P < 0,0001$ ).

Inicialmente ocorreu um declínio da atividade entre 6 e 12 horas, o que pode ser devido à alteração do ambiente e da dieta do inseto, que passou de sua criação em potes, com folhas, para se alimentar diretamente na planta. A atividade de tripsina-*like* foi semelhante para todos os tratamentos até 12 horas de permanência do inseto na planta.

Observa-se um aumento da atividade 24 horas após iniciado o experimento, com um pico pronunciado nas lagartas que ingeriram a solução com 0,5% de benzamidina. Pilon *et al.* (2006) também observaram pico de atividade de tripsina-*like* sobre o substrato L-BApNA no intestino de A.

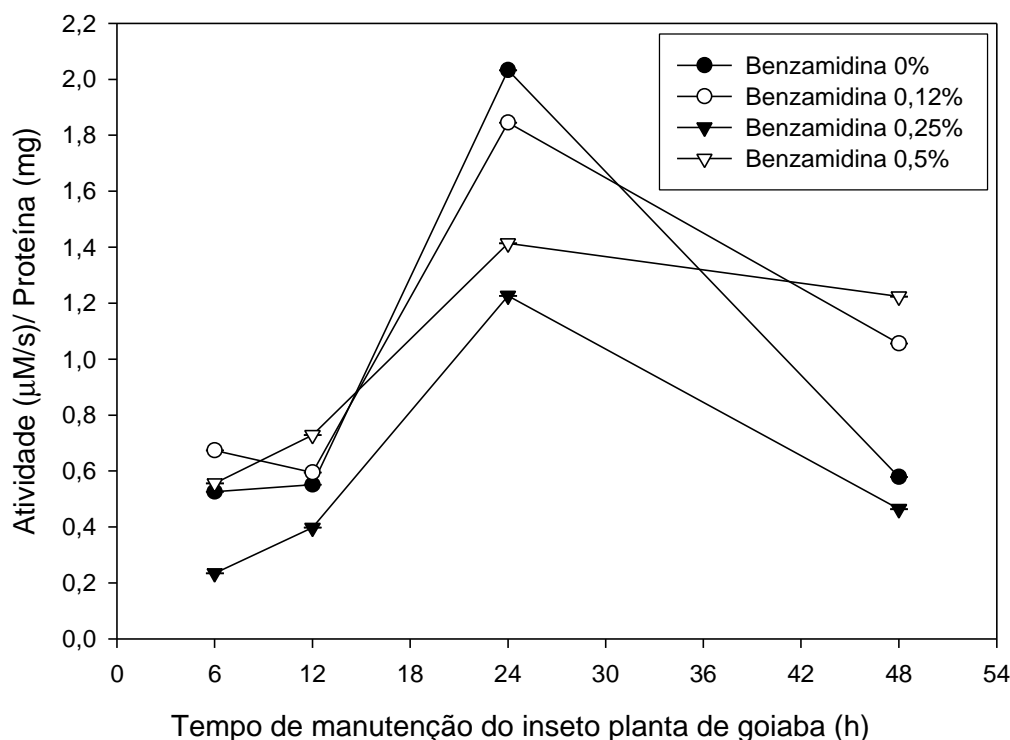
*gemmatalis* alimentadas com 0,5% de benzamidina em dieta. A alta concentração de inibidores pode fazer com que o inseto passe a sintetizar mais proteases do tipo tripsina-*like* e de outras proteases para degradação das proteínas. As enzimas tripsina-*like* podem, ainda, estar agindo com maior atividade devido ao fenômeno de ativação enzimática, acessando o sítio secundário das enzimas da família da tripsina (Oliveira *et. al.*, 1993).

O inibidor aqui utilizado é a benzamidina, uma amidina aromática, inibidor sintético da tripsina apresentando Ki 1,0 mM (Mares-Guia *et al.*, 1981). A molécula de benzamidina frente à tripsina-*like* se posiciona no sítio de especificidade, sítio S<sub>1</sub>, da tripsina (Mares-Guia *et al.*, 1981; Oliveira *et al.*, 1993), agindo de forma competitiva com o substrato.

O fato de a benzamidina ser um inibidor competitivo pode explicar o pico de atividade sobre o L-BApNA, pois a ocorrência desse pico pode ser devida ao aumento na concentração de proteínas, substrato das proteases, no intestino do inseto relativo ao tempo de 12 horas após o início do experimento (Figura 4). Proteína é substrato de tripsina e o aumento de sua concentração pode reverter o efeito da benzamidina, um inibidor competitivo. Para o experimento, foram utilizadas lagartas de quarto e quinto ínstares larvais, período no qual o inseto apresenta alta atividade de enzimas proteolíticas no seu intestino médio (Xavier, 2005). Também é nesse período que ocorre a maior absorção proteica para atingir o seu máximo desenvolvimento larval e desencadear a metamorfose e posterior transformação em adultos viáveis (Pilon, 2004). Segundo Zanuncio *et al.* (1993), nos quatro primeiros estádios as lagartas de *Thyrntaina* ssp. consomem em média 12,09 cm<sup>2</sup> de área foliar, enquanto que nos dois últimos este consumo se eleva para 108,49 cm<sup>2</sup>. Dessa forma, é nesse período que ocorre também o maior consumo foliar pelas lagartas e, por consequência, maior ingestão de proteínas, que poderiam estar desencadeando a reversão da inibição.

Um maior consumo alimentar também pode ocorrer em decorrência da ingestão de inibidores de proteases. Pilon *et. al* (2006) verificaram aumento no consumo alimentar de *Anticarsia gemmatalis* quando ingeriu benzamidina em dieta artificial, sugerindo que esses insetos tiveram a necessidade de aumentar o seu consumo na tentativa de suprir a menor atividade proteolítica devido à alta concentração de benzamidina no trato intestinal da lagarta.

As enzimas tripsina-*like* também possuem atividade esterásica sobre ligações éster de substratos sintéticos, como é o caso do L-TAME, devido ao fato de essa ligação mimetizar a ligação amida das ligações peptídicas das proteínas. Assim, a Figura 7 apresenta o perfil da atividade tripsina-*like* sobre o substrato éster L-TAME.



**Figura 7** – Atividade específica da hidrólise do substrato L-TAME pelas enzimas tripsina-*like* no intestino médio de lagartas de *Thyrntaina leucoceraea* alimentadas com folhas de goiaba, submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias 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\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,040132; F = 10,45;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ;  $P < 0,0001$ ).

Os valores de atividade tenderam a permanecer baixos até 12 horas após iniciado o experimento, provavelmente devido à mudança do ambiente do inseto. Logo após, ocorreu um pico de maior atividade no tempo de 24 horas de alimentação das lagartas com as plantas pulverizadas em todas as concentrações de benzamidina utilizadas, tal como ocorreu com o substrato L-

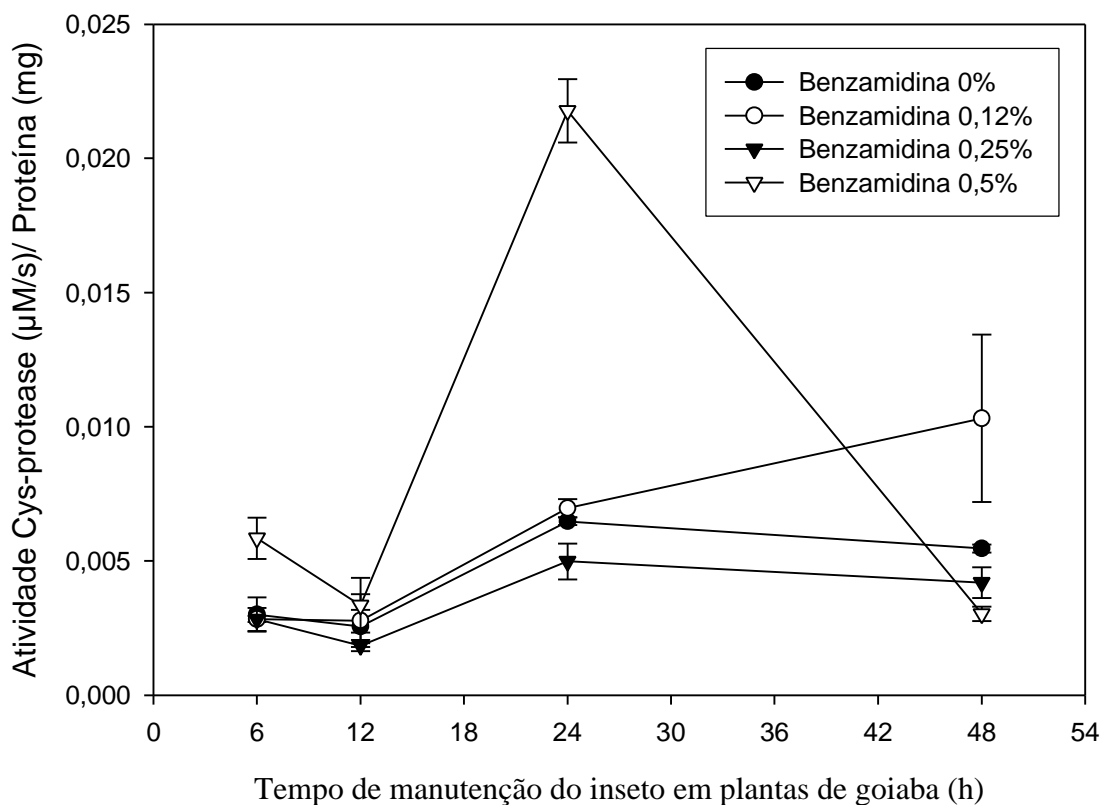
BApNA (Figura 6), sendo que o menor pico de atividade é relativo à solução contendo 0,25% de benzamidina. Esse pico de atividade pode estar relacionado ao fato de os insetos produzirem maior concentração de enzimas proteolíticas para compensar as moléculas de proteases inibidas (Shulke & Murdock, 1983; Broadway, 1995). Com isso, os insetos passam a utilizar os aminoácidos biodisponíveis para a síntese de mais proteases em detrimento da síntese de outras proteínas necessárias ao seu crescimento e desenvolvimento (Broadway, 1995). O aumento da atividade tripsina-*like* pode ainda estar relacionado com o fenômeno de ativação enzimática que as enzimas tripsina-*like* possuem a capacidade de apresentar (Oliveira et. al, 1993), como já discutido anteriormente.

Em todos os tratamentos, o perfil da atividade do controle acompanhou os perfis das atividades nas lagartas que se alimentaram das plantas pulverizadas com o inibidor. Assim, pode estar ocorrendo reversão da inibição de benzamidina por um aumento da concentração de proteína no intestino do inseto, conforme discutido anteriormente.

Comparando as figuras 6 e 7, observa-se que as enzimas tripsina-*like* apresentam maior afinidade pelo substrato L-TAME (esterásico) do que pelo L-BApNA (amidásico). Xavier *et al.* (2005) também observaram que proteases tripsina-*like* de *A. gemmatalis* apresentaram maior resposta a L-TAME do que ao L-BApNA. Resultado semelhante também foi observado para tripsina bovina (Nakata & Ishii, 1972; Magalhães-Rocha *et al.*, 1980). A maior eficiência da ligação enzima-substrato em relação ao L-TAME (substrato éster), pode estar relacionada ao mecanismo da reação catalisada por serino-proteases. Estas, durante a atividade amidásica, apresentam a etapa de acilação, com formação de acil-enzima, lenta, e a etapa de deacilação, com formação de produto, rápida. Por outro lado, durante a atividade esterásica, a etapa de acilação é rápida e a de deacilação é lenta. Portanto, a etapa determinante da velocidade da reação da hidrólise de substratos amidas por enzimas tripsina-*like* é a etapa de acilação com formação acil-enzima, enquanto que a etapa determinante da velocidade de hidrólise de substratos ésteres é a deacilação, com consequente formação de produto (Inagami, 1971; Fastrez & Fersht, 1973).

Os insetos podem superar os efeitos dos inibidores de proteases através da produção de outras classes de proteases (Jogsma *et al.*, 1995; Broadway,

1995; Bolter & Jogsma, 1995). Outra classe importante de proteases em lagartas são as cisteíno-proteases. Assim, a Figura 8 apresenta o perfil da atividade de cisteíno-proteases do intestino médio de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* para os tratamentos aplicados.



**Figura 8** - Atividade específica de cisteíno-proteases no intestino de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* alimentadas com folhas de goiaba submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias 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\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,065491; F = 7,85;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ;  $P < 0,0001$ ).

Os valores de atividade foram semelhantes até 12 horas após a pulverização das soluções nas plantas, para todos os tratamentos, havendo ligeira queda nesse período, fato este também observado para as atividades de tripsina-like (Figuras 6 e 7). Para as lagartas que receberam a solução de 0,12% de benzamidina, a atividade de cisteíno protease se apresentou crescente até 48 horas de permanência do inseto nas plantas. Os perfis de



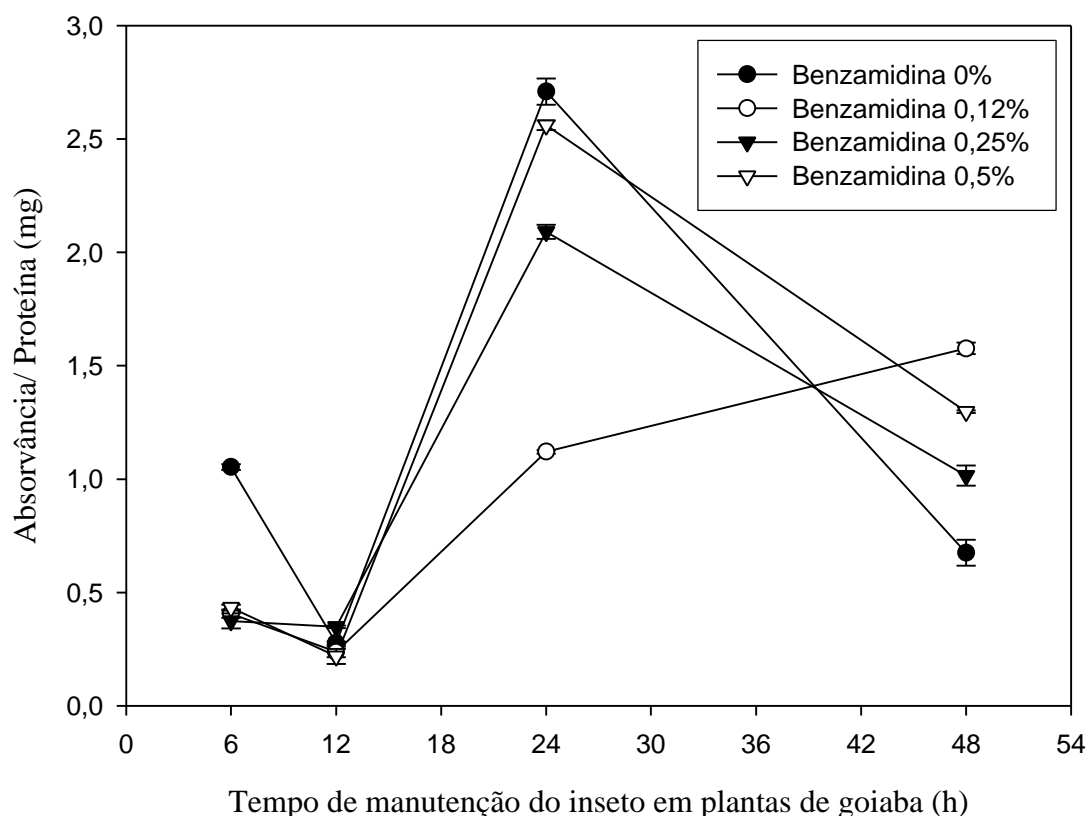
atividade das lagartas que não se alimentaram com a benzamidina e daquelas que se alimentaram com concentração de 0,25% de benzamidina não apresentaram variações para atividade de cisteíno proteases.

Com exceção do pico no tempo de 24 horas relativo às lagartas que receberam a solução na concentração de 0,5% de benzamidina, o aumento da atividade de cisteíno-proteases foi pouco pronunciado. O pico de atividade observado 24 horas após iniciado o experimento relativo às lagartas que ingeriram 0,5% de benzamidina pode ser devido à ingestão crônica dos IPs, que podem ter estimulado a produção de cisteíno-proteases como forma de adaptação do inseto (Jogsma *et al.*, 1995; Broadway, 1995; Bolter & Jogsma, 1995). Entretanto, mesmo essa maior atividade é baixa em relação às atividades apresentadas pelas serino-proteases.

Os dados mostram que ocorre atividade de cisteíno-proteases no intestino de *T. leucoceraea*, mas indicam que esta não deve ser a classe de proteases mais afetada pela presença de benzamidina. Esse fato já era esperado uma vez que a benzamidina é um clássico inibidor competitivo de serino proteases. Em estudos com tripsina-like de *Locusta migratoria* (Lam *et al.*, 2000), *Rhyzopertha dominica* (Zhu & Backer, 1999), *Sesamia nonagroides* (Novillo *et al.*, 1999), *A. gemmatalis* (Xavier *et al.*, 2005) e *Ostrinia nubilalis* (Bernadi *et al.*, 1996) foi verificada forte inibição de serino proteases nessas espécies quando utilizado o inibidor benzamidina e o substrato L-BAPNA. Oliveira *et al.* (2005) também verificaram diminuição da atividade de tripsina-like no extrato do intestino médio de *A. gemmatalis* quando feita a inibição *in vitro* com benzamidina.

O aumento do nível de inibidores de serino proteases no tempo de 24 horas (Figura 5), acarretou aumento pronunciado da atividade de tripsina-like sobre o L-TAME, o que sugere que mais proteases dessa família estejam sendo produzidas e estas, provavelmente, sejam mais importantes na digestão proteica de *T. leucoceraea* do que as cisteíno-proteases. Esses dados estão de acordo com o citado na literatura segundo a qual Lepidoptera possui as serino proteases como principais enzimas proteolíticas no intestino médio (Applebaum, 1985; Murdock *et al.*, 1987; Purcell *et al.*, 1992; Terra e Ferreira, 1994).

Os resultados da atividade proteolítica dos intestinos das lagartas estão apresentados na Figura 9. Tal como ocorreu com a atividade sobre o L-BApNA (Figura 6) e o L-TAME (Figura 7), observam-se menores valores de atividade no período de 6 a 12 horas após iniciado o experimento.



**Figura 9** – Perfil da atividade proteásica no intestino médio de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* alimentadas com folhas de goiaba submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias 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\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,081418; F= 6,85;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ;  $P < 0,0001$ ).

Todos os perfis apresentaram pico de atividade de protease total 24 horas após a aplicação das soluções. A menor atividade de proteases no intestino médio de lagartas provenientes da goiaba no tempo de 24 horas é relativa àquelas que ingeriram a menor concentração de benzamidina (0,12%). Broadway (1995), estudando intestinos médios de lagartas de *Trichoplusia ni* e

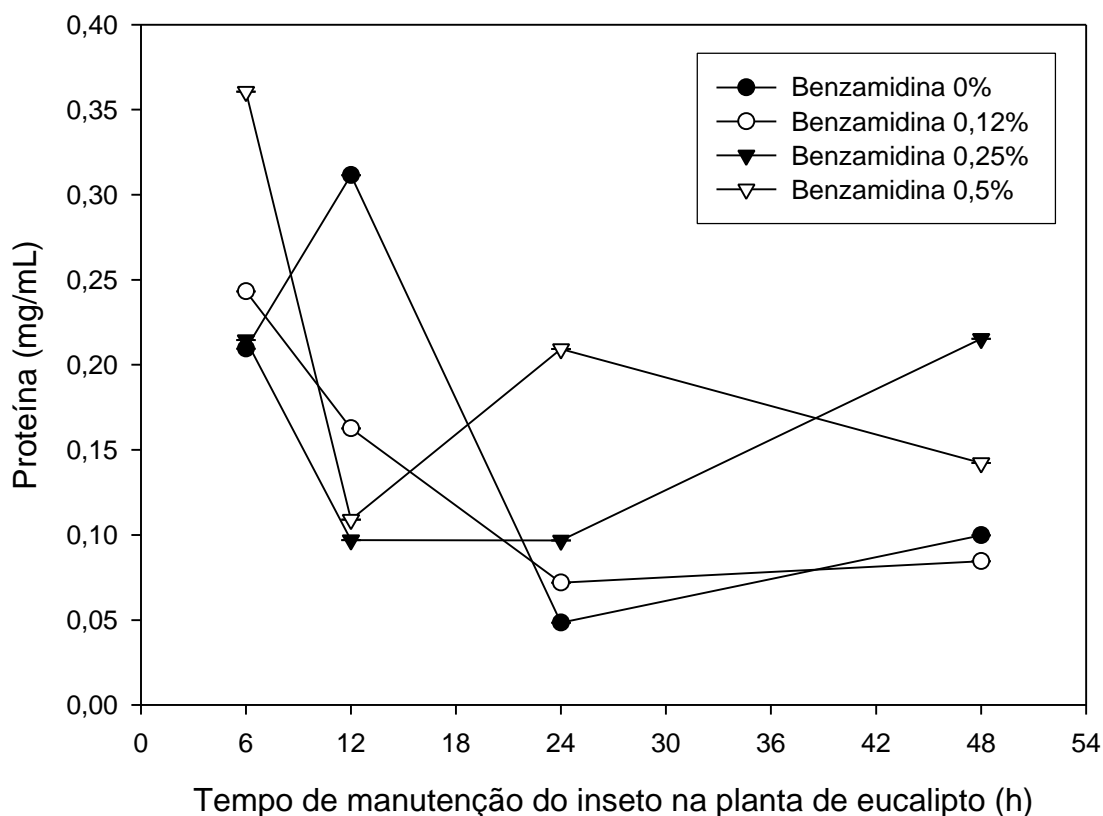
*Helicoverpa zea*, verificou que os insetos que consumiram inibidores de proteases continham enzimas tripsina-*like* menos suscetíveis à inibição *in vitro* do que as enzimas tripsina-*like* no intestino de lagartas que não consumiram inibidores de proteases. A avaliação individual do intestino médio de lagartas indicou que a inibição *in vitro* da atividade de tripsina-*like* foi inversamente proporcional ao nível de inibidores de protease consumidos na folha pelas lagartas, sugerindo que os inibidores de proteases induziram a produção de enzimas resistentes a eles.

Como observado nas Figuras 6, 7 e 8, os baixos valores de atividade de proteases se repetem na Figura 9 até 12 horas de permanência das lagartas nas plantas pulverizadas, com pico de atividade no tempo de 24 horas, seguido de um declínio, com exceção do tratamento com 0,12% de benzamidina.

A concentração de proteína total aumentou em todos os tratamentos até 12 horas de permanência do inseto nas plantas pulverizadas com as soluções, tendo em seguida um declínio (Figura 4). No entanto, a atividade de proteases teve uma ligeira queda nesse mesmo período de 12 horas, como pode ser observado nas Figuras 6, 8 e 9. Após essa queda na atividade de proteases, ocorre novamente um aumento no tempo de 24 horas (Figuras 6, 7, 8 e 9), sugerindo a biossíntese de novas proteases, reversão da inibição pela alta concentração de proteínas ou ativação enzimática no tempo de 12 horas (Figura 4). Assim, a reserva de aminoácidos pode estar sendo deslocada para a biossíntese de serino e cisteino-proteases, o que poderia debilitar o inseto por não estar disponibilizando aminoácidos para as demais proteínas de que necessita para o seu crescimento e desenvolvimento, causando um efeito negativo para a sua fisiologia.

### **5.3. Análise do intestino médio de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* provenientes de plantas de eucalipto**

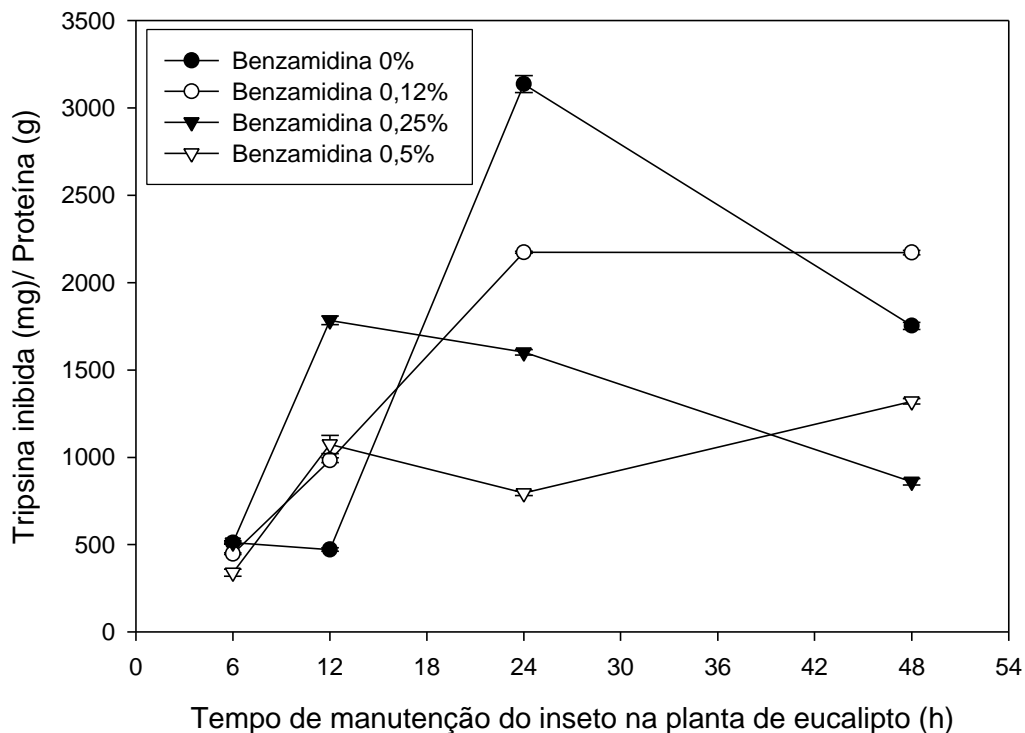
Os resultados obtidos da concentração de proteínas do intestino médio de *Thyrinteina leucoceraea* estão apresentados na Figura 10.



**Figura 10** – Concentração de proteína do intestino médio de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* alimentadas com folhas de eucalipto submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias 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\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,00; F= infity;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ;  $P < 0,0001$ ).

Comparando esses dados com os da Figura 4, observamos que a concentração de proteína do intestino médio de *Thyrinteina leucoceraea* que se alimentaram de plantas de eucalipto foi maior em relação à das lagartas das plantas de goiaba. Observa-se também que em ambos há um declínio na concentração de proteínas no intestino da lagarta após 48 horas se alimentando das plantas, com exceção daquelas que ingeriram a solução com 0,25% de benzamidina.

Essas variações encontradas na Figura 10 podem ser observadas também na Figura 4, para lagartas de goiaba, e pode ser consequência da utilização de aminoácidos livres para a biossíntese proteica do inseto ou da mudança de ambiente e dieta sofridos pelo inseto.



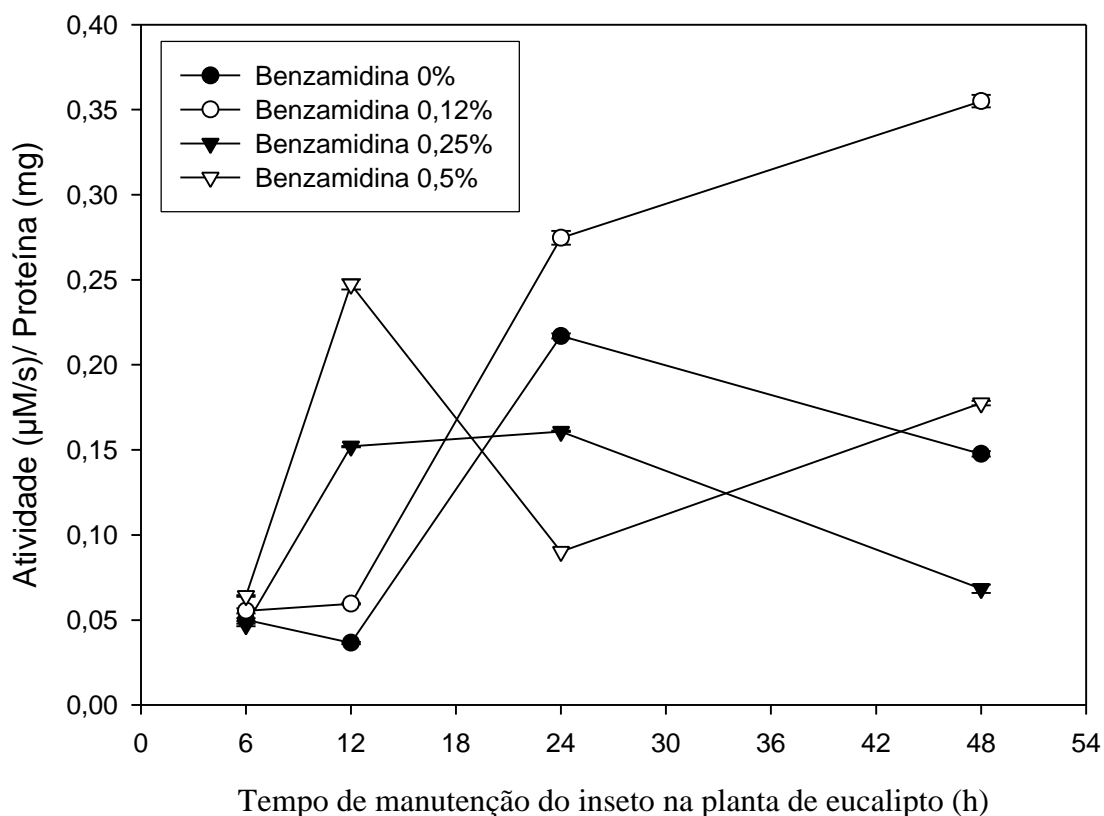
**Figura 11** – Inibição de serino-proteases presentes no intestino médio de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* alimentadas com folhas de eucalipto submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias de 3 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda = 0,00000057; F= 1397.41;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ;  $P < 0,0001$ ).

A Figura 11 apresenta a quantidade de inibidores de serino proteases através da inibição *in vitro* das tripsina-like no intestino da lagarta do eucalipto. Observando a Figura 11, nota-se que, ao contrário do que aconteceu com as lagartas em goiabeira (Figura 5), houve um aumento da quantidade de inibidores de serino proteases para todos os tratamentos se comparados os tempos de 48 horas (última análise) com o de 6 horas (primeira análise). Observa-se também que a concentração de inibidores de serino proteases presentes no intestino médio de *Thyrinteina leucoceraea* em plantas de eucalipto foi maior do que a apresentada pelas lagartas nas folhas de goiaba (Figura 5).

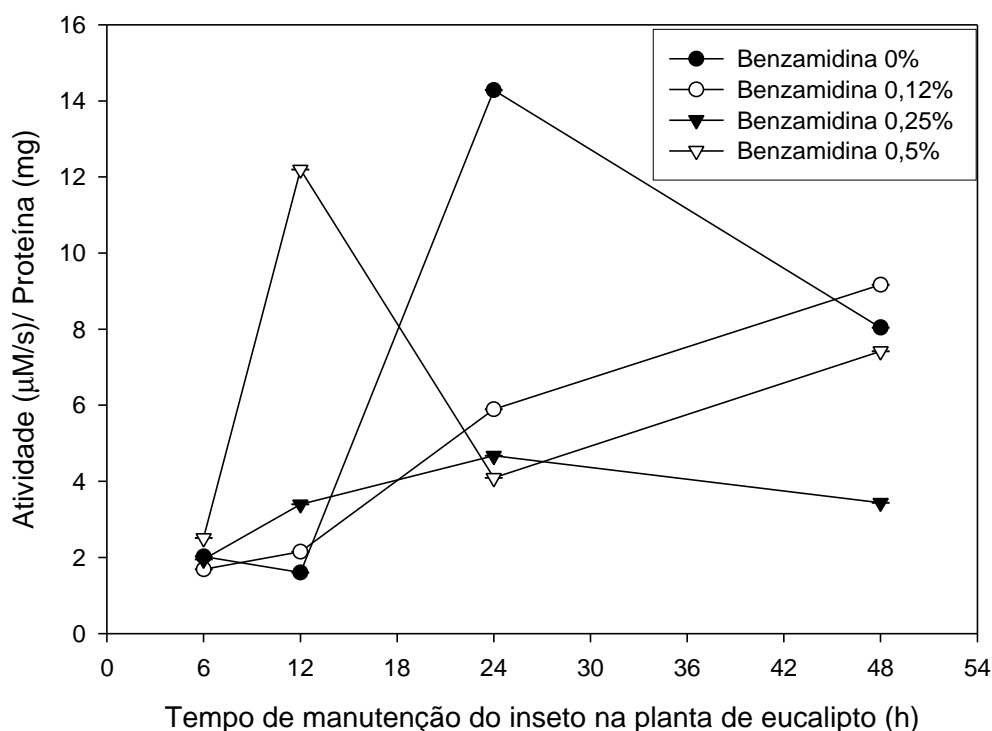
O maior pico de inibidores de protease é relativo às lagartas que não se alimentaram de benzamidina, o que pode estar relacionado à produção de inibidores proteicos da própria planta, provavelmente como defesa ao ataque da lagarta.

Assim como para as lagartas que se alimentaram de folhas de goiaba (Figura 5), o menor pico de IP é relativo à concentração de 0,25%. Entretanto, foi também nessa concentração que ocorreram, nos intestinos dos insetos, as menores atividades de tripsina-*like* com o substrato L-BApNA e L-TAME (Figuras 12 e 13), indicando inibição das serino proteases.

A Figura 12 apresenta a hidrólise do substrato L-BApNA pelas enzimas tripsina-*like*. Observa-se um pico de atividade, no tempo de 12 horas após iniciado o experimento, para as lagartas que ingeriram a solução com 0,5% de benzamidina, seguido de um declínio brusco até o tempo de 24 horas. Outro pico de atividade é apresentado no tempo de 24 horas para as lagartas que não ingeriram o inibidor. As lagartas que se alimentaram das folhas com a solução de 0,12% de benzamidina apresentaram perfil de atividade crescente de 12 a 48 horas após iniciado o experimento.



**Figura 12** – Atividade específica da hidrólise do substrato L-BAPNA pelas enzimas tripsina-like no intestino médio de lagartas de *Thyrntaina leucoceraea* alimentadas com folhas de eucalipto submetidas à aplicação de Benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias 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\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda= 0,004155; F= 32,38;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ;  $P < 0,0001$ ).



**Figura 13** – Atividade específica da hidrólise do substrato L-TAME pelas enzimas tripsina-like no intestino médio de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* alimentadas com folhas de eucalipto submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias 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\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda= 0,040132; F = 10,45;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ;  $P < 0,0001$ ).

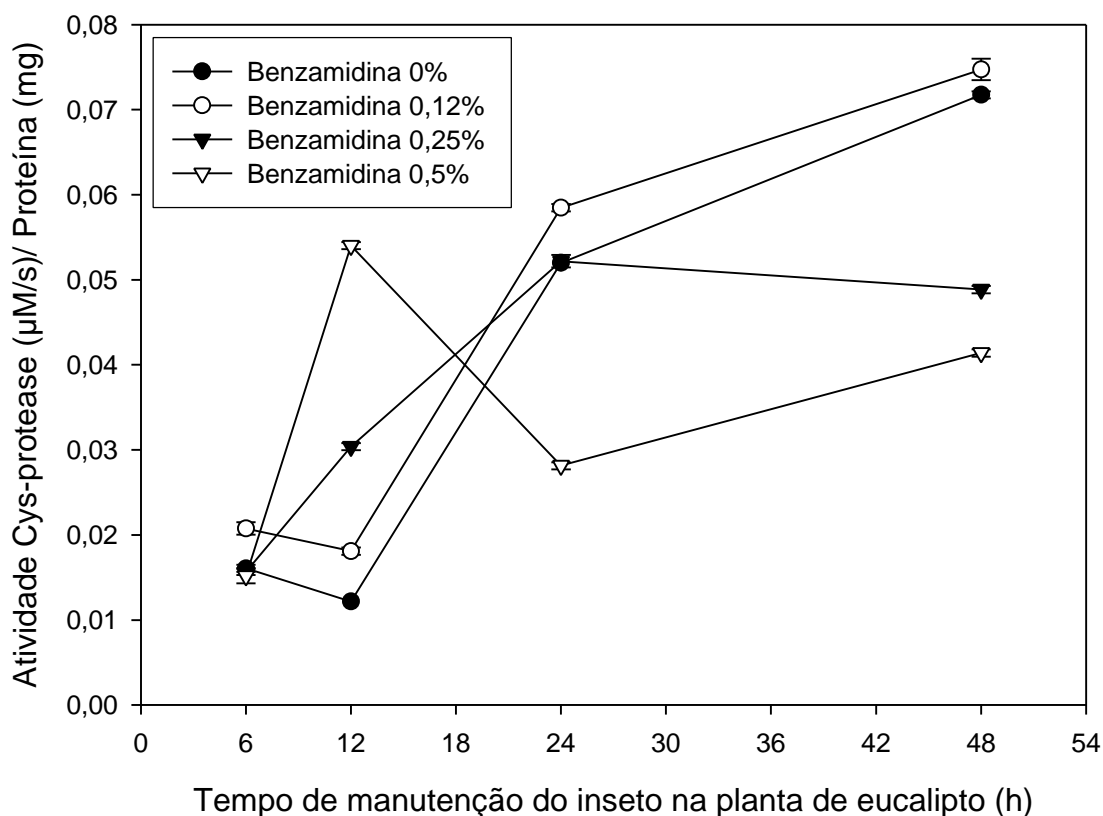
A Figura 13 apresenta o perfil da atividade tripsina-like sobre o substrato éster L-TAME. Observa-se um pico pronunciado de atividade de tripsina-like com os dois substratos testados (Figuras 12 e 13) no intestino das lagartas que ingeriram a solução na concentração de 0,5% de benzamidina, 12 horas após o início do experimento. Esses picos também ocorreram para as lagartas de goiaba (Figuras 6 e 7), mas apenas 24 horas após o início do experimento.

A atividade de tripsina-like com o substrato L-TAME (Figura 13) para as lagartas que não ingeriram benzamidina apresentou picos nos tempos em que também foram observados picos da concentração de inibidores de proteases no intestino da lagarta (Figura 10). A atividade de tripsina-like aumentou 24 horas depois de iniciado o experimento, mesmo tempo em que apresentou também alta concentração de inibidor de protease no intestino (Figura 10). Esses dados



sugerem uma ativação enzimática das tripsina-*like* como resposta do inseto à ingestão dos inibidores.

O perfil da atividade de cisteíno-proteases do intestino médio das lagartas que se alimentaram das folhas de eucalipto estão representadas na Figura 14. Observando esta figura, nota-se que a atividade de cisteíno-proteases aumentou para todos os tratamentos, mas a atividade, ainda assim, foi muito inferior à apresentada pelas tripsina-*like* (Figuras 12 e 13). O mesmo foi observado para lagartas que se alimentaram de plantas de goiaba (Figura 8), quando a atividade de cisteíno-proteases foi menor do que a de tripsina-*like*. Esses resultados sugerem que as serino proteases são as principais responsáveis pela digestão proteolítica desse inseto.

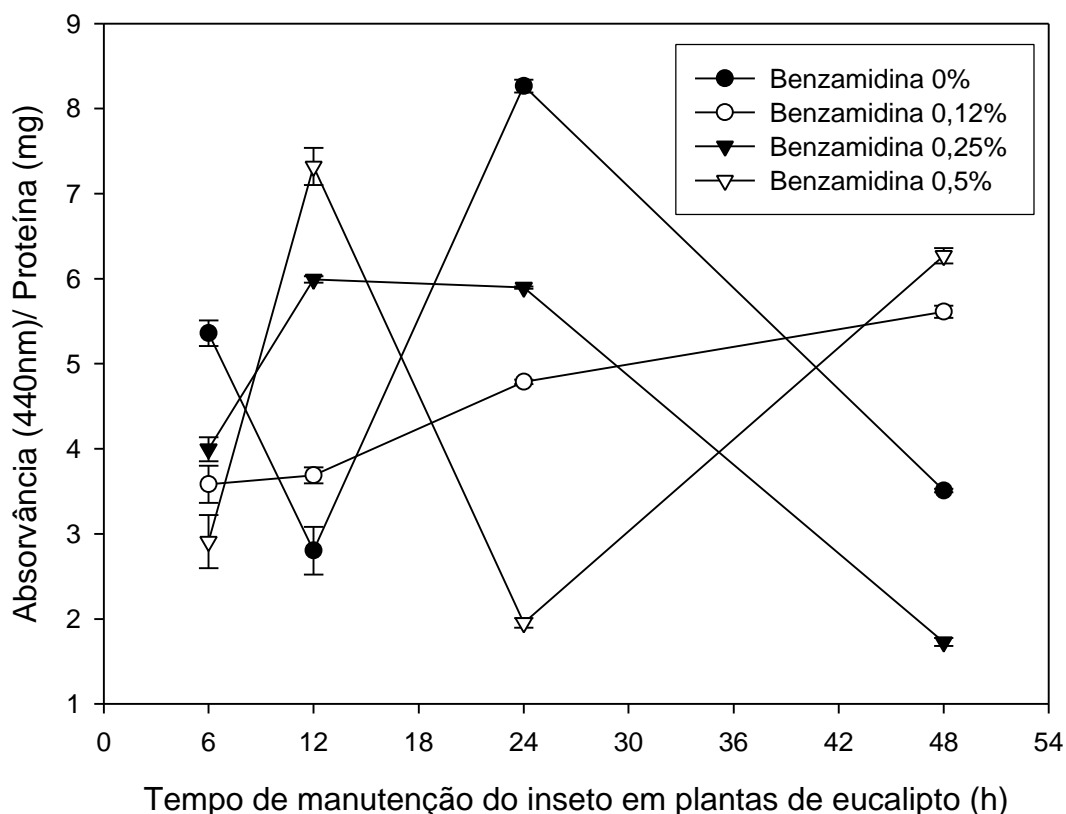


**Figura 14** - Atividade específica de cisteino-proteases no intestino de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* alimentadas com folhas de eucalipto submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias de 3 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda= 0,065491; F= 7,85;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ;  $P < 0,0001$ ).

Analisando a atividade proteásica total representada na Figura 15, observa-se que o perfil de atividade nas lagartas que ingeriram a solução de benzamidina a 0,5% apresentou pico 48 horas após a pulverização das folhas, mesmo tempo onde se nota pico de concentração de inibidor de protease (Figura 11). Esse perfil sugere a ocorrência de uma hiperprodução de proteases no intestino médio das lagartas de *T. leucoceraea*, como já observado em espécies de Lepidoptera tais como *Spodoptera littoralis* (De Leo *et al.*, 1998) e *A. gemmatalis* (Pilon, *et al.*, 2006).

O mesmo foi observado por Patankar *et al.* (2001), quando demonstraram que lagartas de *Helicoverpa armigera* foram capazes de superar os efeitos negativos de vários inibidores de proteases de plantas hospedeiras

após a ingestão crônica destes. Resultados semelhantes foram observados em *Agrotis ipsilon* e *Helicoverpa zea* (Mazumdar-Leighton & Broadway, 2001). Brito *et al.* (2001) sugeriram que *Heliiothis virescens* se adapta aos IPs mediante a síntese de novas proteases.



**Figura 15** – Perfil da atividade proteásica no intestino médio de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* alimentadas com folhas de eucalipto submetidas à aplicação de Benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias 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\*hospedeiro\*benzamidina (Wilks' Lambda= 0,081418; F= 6,85; df<sub>numerador</sub>= 9; df<sub>denominador</sub>= 34,223; P<0,0001).

Como visto anteriormente, na Figura 2, as folhas das plantas de eucalipto possuem mais inibidores de serino-proteases do que as de goiaba e, mesmo assim, as lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* se desenvolvem melhor sobre plantas de eucalipto do que sobre plantas de goiaba (Holtz *et al.*, 2003a, 2003b). Analisando as Figuras 9 e 15, observa-se que o pico máximo de atividade proteásica no intestino das lagartas que se alimentaram com plantas

de eucalipto é 3,05 vezes maior do que para as lagartas que se alimentaram com plantas de goiaba, sendo o pico máximo para goiaba de 2.709,05 Abs/ Proteína (g) (Figura 9) e para eucalipto de 8.266,28 Abs/ Proteína (g) (Figura 15). Essa disparidade de valores pode ser observada em todos os outros parâmetros medidos para a *T. leucoceraea* nos dois hospedeiros. Os valores de atividade trípica, de cisteino protease, de proteína total e de inibidores de proteases se mostraram sempre muito maiores para as lagartas que se alimentaram das folhas de eucalipto. Esses dados indicam que as lagartas de *T. leucoceraea* respondem à maior concentração de inibidores de proteases nas folhas de eucalipto aumentando a atividade de enzimas proteolíticas.

Os insetos podem superar os efeitos dos inibidores de proteases de diversas formas, tais como: pela hiperprodução de proteases (Broadway, 1995), pela indução da atividade de novas proteases insensíveis ao inibidor (Jogsma *et al.*, 1995; Broadway, 1995; Bolter & Jogsma, 1995), pela ligação dos inibidores de proteases a proteases não alvo (Michaud, *et al.*, 1995) ou pela ativação enzimática das tripsina-*like* (Oliveira *et al.*, 1993). Testando diferentes concentrações do inibidor benzamidina em folhas de eucalipto e goiabeira, observamos que pode ter ocorrido ativação enzimática das enzimas tripsina-*like* do intestino da lagarta de *T. leucoceraea*, ou ainda uma reversão da inibição da benzamidina pela alta concentração de proteínas no intestino do inseto, como observado para as lagartas que se alimentaram de plantas de goiaba.

Girard *et al.* (1998) observaram que indivíduos da mesma espécie de *Ceutorhynchus assimilis* coletados em cidades diferentes, apresentaram diferente suscetibilidade à presença de inibidores de proteases. No presente trabalho, as lagartas de *T. leucoceraea* também responderam de forma diferente à benzamidina conforme o hospedeiro que recebia a aplicação desse inibidor sintético. Entretanto, essa diferença é devida provavelmente às distinções entre os inibidores de proteases presentes nas folhas de eucalipto e goiaba, e não somente à benzamidina, o que é comprovado quando analisamos o perfil das atividades de proteases nas lagartas que se alimentaram das plantas controle (sem a aplicação de benzamidina).

A potência do inibidor de protease depende, entre outros fatores, da sua compatibilidade estrutural com a protease no organismo alvo (Broadway, 1995). Na interação, os inibidores de proteases se ligam ao sítio de ligação das

enzimas proteolíticas. As enzimas de tripsina-*like*, por exemplo, reconhecem os resíduos de aminoácidos arginil e lisil. Entretanto, além desse sítio, existe o contato entre aminoácidos que rodeiam o sítio ativo do inibidor e da enzima. A força dessa interação entre a enzima e o inibidor é determinada pela compatibilidade de todos os resíduos de aminoácidos em contato (Laskowski, 1985, Broadway, 1995). Portanto, além da quantidade do inibidor, importa saber a sua composição e adaptação ao centro ativo da enzima. Pode ser que a benzamidina não tenha se adaptado bem ao centro ativo da enzima no intestino de *T. leucoceraea*, pois ela interferiu nas atividades das proteases, mas não se mostrou muito efetiva em reduzi-las em nenhuma das concentrações testadas. Entretanto, a redução pouco expressiva das atividades de proteases das lagartas pode ser consequência das muitas formas de adaptação do inseto já discutidas neste trabalho.

É possível que resultados melhores sejam obtidos complementando o inibidor benzamidina com outros inibidores. Alguns autores sugerem que seja realizada uma associação de inibidores de tripsina, de quimotripsina e de proteases menos comuns como a elastase e outras encontradas no intestino médio dos insetos, para que seja alcançado sucesso na inibição, evitando a adaptação dos mesmos (Murdock & Shade, 2002; Ferry, *et al.*, 2004; Telang *et al.*, 2005).

A resistência apresentada pelas plantas é um fator condicionante na biologia dos indivíduos e ocorre através de evolução com os mesmos (Holtz *et al.*, 2003). A goiabeira já tem uma longa história de adaptação com as lagartas de *T. leucoceraea* e pode ter desenvolvido um tipo de inibidor de protease mais eficiente e econômico, que agiria mais sobre o inseto despendendo menor energia. Como o eucalipto é uma planta exótica, com relativamente pouco tempo de adaptação no Brasil, provavelmente sua defesa vem sendo suplantada pelas *T. leucoceraea*, proporcionando o sucesso dessas lagartas no ataque a essas plantas. Outros estudos podem testar a eficiência dos inibidores de proteases produzidos pelas plantas de goiaba e o conhecimento gerado poderia, posteriormente, auxiliar no controle das lagartas de *T. leucoceraea* em eucaliptais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, A.A. 1998. Induced response to herbivory and increased plant performance. *Science*. 279: 1201-1202.
- AGRAWAL, A.A. 2000. Specificity of induced resistance in wild radish: causes e consequences for two specialist and two generalist caterpillars. *Oikos*, 89: 493-500.
- AGRAWAL, A.A. & KARBAN, R. 2000a. Specificity of constitutive and induced resistance: pigment glands influence mites and caterpillars on cotton plants. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 96: 39-49.
- AGRAWAL, A.A., KARBAN, R., COLFER, R.G. 2000b. How leaf domatia and induced plant resistance affect herbivores, natural enemies and plant performance. *Oikos*, 89: 70–80.
- AGRAWAL, A.A., JANSSEN, A., BRUIN, J., POSTHUMUS, M.A., SABELIS, M.W. 2002. An ecological cost of plant defence: attractiveness of bitter cucumber plants to natural enemies of herbivores. *Ecology Letters*. 5: 377–385.
- ANDRADE, E.D. 1961. O eucalipto. Jundiaí, Oficina Topográfica da Companhia Paulista de Estradas de Ferro, 667p.
- ANJOS, N., SANTOS, G.P., ZANUNCIO, J.C. 1986 Pragas do eucalipto e seu controle. *Informe Agropecuário, Belo Horizonte*. 12:50-58.
- APPLEBAUM, S.W. Biochemistry of digestion. 1985. In *Comparative Physiology and Pharmacology of Insects* (Edited by Kerkut G..A. and Gilbert, L.I.), 5:279-311. Pergamon, Toronto.
- ARIMURA, C., KOST, G., BOLAND, W. 2005. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta* . 734: 91– 111
- BATISTA, R.B., OLIVEIRA, M.G.A., PIRES, C.V., PIOVESSAN, N.D., REZENDE, S.T., MOREIRA, M.A. 2002. Caracterização Bioquímica e Cinética de lipoxigenases de Plantas de Soja Submetidas à Aplicação de Ácidos Graxos Poliinsaturados. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37 (11): 1517-1524.
- BELL, H.A., FITCHES, E.C., DOWN, R.E., FORD, L., MARRIS, G.C., EDWARDS, J.P., GATEHOUSE, A.M.R., 2001. Effect of dietary cowpea trypsin inhibitor (CpTI) on the growth and development of the tomato moth *Lacanobia oleraceae* (Lepidoptera: Noctuidae) and on the success of the gregarious ectoparasitoid *Eulophus pennicornis* (Hymenoptera: Eulophidae). *Pest Management Science*. 57: 57-65.
- BERNADI, R., TEDESCHI, G., RONCHI, S., PALMIERI, S. 1996. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like from larvae of european corn

- borer *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). *Insect of Biochemistry and Molecular Biology*. 25: 883-889.
- BOLTER, C.J., JOGSMA, M.A., 1995. Colorado potato beetles (*Leptinotarso decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *Journal of Insect Physiology*. 41: 1071-1078.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 248.
- BRAGANÇA, M.A.L, ZANUNCIO, J.C., PICANÇO, M. & LARANJEIRA, A.J. 1998. *Forest. Ecological Management* 103: 277-282.
- BRITO, L.O., LOPES, A. R., PARRA, J.R.P., TERRA, W.R., SILVA-FILHO, M.C. 2001. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by synthesis of new proteinases. *Comparative Biochemistry Physiology*. 128: 365-375.
- BROADWAY, R.M. & DUFFEY, S.S. 1986. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *Journal of Insect Physiology*. 32(10): 827-833.
- BROADWAY, R.M. & DUFFEY, S.S. 1988. The effect of plant protein quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*. 34: 1111-1117.
- BROADWAY, R.M. 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *Journal of Insect Physiology*. 41(2): 107-116.
- BROADWAY, R.M. 1996. Dietary proteinase inhibitors alter compliment of midgut proteases. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 32: 39-53.
- BROADWAY, R.M. 1997. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*. 43: 855-874.
- CARLINI, C.R., GROSSI-DE-SÁ, M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon*, 40: 1515-1539.
- CORTESERO, A.M., STAPEL, J.O. & LEWIS, W.J. 2000. Understanding and manipulating plant attributes to enhance biological control. *Biological Control*, 17: 35-49.
- DE LEO, F., BONADE-BOTTINO, M. A. CECI, L.R., GALLERANI, R. AND JOUANIN, L. 1998. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. *Plant Physiology*, 118: 997-1004.

- DE LEO, F., BONADE-BOTTINO, M., CECI, L.R., JOUANIN, L. 2001. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31: 593-602.
- DELLEDONNE, M., ALLEGRO, G., BELENGHI, B., BALESTRAZZI, A., PICCO, F., LEVINE, A., ZELASCO, S., CALLIGARI, P., CONFALONIERI, M., 2001. Transformation of poplar (*Populus alba* L.) with a *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance. *Molecular Breeding*. 7: 35-42.
- DICKE, M.; SABELIS, M.W. 1988. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds. *Functional Ecology*. 2: 131-139.
- ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 95:271-278.
- FARMER, E.E. & RYAN, C.A. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell*, 4: 129-134.
- FASTREZ, J. & FERSHT, A.R. 1973. Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. *Biochemistry*. 12: 2025-2034.
- FELTON, G.W., BROADWAY, R.W., DUFFEY, S.S. 1989. Inactivation of protease inhibitor activity by plant-derived quinones: complications for host-plant resistance against noctuid herbivores. *Journal of Insect Physiology*. 35: 981-990.
- FERRY, N., GATEHOUSE, J.A., GATEHOUSE, A.M.R. 2004. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*. 15: 1-7.
- FREITAS, S. 1988. Efeito do desfolhamento na produção de *Eucalyptus grandis* Hill Ex Maiden (Myrtaceae) visando avaliar os danos causados por insetos desfolhadores. 99 p. ESALQ, Piracicaba. Dissertação (Tese – Doutorado) - Universidade de São Paulo.
- GALLO, D., NAKANO, O., NETO, S.S., CARVALHO, R.P.L., BAPTISTA, G.C., BERTI FILHO, E., PARRA, J.R.P., ZUCCHI, R.A., ALVES, S.B., VENDRAMIM, J.D., MARCHINI, L.C., LOPES, J.R.S., OMOTO, C. 2002. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: FEALQ, 920 p.
- GIRARD, C., MÉTAYER, M.L., BONADE-BOTTINO, M., PHAM-DELEÈGUE, M-H., JOUANIN, L. 1998. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larval. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28: 229-237.



- HAUKIOJA, E., OSSIPOV, V., LEMPA, K. 2002. Interactive effects of leaf maturation and phenolics on consumption and growth of a geometrid moth. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 104: 125–136.
- HILDER, V.A., GATEHOUSE, A.M.R., SHEERMAN, S.E., BARKER, R.F., BOULTER, D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*. 330:160-163.
- HOFFMANN, M.P., ZALOM, F.G., WILSON, L.T., SMILANICK, J.M., MALYJ, L.D., KISER, J., HILDER, V.A., BARNES, W.M., 1992. Field evaluation of transgenic tobacco containing genes encoding *Bacillus turigiensis* d-endotoxin or cowpea trypsin inhibitor: efficacy against *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology*. 85: 2516-2522.
- HOLTZ, A.M. 2001. Interações tritróficas afetando os surtos de pragas em Myrtaceae. 104p. Dissertação (Mestrado em Entomologia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- HOLTZ, A.M., OLIVEIRA, H.G., PALLINI, A., VENZON, M., ZANUNCIO, J.C., OLIVEIRA, C.L., MARINHO, J.S., ROSADO, M.C. 2003a. Desempenho de *Thyrinteina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) em eucalipto e goiaba: o hospedeiro nativo não é um bom hospedeiro? *Neotropical Entomology* 32(3): 427-431.
- HOLTZ, A.M.; OLIVEIRA, H.G.; PALLINI, A.; MARINHO, J.S.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, C.L. 2003b. Adaptação de *Thyrinteina arnobia* em novo hospedeiro e defesa induzida por herbívoros em eucalipto. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 38: 453-458.
- HOUSEMAN, J.G., DOWNE, A.E.R., PHILOGENE, B.J.R. 1989. Partial characterization of proteinase activity in the larval midgut of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae). *Canadian Journal of Zoology*. 67: 864-868.
- HUMMEL, B.C.W. 1959. A modified spectrophotometric determination of chymiotrypsin, trypsin and trombin. *Canadian Journal of Biochemistry Physiology*. 37: 1393-1399.
- INAGAMI, T. 1972. Trypsin. In: FUNATSU, M.; HIROMI, K.; IMAHORI, K., MURACHI, T.; NARITA, K., ed. *Proteins structure and Function*. Tokio, Kodanska. 1-83.
- JOGSMA, M.A., BAKKER, P.I., PETERS, J., BOSCH, D. STIEKEMA, W.J. 1995. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase-inhibitor by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 92: 8042-8045.
- JONGSMA, M.A., BOLTER, C. 1997. The adaptation of insect to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology*. 43: 885-896.
- JOUANIN L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. 1998. Transgenic plants for insect resistance. *Plant Science*. 131:1-11.

- KARBAN, R. & BALDWIN, I.T. 1997. Evidence for chewing insect-specific molecular events distinct from a general wound response in leaves. *Plant Physiology*. 1299-1305.
- KOIWA, H., BRESSAN, R.A. AND HASEGAWA, P.M. 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*. 2: 379– 384.
- KOIWA, H., SHADE, R.E., ZHU-SALZMAN, K., SUBRAMANIAN, L., MURDOCK, L.L., NIELSEN, S.S., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M. 1998. Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. *Plant Journal*. 14: 371-379.
- KOPTUR, S. 1992. Extrafloral nectary-mediated interactions between insects and plants. In: *Insect-Plant Interactions IV* (ed. Bernays). CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 81-129.
- KURODA, M., ISHIMOTO, M., SUZUKI, K., KONDO, H., ABE, K., KITAMURA, K., ARAI, S. 1996. Oryzacystatins exhibit growth-inhibitory and lethal effects on different species of bean insects pests *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) and *Riptortus clavatus* (Hemiptera). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 60: 209-212.
- LAM, W., COAST, G.M., RAYNE, R.C. 2000. Characterization of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 30: 85–94.
- LARA, F.M. 1991. Princípios de resistência de plantas a insetos. 2.ed. São Paulo: Ícone. 336p.
- LASKOWSKI, M.J.R., KATO, I. 1980. Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*, 49: 685-693.
- LASKOWSKI, M. 1985. Protein inhibitors of serine proteinases: mechanism and classification. In *Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods*, ed. Friedman, pp. 1-17. Plenum Press, New York.
- LAWRENCE, P.K. & KOUNDAL, K.R. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*. 5(1): 93-109.
- LEMOS, R.N.S., CROCOMO, W.B., FORTI, L.C., WILCKEN, C.F. 1999. Seletividade alimentar e influência da idade da Folha de *Eucalyptus* spp. Para *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera:Geometridae) *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 34(1): 7-10.
- MAGALHÃES-ROCHA, N.M., ROGANA, E., MARES-GUIA, M. 1980. Kinetic parameters for the activation of  $\alpha$  and  $\beta$ -trypsin by the methyl ester of the tosyl-L-arginine (Tos-L-Arg-OMe). *Archives of Biochemistry Biophysics*. 200: 61-64.
- MALONE, L.S., BURGESS, E.P.J., CHRISTELLER, J.T., GATEHOUSE, H.S. 1998. *In vivo* responsiveness of honey bee midgut proteases to two protease inhibitors from potato. *Journal of Insect Physiology*. 44 (2): 141-147.

- MANICA, I., ICUMA, I.M., JUNQUEIRA, N.T.V., SALVADOR, J.O., MOREIRA, A., MALAVOLTA, E. 2001. Goiaba: do plantio ao consumidor. Porto Alegre: Cinco Continentes. 124 p.
- MARES-GUIA, M., ROGANA, E., AMORIN, A.F., MAGALHÃES-ROCHA, N.M. 1981. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. *The Journal of Biological Chemistry*. 256: 1661-1668.
- MARKWICK, N.P., REID, S.J., LAING, W.A., CHRISTELLER, J.T. 1995. Effect of dietary protein and protease inhibitors on coding moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*. 88: 33-39.
- MARQUIS. R.J. 1992. Plant Resistance to Herbivores and Pathogens. *Ecology, Evolution and Genetics*. R.S. Fritz and E.L. Simms, Eds. (Univ. of Chicago Press, Chicago, IL, 1992), 392-425.
- MAZUMDAR – LEIGHTON, S. & BRODWAY, R. M. 2001. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31: 645-657.
- MICHAUD D., BERNIER-VADNAIS N., OVERNEY S. AND YELLE S. 1995. Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 25: 1041-1048.
- MOLLEMA, C. & COLE, R.A. 1995. Low aromatic amino acid concentrations determine resistance to *Franklinella occidentalis* in four vegetable crops. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 78: 325-333.
- MURDOCK, L.L., BROOKHART, G., DUNN, P.E., FOARD, D.E., KELLEY, S. 1987. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87: 783-787.
- MURDOCK, L.L. & SHADE, R.E. 2002. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insect pests. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 6605-6611.
- NAKATA A. & ISHII, S.I. 1972. Substrate activation of trypsin and acetyl-trypsin caused by *N*-α-benzyl-L-arginine-p-nitroanilide. *Journal of Biochemistry*. 72: 281-290.
- NANDEESHA, P., PRASAD, D.T., 2001. Characterization of serine proteinase inhibitor from subabul (*Leucaena leucocephala* Lam) seeds. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 10: 75-78.
- NOVILLO, C., CASTAÑERA, P., HORTEGO, F. 1999. Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinases from larvae of the stalk corn borer, *Sesamia nonagroides*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 29: 177-184.

- OHTA, H., IDA, S., MIKAMI, B., MORITA, Y. 1986. Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination. *Plant Cell Physiology*. 22(5): 911-918.
- OLIVEIRA, M.G.A., ROGANA, E., ROSA, J.C., REINHOLD, B.B., ANDRADE, M.H., GREENE, L.J., MARES-GUIA, M. 1993. Tyrosine 151 Is Part Of The Substrate Activation Binding Site Of Bovine Trypsin. *The Journal of Biological Chemistry*. 268(36): 26893-26903.
- OLIVEIRA, M.G.A., SIMONE, S.G., XAVIER, L.P., GUEDES, R.N.C. 2005. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140(Parte B): 369-380.
- PATANKAR, A.G., GIRI, A.P., HARSULKAR, A.M., SAINANI, M.N., DESHPANDE, V.V., RANJEKAR, P.K., GUPTA, V.S. 2001. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31: 453-464.
- PILON, A.M. 2004. Estudos dos mecanismos de resposta adaptativa de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) quando alimentadas com níveis crescentes de inibidores de protease em dieta artificial. 63 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- PILON, A.M., OLIVEIRA, M.G.A., GUEDES, R.N.C. 2006. Protein Digestibility, Protease Activity and Post-Embryonic Development of the Velvetbean Caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) Exposed to the Trypsin-Inhibitor Benzamide. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.
- POMPERMAYER, P., LOPES, A.R., TERRA, W.R., PARRA, J.R.P., FALCO, M.C., SILVA-FILHO, M.C. 2001. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatrea saccharalis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 99: 79-85.
- POMPERMAYER, P. 2000. Estudo *in vivo* e *in vitro* da ação de inibidores de proteinase de soja sobre o desenvolvimento e atividade das proteinases intestinais de lagartas da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) (Fabr., 1794). ESALQ, Piracicaba. Dissertação (Tese – Doutorado) - Universidade de São Paulo.
- POMPERMAYER, P., FALCO, M.C., PARRA, J.R.P., SILVA-FILHO, M.C. 2003. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 109(3): 217-224.
- PRICE, P.W. 1986. Ecological aspects of host plant resistance and biological control: Interactions among tritrophic levels. Interactions of plant resistance and parasitoids and predators of insects. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 11: 11-30.

- PURCELL, J.P., GREENPLATE, J.P., SAMMONS, R.D. 1992. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 22: 41-47.
- RAKWAL, R., AGRAWAL, G.K., JWA, N.S. 2001. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2 A inhibitors. *Gene*. 263: 189-198.
- ROBINSON, R.A. 1996. Return to resistance: breeding crops to reduce pesticide dependence. Davis: Ag. Acess. 490 p.
- RODRIGUEZ-SAONA, C. & THALER, J.S. 2005. The jasmonate pathway alters herbivore feeding behaviour: consequences for plant defences. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 115: 125–134.
- RYAN, C.A. 1990. Genes for improving defences against insects and pathogens. *Annuals Reviews Phytopathology*. 28:425-449.
- SANTOS, G.P., ANJOS, N., ALVES, A.P., ZANUNCIO, J.C. 1986. Bionomia de *Oxydia vesulia* (Cramer, 1779) (Lepidoptera: Geometridae) desfolhador de eucalipto. *Revista Árvore*. 10(2): 161-167.
- SHULKE, R.H. & MURDOCK, L.L. 1983. Lipoxigenase trypsin inhibitor and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Environmental Entomology*. 12: 787-791.
- SILVA, F.B., OLIVEIRA, M.G.A., BATISTA, R.B., PIRES, C.V., XAVIER, L.P., PIOVESAN, N.D., OLIVEIRA, J.A., JOSÉ, I.C., MOREIRA, M.A. 2002. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). *Arquivos do Instituto Biológico*. 60(1): 67-74.
- SILVA-FILHO, M.C. & FALCO, M.C. 2000. Interação Planta-inseto – Adaptação dos Insetos aos Inibidores de Proteinases Produzidas pelas Plantas. *Biotecnologia – Ciência e Desenvolvimento*. 12: 38-42.
- TELANG, A.M., GIRI, A.P., SAINANI, M.N., GUPTA, V.S. 2005. Characterization of two midgut proteinases of *Helicoverpa armigera* and their interaction with proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology*. 51(5): 513-522.
- TERRA, W.R. & FERREIRA, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 109 B (1): 1-62.
- THALER, J.S., STOUT, M.J., KARBAN, R., DUFFEY, S.S. 2001. Jasmonate-mediated induced plant resistance affects a community of herbivores. *Ecological Entomology*. 26: 312-324.

- TSCHARNTKE, T., THIESSEN, S., DOLCH, R., BOLAND, W. 2001. Herbivory, induced resistance, and interplant signal transfer in *Alnus glutinosa*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 29: 1025-1047.
- TOMARELLI, R.M., CHARNEY, J., HARDING, M.L. 1949. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 34:428.
- VAN LENTEREN, J.C., BALE, J., BIGLER, F., HOKKANEN, H.M.T., LOOMANS, A.J.M. 2006. Assessing risks of releasing exotic biological control agents of arthropod pests. *Ann. Rev. Entomol.* 51: 609-634.
- VILA, L., QUILIS, J., MEYNARD, D., BREITLER, J.C., MARFÀ, V., MURILLO, I., VASSAL, J.M., MESSEGUER, J., GUIDERDONI, E., SEGUNDO, B.S. 2005. Expression of the maize proteinase inhibitor (mip) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. *Plant Biotechnology Journal*. 3: 187-202.
- WOLFSON, J.L. and MURDOCK, L.L. 1990. Diversity in digestive proteinase activity among insects. *Journal of Chemical Ecology*. 16: 1089-1102.
- WU, Y., LLEWELLYN, D., MATHEWS, A., DENNIS, E.S. 1997. Adaptation of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) to a proteinase inhibitor expressed in transgenic tobacco. *Molecular Breeding*. 3: 371-380.
- XAVIER-FILHO, J. 1992. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitor in plants. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. 4(1): 1-6.
- XAVIER, L.P., OLIVEIRA, M.G.A., GUEDES, R. N.C., SANTOS, A.V., SIMONE, S.G. 2005. Membrane-bound trypsin-like activity of midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Entomology (Ceske Budejovice)*. 102(2): 147-153.
- XU, D., XUE, Q., MCELROY, D., MAWAL, Y., HILDER, V.A., WU, R. 1996. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTi, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice pests. *Molecular Breeding*. 2: 167-173.
- ZANUNCIO, J.C. & LIMA, J.O.G. 1975. Ocorrência de *Sarsina violascens* (Herrich – Shaeffer, 1856) em eucaliptais de Minas Gerais. *Revista Florestal*. 6: 48-50.
- ZANUNCIO, J.C., FAGUNDES, M., ANJOS, N., ZANUNCIO, T.V., CAPITANI, L.R. 1990. Levantamento e flutuação populacional de lepidópteros associados à eucaliptocultura: Região de Belo Horizonte, Minas Gerais, junho de 1986 a maio de 1987. *Revista Árvore*, 14: 35-44.
- ZANUNCIO, J.C., SANTANA, D.L., NASCIMENTO, E.C., SANTOS, G.P., ALVES, J.B., SARTÓRIO, R.C., ZANUNCIO, T.V. 1993. Lepidoptera desfolhadores de eucalipto: biologia, ecologia, e controle. Ed. Folha de Viçosa Ltda. 140 p.

- ZANUNCIO, T.V., ZANUNCIO, J.C., TORRES, J.B., LARANJEIRO, A.J. 1995. Biologia de *Euselasia Higenirs* (Lepidoptera; Rionidae) e seu consumo foliar em *Eucalyptus urophylla*. Revista Brasista Entomologia. 36(3): 487-492.
- ZHU, Y-C. & BAKER, J.E. 1999. Characterization of midgut trypsin-like enzyme and three trypsinogen cDNAs from the lesser grain borer, *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). Insect Biochemistry and Molecular Biology. 29:1053-1063.