

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

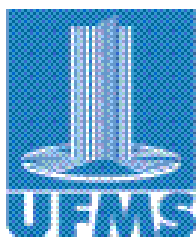


Karina Justo Custódio Dias

*MECANISMOS DE AÇÃO DE UM INIBIDOR DE
PROTEINASE SOBRE O DESENVOLVIMENTO
DE *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae)*

**Orientação: Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo
Co – Orientação: Dra. Susana Elisa Moreno**

Campo Grande/MS
2013



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL



Karina Justo Custódio Dias

*MECANISMOS DE AÇÃO DE UM INIBIDOR DE
PROTEINASE SOBRE O DESENVOLVIMENTO
DE *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae)*

Dissertação apresentada como um dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal junto ao
Departamento de Biologia do Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde.

Campo Grande/MS
2013

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Walter (in memória) e Kátia, que não mediram esforços para que eu atingisse meus objetivos, sempre com todo carinho e amor.

Aos meus irmãos Kelly e William e ao meu esposo Ricardo, que sempre estiveram me apoiando e me incentivando com toda paciência em busca do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao nosso bondoso e caridoso Deus, pelo dom da vida e pela oportunidade de conhecer pessoas especiais que me fizeram evoluir.

À Prof^ª. Dr^ª. Maria Ligia Rodrigues Macedo pela orientação, credibilidade, ensinamentos e por me ajudar a vencer mais uma etapa da minha vida.

À Michelly, grande técnica, pela paciência nos momentos de dificuldade, pelo conhecimento transmitido e por sua amizade.

Aos amigos do LPPFB, Suzy, Dani, Welington, César, Lays, Carol, Fran, Helô, Fernando, Ana Maria, Ana Cristina, Elisa e Adriana pelo companheirismo e colaboração durante este período de convivência.

A prof^ª. Dr^ª. Susana Elisa Moreno pela co- orientação.

Aos professores Dr^ª. Priscila Aiko Hiane e Dra^ª. Rosani do Carmo de Oliveira Arruda por participarem da banca examinadora desta tese, acrescentando valiosas sugestões para enriquecer o meu trabalho.

Aos professores da Pós Graduação de Biologia Vegetal pelos ensinamentos.

A toda minha família, pelo amor, carinho e compreensão e por acreditarem em mim. Amo vocês!

Ao meu esposo Ricardo, pela incansável ajuda, paciência, compreensão e carinho dispensados durante toda a realização do meu trabalho.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho

As agências de Fomento: Capes, FINEP, CNPq e Fundect pelo apoio financeiro.

ORAÇÃO DE AGRADECIMENTO

Agradecemos- te Senhor. Pela glória de viver. Pela honra de amar! Muito obrigado Senhor, pelo que me deste, pelo que me dás! Muito obrigado pelo pão, pelo ar, pela paz! Muito obrigado pela beleza que meus olhos vêem no altar da natureza!

Olhos que fitam o ar, a terra e o mar. Que acompanha a ave fagueira que corre ligeira pelo céu de anil e se detém na terra verde salpicada de flores em tonalidades mil! Muito obrigado Senhor, porque eu posso ver o meu amor! Diante de minha visão, pelos cegos, formulo uma oração: Eu sei que depois dessa vida, não outra vida, eles também enxergarão! Obrigado pelos ouvidos meus que me foram dados por Deus.

Ouvidos que ouvem o tamborilar da chuva no telheiro, a melodia do vento nos ramos do salgueiro, as lágrimas que choram os olhos do mundo inteiro. Diante de minha capacidade de ouvir pelos surdos, eu te quero pedir, eu sei que depois desta dor, no teu reino de amor, eles também ouvirão! Muito obrigado Senhor, pela minha voz! Mas também pela voz que canta, que ensina e que alfabetiza.

Que canta uma canção e teu nome profere com sentida emoção! Diante da minha melodia quero te rogar, pelos que sofrem de afazia, pelos que não cantam de noite e não falam de dia. Eu sei que depois desta dor, no teu reino de amor, eles também cantarão!

Muito obrigado Senhor, pelas minhas mãos! Mas também pelas mãos que oram, que semeiam, que agasalham. Mãos de amor, mãos de caridade, de solidariedade. Mãos que apertam mãos. Mãos de poesia, de cirurgia, de sinfonia, de psicografias... Mãos que acalentam na velhice, a dor e o desamor! Mãos que acolhem ao seio do corpo, um filho alheio, sem receio.

Pelos meus pés, que me levam a andar sem reclamar. Muito obrigado Senhor, porque posso bailar! Olho para a terra e vejo amputados, marcados, desesperados, paralisados... Eu posso andar! Oro por eles! Eu sei que depois dessa expiação, na outra reencarnação, eles também bailarão.

Muito obrigado Senhor, pelo meu lar! É tão maravilhoso ter um lar... Não importa se este lar é uma mansão, um bangalô, seja lá o que for! O importante é que dentro dele exista amor! O amor de pai, de mãe, de marido e esposa, de filho, de irmão...

De alguém que lhe estenda a mão, mesmo que seja o amor de um cão, pois é tão triste viver na solidão! Mas se não tiver ninguém para amar, um teto pra me acolher, uma cama pra me deitar... mesmo assim, não reclamarei, nem blasfemarei. Simplesmente direi: Obrigado Senhor, porque nasci. Obrigado Senhor, porque creio em ti! Pelo teu amor, Obrigado Senhor!

Autora: Amália Rodrigues
Psicografia de Divaldo Franco

Sumário

LISTA DE TABELA.....	1
LISTA DE FIGURAS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
1.1. Considerações Gerais	4
1.2. Inibidores de Proteinase	4
1.3. Proteinases digestivas dos insetos	5
1.4. Inseto-praga	6
1.5. Semente	7
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	8
ARTIGO.....	13
Normas para publicação	14
Resumo	19
Abstract.....	20
1. Introdução.....	21
2. Materiais e métodos.....	22
2.1. Materiais	22
2.2. Insetos.....	23
2.3. Isolamento do inibidor de tripsina de <i>I. laurina</i> (ILTI).....	23
2.4. Obtenção das enzimas do fuido intestinal do inseto.....	23
2.5. Quantificação de proteína.....	24
2.6. Ensaio de atividade inibitória	24
2.7. Parâmetros Nutricionais	24
2.8. Efeito de ILTI na atividade proteolítica endógena	25
2.9. Digestão de ILTI e eletroforese em gel	25
2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida	25
2.11. Análise estatística	26
3. Resultados.....	26
3.1. Efeito do ILTI sobre tripsina e quimiotripsina de <i>A. kuehniella in vitro</i>	26
3.2. Efeito de diferentes concentrações de ILTI sobre o desenvolvimento larval de <i>A. kuehniella</i>	27

3.3. Efeito do ILTI 0,1% sobre o desenvolvimento de <i>A. kuehniella</i> no terceiro, quarto e quinto instar larval	28
3.4. Índices Nutricionais	30
3.5. Quantidade de Proteína Total, Tripsina e Quimiotripsina no intestino de larvas alimentadas com ILTI 0,1%	30
3.6. Efeito de ILTI na análise do consumo e utilização de alimento das larvas de 4º instar de <i>Anagasta kuehniella</i>	32
3.7. Efeito do ILTI nas enzimas digestivas	33
3.8. Digestão do ILTI e gel eletroforese	34
4. Discussão	36
5. Conclusão	39
Agradecimentos	39
Referências	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS	46

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Índices Nutricionais de larvas de <i>A. kuehniella</i> em quarto instar	30
--	-----------

LISTA DE FIGURAS

Introdução

Figura 1- Diagrama geral de intestino de inseto lepidóptero	06
--	-----------

ARTIGO

Figura 1- (Artigo) Atividade da tripsina e quimiotripsina em concentrações crescentes de ILTI	26
--	-----------

Figura 2- Efeito do ILTI em larvas de <i>A. kuehniella</i> quando administrado em dietas artificiais	28
---	-----------

Figura 3- Efeito da dieta artificial contendo 0,1% de ILTI, no desenvolvimento larval de <i>A. kuehniella</i> no terceiro, quarto e quinto instar	29
--	-----------

Figura 4- Dosagem de proteínas de larvas no terceiro, quarto e quinto instar, alimentadas em dieta sem inibidor e com 0,1% de ILTI	31
---	-----------

Figura 5- Atividade da tripsina do conteúdo do intestino médio de larvas submetidas à dieta contendo ILTI 0,1%	31
---	-----------

Figura 6- Atividade da quimiotripsina do conteúdo do intestino médio de larvas submetidas à dieta contendo ILTI 0,1%	32
---	-----------

Figura 7- Quantidade de dieta consumida pelas larvas de quarto instar de <i>A. kuehniella</i> alimentadas com dieta controle e dieta artificial, contendo ILTI 0,1%	33
--	-----------

Figura 8- Quantidade de fezes produzidas pelas larvas de quarto instar de <i>A. kuehniella</i> alimentadas com dieta controle e dieta artificial, contendo ILTI 0,1%	33
---	-----------

Figura 9- Análise de sensibilidade a tripsina e a quimiotripsina de <i>A. kuehniella</i> quarto instar incubadas com ILTI 0,1%	34
---	-----------

Figura 10- Estabilidade do ILTI após incubação de 3h à 24h com intestino médio de larvas de quarto instar alimentadas em dieta controle e alimentadas em dieta contendo ILTI 0,1%	35
--	-----------

Figura 11- SDS- PAGE do ILTI incubado com intestino médio de larvas de <i>A. kuehniella</i> alimentadas em dieta controle de 3h à 24h para verificar a digestibilidade do ILTI	35
---	-----------

RESUMO

Inibidores de proteinases (IPs) são proteínas ou peptídeos capazes de se ligar às enzimas proteolíticas, localizadas no intestino médio dos insetos, impedindo sua atividade proteolítica por inibição competitiva. As plantas sintetizam IPs como um dos mecanismos de defesa contra o ataque de insetos-praga. *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879), conhecida como traça de farinha, é uma espécie cosmopolita, que causa danos a cultura de milho, trigo e arroz inutilizando os farelos e outros produtos para o consumo, com vultosos prejuízos. Neste trabalho, um inibidor purificado da semente de *Inga laurina* (ILTI) foi utilizado em dietas artificiais, e através de bioensaios foi determinado seu potencial tóxico em *A. kuehniella*. A ingestão de ILTI em diferentes concentrações (0,1% e 0,5%) resultou em uma redução significativa na sobrevivência (30% e 88%, respectivamente), e no peso médio larval (44% e 81%, respectivamente). Na concentração de 0,1% o período de quarto instar mostrou-se relativamente o melhor instar para o estudo da larva *A. kuehniella*. Os índices nutricionais revelaram uma redução na eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido, e um aumento na digestibilidade aproximada e custo metabólico. Experimentos utilizando dieta mostraram que ILTI 0,1%, incorporado à dieta artificial, diminuiu a taxa de consumo e produção fecal de *A. kuehniella*. A atividade da tripsina nas larvas alimentadas com ILTI foi sensível ao inibidor, indicando que nenhuma nova protease resistente ao inibidor foi induzida em larvas alimentadas. Através do gel de eletroforese, foi possível visualizar que o ILTI não foi digerido pelas enzimas do intestino médio de *A. kuehniella*. Tal resultado indica que o ILTI é uma proteína bioinseticida promissora na biotecnologia de plantas resistentes a praga.

ABSTRACT

Proteinase inhibitors (IPs) are proteins or peptides able of binding to proteolytic enzymes, located in the insect midgut, preventing its proteolytic activity by competitive inhibition. Plants synthesize IPs as a defense mechanism against the insect pests attack. *Anagasta kuehniella* (Zeller, 1879), known as flour moth, is a cosmopolitan species that causes damage to the corn, wheat and rice crops disabling the bran and other products for consumption with substantial losses. This work presents an inhibitor purified from *Inga laurina* seeds (ILTI) used in artificial diets and through bioassays was determined their toxic potential in *A. kuehniella*. ILTI intake at different concentrations (0.1% and 0.5%) resulted in significant decrease in survival (30% and 88%, respectively), and average larval weight (44% and 81%, respectively). In concentration of 0.1% of fourth instar period was relatively best instar larva for the study of *A. kuehniella*. Nutritional outcomes revealed an efficiency conversion decrease of ingested and digested food, and a metabolic cost and approximate digestibility increase. Diet experiments exhibited that ILTI 0.1% incorporated into artificial diet, decreases the consumption rate and fecal *A. kuehniella* output. Trypsin activity in ILTI-fed larvae was sensitive to inhibitor, representing no new resistant protease to inhibitor was induced in fed larvae. Through gel electrophoresis was feasible to conclude ILTI was not digested by midgut *A. kuehniella* enzymes. This outcome exhibit ILTI is a promising bioinsecticide protein in pest resistant plants biotech.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações Gerais

Com a explosão populacional humana, ocorre a necessidade do aumento das produções agrícolas. Porém, isso irá originar a propagação de insetos pragas e o aumento do custo de produção (SHARMA *et al.*, 2000). Na tentativa de controlar o ataque dessas pragas agrícolas, tem-se buscado o desenvolvimento de técnicas ambientalmente favoráveis que promovam o aumento da produção, sem aumento da área plantada, e que não sejam baseados em agroquímicos, os quais causam sérios danos ao ambiente e ao homem, resultando também no desenvolvimento de resistência aos insetos (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002).

As plantas são capazes de sintetizar várias moléculas no uso de sua defesa contra o ataque de insetos, e entre essas moléculas, os inibidores de proteinases (IPs) são os mais estudados, sendo uma das proteínas mais eficaz na defesa das plantas (KOIWA *et al.*, 1997; FALCO *et al.*, 2001; HAQ *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2006)

As sementes de leguminosas são fontes ricas de proteína, tendo como umas das principais funções a de proteger ou defender a semente e a planta do ataque de pragas e patógenos, e dentre estas os inibidores de leguminosas vem sendo amplamente estudados (NEURATH, 1984; MACEDO *et al.*, 2000; PANDO *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2004).

Anagasta kuehniella (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), conhecida como “traça da farinha”, é um dos mais importantes insetos pragas de grãos relatados no mundo, que ataca grãos armazenados, frutas, farinhas e até mesmo biscoitos e doces, deixando-os, na maioria das vezes imprópria para o consumo (BOLETI, 2003).

1.2. Inibidores de Proteinase

Os inibidores de proteinases (IPs) são proteínas ou peptídeos, encontrados em vegetais, animais e microorganismos, que interagem reversível e especificamente com diferentes enzimas proteolíticas (enzimas que rompem as ligações peptídicas entre as proteínas), promovendo sua inibição por meio da competição com o substrato pelo sítio ativo da enzima (LINGARAJU & GOWDA, 2008). Nas plantas, podem ser encontrados

nos órgãos reprodutivos e de reserva, como sementes e tubérculo, apresentando variadas funções como, proteínas de reserva e podem estar envolvidos nos processos de defesa da planta contra insetos e patógenos (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006; KONAREV *et al.*, 2008; MACEDO & OLIVEIRA, 2011).

Foram estabelecidas quatro classes de inibidores de proteinases de acordo com suas atividades específicas: inibidores de proteinases serínicas, cisteínicas, aspárticas e de metalo- proteinases. Os mais estudados são os inibidores das serinoproteinases (tripsina e quimiotripsina) (RYAN, 1990; KOIWA *et al.*, 1997). Estudos mostraram que os IPs serínicas são eficientes para insetos da ordem Lepidoptera (MACEDO *et al.*, 2003, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2007; RAMOS *et al.*, 2009), pois a ingestão dos inibidores de proteinases serínica leva à inibição de proteinases digestivas, interferindo na disponibilidade de aminoácidos essenciais necessários para o crescimento e desenvolvimento dos insetos (KIM & MULIN, 2003; VOLPICELLA *et al.*, 2003).

1.3. Proteinases digestivas dos insetos

Insetos submetidos a uma dieta artificial contendo inibidores e estudo de inibição com proteinases de seus intestinos revelaram seu potencial em interferir no desenvolvimento larval do inseto (FRANCO *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2004).

A Figura 1 mostra o diagrama geral do canal alimentar de um inseto lepidóptero proposto por TERRA & FERREIRA (1994). Dentro da cavidade bucal, os insetos fitófagos, produzem secreções salivares que são misturadas aos tecidos da planta que foram sugados. Estas secreções ajudam a umedecer o bolo alimentar, facilitando sua passagem através do esôfago (CHAPMAN, 1985). Em seguida, o material ingerido passa através do intestino anterior, chegando ao intestino médio, local onde ocorre a digestão e absorção dos nutrientes, e onde os níveis de proteinases são muito altos (TERRA, 1990). Na maioria dos insetos, esse órgão se encontra revestido por uma membrana quitinosa, conhecida como membrana peritrófica, formada de proteínas, glicoproteínas e microfibrilas de quitina, que separa o conteúdo presente no lúmen, em espaço endoperitrófico e espaço ectoperitrófico. Enfim, o intestino posterior, que forma o material fecal dos insetos.

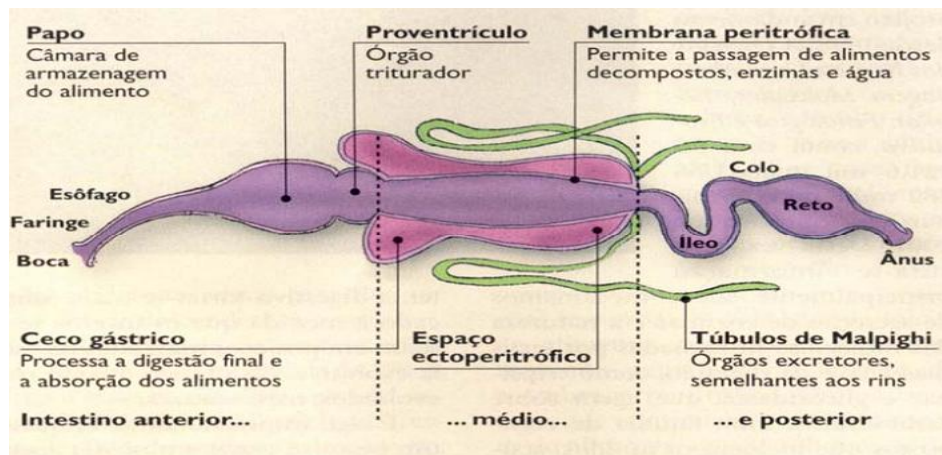


Figura 1. Diagrama geral de intestino de inseto lepidóptero (adaptado de TERRA & FERREIRA, 1994).

A membrana peritrófica possui diversas funções, dentre elas: a proteção contra danos mecânicos atuando como uma barreira seletiva e no mecanismo de conservação das enzimas (PETERS 1992; LEHANE, 1997; TERRA 2001). Uma das propriedades importantes na compartimentalização das enzimas é o seu envolvimento na digestão inicial, que ocorre no espaço endoperitrófico o qual é envolvido pela membrana peritrófica (TERRA & FERREIRA, 1994). A importância dessa membrana deve ser evidenciada, pois quando afetada, pode interferir no processo de digestão e absorção de nutrientes, causando riscos ao desenvolvimento do inseto (SHEWRY & LUCAS, 1997; HABIBI *et al.*, 2000; PAES *et al.*, 2000).

1.4. Inseto-praga

O interesse pelo controle biotecnológico de inseto-praga tem aumentado consideravelmente, em resposta aos problemas encontrados pelo uso abundante de agrotóxicos na produção agrícola (BORÉM, 2004).

Insetos fitófagos são pragas capazes de provocar danos na agricultura de importância econômica. Insetos pertencentes às ordens Coleoptera e Lepidoptera são considerados os principais responsáveis por prejuízos no campo, sendo essa última ordem formada por mariposas e borboletas, as quais os danos são causados pelas larvas, que possuem aparato mastigador (VOLPICELLA *et al.*, 2003).

Uma das espécies de lepidópteros conhecida pela variedade de culturas que atacam causando danos, é a *Anagasta kuehniella*, praga da farinha, que ataca grãos armazenados, sendo considerada uma praga grave em moinhos de farinha. Esta pequena mariposa também se alimenta de produtos vegetais armazenados e secos: nozes, frutas, chocolates e bolos (COELHO *et al.*, 2007).

1.5. Semente

Inga laurina (SW.) Willd. é uma árvore, 10- 20m de altura, pertencente à subfamília Fabaceae do Leguminoseae. Conhecido como ingá branco ou ingá de macaco, sendo plantada como uma árvore de sombra. É uma planta tropical, com uma ampla distribuição ocorrendo desde a Amazônia até o Nordeste e do Sul até o Paraná (LORENZI, 2002). O fruto de *I. laurina* pode ser consumido tanto por humanos como pelos pássaros, tendo estes, a função de dispersor de sementes (MACEDO *et al.*, 2007).

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo revelaram a presença de inibidores de proteinase em extratos brutos dessa semente, e conseqüentemente sua purificação e propriedades físico-químicas (MACEDO *et al.*, 2007). Diante disso, pretendemos nesse projeto avaliar o mecanismo de ação de um inibidor de proteinase de sementes de *Inga laurina* (ILTI) sobre o desenvolvimento de *A. kuehniella*.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLETI, A.P.A., 2003. Isolamento, caracterização físico-química e estudo da atividade inseticida e fungicida da lectina de sementes de *Pouteria torta* (MART.) RADLK. Tese de Mestrado. Unicamp-Campinas, p. 117.

BORÉM, A., 2004. Biotecnologia e Meio Ambiente. Editora: Folha de Viçosa, p.425.

BHATTACHARYYA, A., MAZUMAR, S., LEIGHTON, S.M., BABU, C.R., 2006. A kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization and kinetic properties. *Phytochemistry*, 232 – 241.

COELHO, M.B., MARANGONI, S., MACEDO, M.L.R., 2007. Insecticidal action of *Annona coriácea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, p. 406- 414.

CHAPMAN, R.F., 1985. Structure of digestive system, In: Kerkut, G.A. (Ed.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, vol. 4, New York: Pergamon Press, p. 165- 211.

FALCO, M.C., MARBACH, P.A.S., POMPERMAYER, P., LOPES, F.C.C., SILVA-FILHO, M.C., 2001. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. *Genetics and Molecular Biology*, p. 113- 122.

FRANCO, O.L., SANTOS, R.C., BATISTA, J.A.N., MENDES, A.C.M., ARAÚJO, M.A.M., MONERRAT, R.G., GROSSI-DE-SÁ, M.F., FREITAS, S.M., 2003. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. *Phytochemistry*, p. 343- 349.

GARCIA, V.A., FREIRE, M.G.M., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., MACEDO, M.L.R., 2004. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. *The Protein Journal*, p. 343- 350.

HABIBI, J., BACKUS, E.A., HUESING, J.E., 2000. Effects of phytohemagglutinin (PHA) on structure of midgut epithelial cells and localization of its binding sites in western tarnished plant bug, *Lygus hesperus* Knight. *Journal of Insect Physiology*, p. 611- 619.

HAQ, S.K., ATIF, S.M., KHAN, R.H., 2004. Protein protease inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, p. 145- 159.

KIM, J.K., MULLIN, C.A., 2003. Impact of cysteine proteinase inhibition in midgut fluid and oral secretion on fecundity and pollen consumption of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, p. 139– 154.

KOIWA, H., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M., 1997. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*, p. 379- 384.

KONAREV, A.V., LOVEGROVE, A., SHEWRY, P.R., 2008. Serine proteinase inhibitors in seeds of *Cycas siamensis* and other gymnosperms. *Phytochemistry*, p. 2482- 2489.

LAWRENCE, P.K., KOUNDAL, K.R., 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, p. 93- 109.

LEHANE, M.J., 1997. Peritrophic matrix structure and function. *Annual Review of Entomology*, p. 525- 550.

LINGARAJU, M.H., GOWDA, L.R., 2008. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: another member with single disulfide bridge. *Biochimica et Biophysica Acta*, p. 850– 855.

LORENZI, H., 2002. Árvores Brasileiras – Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil. 2ªed. Editora Plantarum. Nova Odessa – SP, p. 368.

MACEDO, M.L.R., MATOS, D.G.G., MACHADO, O.L.T., MARANGONI, S., NOVELLO, J.C., 2000. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochemistry*, p. 553- 558.

MACEDO, M.L.R., FREIRE, M.G.M., CABRINI, E.C., TOYAMA, M.H., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., 2003. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochimica et Biophysical Acta*, p. 170– 182.

MACEDO, M.L.R., FREIRE, M.G.M., SILVA, M.B.R., COELHO, L.C.B.B., 2006. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, p.486– 498.

MACEDO, M.L.R., GARCIA, V.A., FREIRE, M.G.M., RICHARDSON, M., 2007. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*, p. 1104– 1111.

MACEDO, M.L.R., DURIGAN, R.A., SILVA, D.S., MARANGONI, S., FREIRE, M.G.M., PARRA, J.R.P., 2010. *Adenantha pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, p. 213– 231.

MACEDO, M.L.R., OLIVEIRA, C.F.R., 2011. Emprego de inibidores de protease vegetais como ferramenta biotecnológica alternativa no controle de pragas. Revista Perspectiva Online- Ciências Biológicas e da Saúde.

NEURATH, H., 1984. Evolution of proteolytic enzymes. Science. p. 350- 357.

OLIVEIRA, A.S., MIGLIOLO, L., AQUINO, R.O., RIBEIRO, J.K., MACEDO, L.L., ANDRADE, L.B., BEMQUERER, M.P., SANTOS, E.A., KIYOTA, S., De Sales, M.P., 2007. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pest. Plant Physiology and Biochemistry, p. 858– 865.

PAES, N.S., GERHARDT, I.R., COUTINHO, M.V., YOKOYAMA, M., SANTANA, E., HARRIS, N., CHRISPEELS, M.J., GROSSI-DE-SÁ, M.F., 2000. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immune localization of the arcelin protein. Journal of Insect Physiology, p. 393-402.

PANDO, S.C., OLIVA, M.L.V., SAMPAIO, C.A.M., DI CIERO, L., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., 2001. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. Phytochemistry, p. 625- 631.

PEREIRA, R.A., BATISTA, J.A.N., SILVA, M.C.M., OLIVEIRA NETO, O.B., FIGUEIRA, E.L.Z., JIMÉNEZ, A.V., GROSSI-DE-SÁ, M.F., 2006. An α - amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). Phytochemistry, p. 2009- 2016.

PETERS, W., 1992. Peritrophic membranes. In Zoophysiology. Vol. 30, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

RAMOS, V.S., FREIRE, M.G.M., PARRA, J.R.P., MACEDO, M.L.R., 2009. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval

development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology. A, Molecular & Integrative Physiology*, p. 255- 261.

RYAN, C.A., 1990. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, p. 425- 449.

SANTOS, I.S., DA CUNHA, M., MACHADO, O.L.T., GOMES, V.M., 2004. A chitinase from *Adenanthera pavonina* L. seeds: purification, characterization and immunolocalization. *Plant Science*, p. 1203-1210.

SHARMA, H.C., SHARMA, K.K., SEETHARAMA, N., ORTIZ, R., 2000. Prospects for using transgenic resistance to insects in crop improvement. *Electronic Journal of Biotechnology*, p. 76- 95.

SHEWRY, P.R., LUCAS, J.A., 1997. Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. In: *Advances in Botanical Research*, p. 135- 192.

TERRA, W.R., 1990. Evolution of digestive systems of insects. *Annual Review of Entomology*, p. 181- 200.

TERRA, W.R., FERREIRA, C., 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology*, p. 1- 62.

TERRA, W.R., 2001. The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, p. 47- 61.

VOLPICELLA, M., CECI, L.R., CORDEWENER, J., AMERICA, T., GALLERANI, R., BODE, W., JONGSMA, M.A., BEEKWILDER, J., 2003. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea* adapted to proteinase inhibitors. *European Journal of Biochemistry*, p. 10- 19.

ARTIGO

Mecanismo de ação de um inibidor de proteinase sobre o desenvolvimento de *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae)

Karina Justo Custódio Dias ^a, Maria Ligia Rodrigues Macedo ^{a,*}

^a Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brazil.

* Corresponding author at: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas, Cidade Universitária S/N, CP: 549, CEP 79070-900, Campo Grande, MS, Brazil, Tel.; +55 67 3345 7401; fax: 55 67 3345 7400.

E-mail address: bioplant@terra.com.br (M.L.R. Macedo)

Normas para publicação

Comparative Biochemistry and Physiology, Part B

Preparação do manuscrito

Formato do manuscrito.

O manuscrito deve ser preparado usando um software de processamento de texto aceitável, em inglês americano. O texto deve ser em formato de coluna única. A maioria dos códigos de formatação será removida e substituída no processamento do artigo. Utilizar apenas uma grade para cada tabela individual e não uma grade para cada linha. Incluir numeração nas tabelas e figuras. O manuscrito deve ser estruturado na seguinte sequência:

Título e Autores

Resumo e Palavras- Chave

Introdução

Material e Métodos

Resultados

Discussão

Conclusões

Abreviações

Agradecimentos

Referências

Legendas das Figuras

Tabelas

Título e Autores

Título. O título deve ser conciso e informativo. Títulos são freqüentemente utilizados em sistemas de recuperação de informação. Evitar abreviações e fórmulas.

Autores. Consiste na designação de autoria do manuscrito e suas correspondências. Dar o endereço de todas as instituições onde o trabalho foi conduzido e identificar a filiação de cada autor. Fornecer o endereço postal completo de cada afiliação, incluindo o nome do país e, se possível, o endereço de e-mail de cada autor. Se o endereço atualizado do autor for diferente, incluir em uma nota de rodapé na página do título.

- **Autor correspondente.** Claramente indicar quem irá lidar com a correspondência em todas as fases de arbitragem e publicação, também pós-publicação. Certificar-se que os números de telefone (com código de país e de área) são fornecidos, além do endereço de e-mail e o endereço postal completo. Detalhes de contato deverão ser mantidos até à data pelo autor correspondente.

Resumo e Palavras-chave

Resumo. O resumo deve ser claro e conciso, e conter 200 palavras em um único parágrafo. O resumo deve indicar brevemente o objetivo da pesquisa, os principais resultados e conclusões.

Palavras-chave. Usar palavras chaves significantes para ajudar o leitor a encontrá-las na literatura. Podem ser utilizadas até oito palavras-chave, as quais podem ou não aparecer no título. Devem ser listadas em ordem alfabética após o resumo.

Introdução

Declarar os objetivos do trabalho e fornecer uma base adequada, evitando uma pesquisa bibliográfica detalhada ou resumo dos resultados.

Material e Métodos

Fornecer detalhes suficientes para permitir que o trabalho possa ser reproduzido. Métodos já publicados devem ser indicados por uma referência: apenas modificações relevantes devem ser descritas.

Resultados

Os resultados devem ser claros e concisos.

Discussão

Deve explorar a relevância dos resultados do trabalho, e não repeti-los. Os resultados combinados e seção de discussão muitas vezes é apropriado. Evite citações extensas e discussão de literatura.

Conclusões

As principais conclusões do estudo podem ser apresentadas em uma seção curta, que pode estar sozinha ou formar uma subseção de uma discussão ou resultados e discussão.

Abreviações

Abreviaturas que não são padrão neste campo podem ser colocadas em nota de rodapés, sobre a primeira página do artigo. Tais abreviaturas que são inevitáveis no resumo devem ser definidas na sua primeira aparição, bem como na nota de rodapé. Garantir a consistência das abreviaturas longo do artigo.

Nomes das revistas devem ser abreviados de acordo com abreviaturas do Index Medicus Journal: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html> ;

Lista de abreviaturas palavras do título: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php> ;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/content/references/corejourna>

Agradecimentos

Agrupar reconhecimentos em uma seção separada, no final do artigo, antes das referências. Listar aqui aqueles indivíduos que forneceram ajuda durante a investigação (por exemplo, oferecendo ajuda linguagem, escrita assistência ou prova de ler o artigo, etc.)

Referências

Certificar-se que todas as referências citadas no texto também estão presentes na lista de referência (e vice-versa). Todas as referências citadas no resumo devem ser dadas na íntegra. Resultados não publicados e comunicações pessoais não são recomendados na lista de referência, mas pode ser mencionada no texto. Se essas referências estão incluídas na lista de referências devem seguir o estilo de referência padrão da revista e deve incluir uma substituição da data de publicação, quer com "resultados não publicados" ou "comunicação pessoal". Citação de uma referência como "no prelo" implica que o item foi aceito para publicação.

Referências da Web

No mínimo, a URL completa deve ser dada ea data em que a referência foi acessado pela última vez. Qualquer informação adicional, se conhecido (DOI, nomes de autores, datas de referência a uma publicação de fonte, etc), também deve ser dado. Referências da Web podem ser listada separadamente (por exemplo, depois que a lista de referência) sob uma posição diferente, se desejado, ou pode ser incluído na lista de referência.

Referências em uma edição especial

Certifique-se de que "esta questão" as palavras são adicionados a quaisquer referências na lista (e quaisquer citações no texto) para outros artigos da mesma edição especial.

Software de gerenciamento de referência

Esta revista tem modelos padrão disponíveis na chave de referência de gerenciamento de pacotes EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) e Gerente de Referência (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>) . Usando plug-ins para processamento de texto pacotes, os autores precisarão selecionar o modelo apropriado revista ao preparar seu artigo ea lista de referências e citações a estes serão formatados de acordo com o estilo da revista, que é descrito abaixo.

1. Todas as publicações citadas no texto devem ser apresentadas em ordem alfabética em uma lista seguindo o texto do manuscrito.
2. No texto referem-se o nome do autor e o ano de publicação.
3. Se a referência é feita no texto a uma publicação escrita por mais de dois autores o nome do primeiro autor deve ser usado seguido de "et al.". Neste nomes da lista dos primeiros autores e de todos os co-autores devem ser mencionados.
4. Referências citadas juntas no texto devem ser organizadas em ordem cronológica.
5. Listas de referências devem ser organizadas em ordem alfabética no nome dos autores e cronologicamente por autor. Os nomes de todos os autores devem ser incluídos. Não utilizar et al. Publicações pela mesmo autor (es) no mesmo ano, devem ser listados como 2000a, 2000b, etc.

As referências tipicamente seguem o estilo dado a seguir:

Axelsson, M., Farrell, AP, 1993. Fluxo sanguíneo coronariano in vivo no salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*). *Sou. J. Physiol.* 264, R963 -. 971

Hiramatsu, N., Cheek, AO, Sullivan, CV, Matsubara, T., Hara, A., 2005. Vitelogênese e desregulação endócrina. Em: Mommsen, TP, Lua, TW (Eds.), *Bioquímica e Biologia Molecular de Peixes*, vol. 6. *Environmental Toxicology*, Elsevier, Amsterdam, pp 431-471.

Lindsley, JE, Rutter, J., 2004. Detecção de nutrientes e decisões metabólicas. *Comp. Biochem. Physiol. B* 139, 543-559.

Moyle, PB, Cech, JJ, 2004. *Peixes. Uma introdução à ictiologia*. 5^a ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.

Legendas das Figuras

Assegurar que cada ilustração tem uma legenda. Fornecer legendas separadas, que não estejam ligadas às figuras. A legenda deve compreender um título breve (não na própria figura) e a descrição da figura. Manter o texto nas próprias ilustrações para um mínimo, mas explicar todos os símbolos e abreviações utilizadas.

Tabelas

As tabelas devem ser enumeradas consecutivamente de acordo com a sua aparição no texto. Colocar notas de rodapé nas tabelas abaixo do corpo da tabela e indicar-lhes sobrescritos letras minúsculas. Evitar regras verticais.

Resumo

A espécie cosmopolita *Anagasta kuehniella* é uma praga polífaga que se alimenta de uma grande variedade de produtos armazenados. Os inibidores de proteinases participam dos processos de defesa da planta contra insetos e patógenos. Neste estudo, um inibidor de tripsina (ILTI) foi purificado a partir das sementes de *Inga laurina* (Leguminosae) e foi testado para o efeito regulador do inseto. Ensaios feitos com dietas em diferentes concentrações de inibidor mostraram que ILTI afetou o crescimento, peso médio e sobrevivência larval. *Anagasta kuehniella* obteve melhor desenvolvimento no período de quarto instar, quando comparado a demais instares e utilizando o inibidor com concentração de 0,1%. Os resultados dos experimentos nutricionais realizados com *A. kuehniella* mostraram uma redução na eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido de alimentos, e um aumento na digestibilidade aproximada e custo metabólico. Experimentos utilizando dieta mostraram que ILTI 0,1%, incorporado à dieta artificial, diminui a taxa de consumo e produção fecal de *A. kuehniella*. A atividade da tripsina nas larvas alimentadas com ILTI foi sensível ao inibidor, indicando que nenhuma nova protease resistente ao inibidor foi induzida em larvas alimentadas. Através do gel SDS-PAGE, foi possível visualizar que o ILTI não foi digerido pelas enzimas do intestino médio de *A. kuehniella*. Este resultado sugere que ILTI tem propriedades inseticidas contra este inseto e pode, portanto, ser uma proteína utilizada como ferramenta no combate a pragas.

Palavras- chave: *Anagasta kuehniella*; *Inga laurina*; Inibidor de proteinase; Interação inseto planta; Leguminosae.

Abstract

Cosmopolitan *Anagasta kuehniella* species is a polyphagous pest that feeds on a wide range of stored products. Proteinase inhibitors take part in defense plant processes against insects and pathogens. It was purified in this study, a trypsin inhibitor (ILTI) from *Inga laurina* (Leguminosae) seeds and tested for insect regulating effect. Assays carried out in diets with different inhibitor concentrations revealed ILTI affected growth, survival and average larval weight. *Anagasta kuehniella* got better growth throughout the fourth instar when confronted with other instars and using concentration 0.1% inhibitor. Nutritional outcomes revealed an efficiency conversion decrease of ingested and digested food, and a metabolic cost and approximate digestibility increase. Diet experiments exhibited that ILTI 0.1% incorporated into artificial diet decreases the consumption rate and fecal *A. kuehniella* output. Trypsin activity in ILTI-fed larvae was sensitive to inhibitor, representing no new resistant protease to inhibitor was induced in fed larvae. Through gel SDS-PAGE was feasible to conclude ILTI was not digested by midgut *A. kuehniella* enzymes. This outcome suggests ILTI has insecticidal properties against this insect, and thus, may be a protein used as tool for pests combat.

Keyworlds: *Anagasta kuehniella*; *Inga laurina*; proteinase inhibitor; plant insect interaction; Leguminosae.

1. Introdução

Com o aumento da população mundial, ocorre a necessidade do aumento da produção de alimentos, através de novas áreas de cultivo, e a ampliação das produções agrícolas. Porém, isso irá originar a propagação de insetos pragas e o aumento do custo de produção (Silva et al., 2012). A presença de insetos-praga nas produções agrícolas gera sérios problemas, uma vez que esses causam perdas de safra de 10% a 20% para as principais culturas (Ferry et al., 2006).

Muitos insetos Lepidopteras são considerados pragas capazes de causar danos econômicos na agricultura (Volpicella et al., 2003). *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), traça da farinha, é um dos insetos pragas de grãos, de ampla disseminação mundial, que ataca produtos armazenados como arroz, milho e trigo. Porém, tem preferência maior para farinhas e farelos, deixando-os impróprios para o consumo (Gallo et al., 2002). É predominante em zona de clima temperado, sendo nativa da Europa (Boleti 2003; Ramos et al., 2009).

Nas plantas, os inibidores de proteinases (IP) podem ser encontrados em diferentes órgãos, como nas sementes (Garcia et al., 2004), podendo estar envolvidos no mecanismo de defesa da planta contra pragas e doenças (Ryan 1990; Haq et al., 2004; Macedo et al., 2007). Os IP também podem estar relacionados ao processo de germinação e dormência das sementes (Baek et al., 1994; Tiffin & Gaut, 2001).

Estudos relatam que ao incorporar inibidores de proteinases serínicas (IPs) em dietas artificiais de lepidopteros, é observada uma variedade de efeitos deletérios, incluindo fecundidade reduzida, diminuição de peso e aumento da mortalidade (Leplé et al., 1995; Yeh et al., 1997; Lecardonnell et al., 1999; Macedo et al., 2010). Essa capacidade dos IPs interferir no desenvolvimento dos insetos, se baseia na inibição das proteinases digestivas encontradas em insetos fitófagos (Volpicella et al., 2003) incluindo *A. kuehniella*. As proteínas ingeridas na digestão devem ser absorvidas na forma de aminoácidos, sendo em seguida hidrolisados por enzimas proteolíticas, presentes no intestino médio dos insetos, como a tripsina e a quimiotripsina (Lemos et al., 2000).

Apesar da procura crescente por novos IPs com diferentes atividades biológicas, a escolha do modelo em estudo tem que levar em consideração a fisiologia digestiva,

pois, o efeito inseticida de IPs é resultado da inibição das enzimas do intestino médio dos insetos (Schuler et al., 1998). Para determinar a eficácia de um inibidor contra um determinado inseto, deve ser analisado o seu nível de expressão na planta, a capacidade do inseto alvo em superar suas ingestões, e a atividade do inibidor em relação às proteinases do inseto (De Leo et al., 2001). Portanto, é necessário compreender melhor o modo de ação dos IPs sobre os insetos e a sua interação no processo planta–inseto.

O presente trabalho apresenta a utilização do ILTI como um mecanismo de defesa para as culturas de grãos contra o ataque de *A. kuehniella*. Para avaliar a eficácia do ILTI contra esse inseto praga de grande importância econômica, foram realizados bioensaios incorporando ILTI nas dietas artificiais. Parâmetros nutricionais, fisiológicos e de sobrevivência, foram analisados, e através dos ensaios *in vitro*, foi possível determinar os efeitos do ILTI sobre o desenvolvimento de *A. kuehniella* e o efeito do inibidor sobre a atividade trípica de proteinases do intestino médio desse inseto.

2. Materiais e métodos

2.1. Materiais

As sementes de *Inga laurina* (Willd) (Fabaceae- Leguminosae) foram coletadas localmente (no Campus da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul- UFMS, Campo Grande, MS, Brasil) e identificadas pela Prof. Dra. Maria José Neto, da UFMS- Três Lagoas (UFMS- Departamento de Ciências Naturais; Campus de Três Lagoas, Brasil). As sementes foram lavadas e secas a temperatura ambiente antes de serem acondicionadas em freezer a -20°C. Albumina Sérica Bovina (BSA), tripsina pancreática bovina, BAPNA (N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide), SAAPFpNA (N-succinil-Ala-Ala-pro-Fenil-p-nitroanilina), e os reagentes para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Suportes de cromatografias foram adquiridos da GE Healthcare. Todos os outros produtos químicos e reagentes usados foram de grau analítico.

2.2. Insetos

A cultura da traça de farinha de *A. kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) foi mantida pelo Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB), da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brasil. Os insetos foram mantidos à temperatura de $28 \pm 2^\circ \text{C}$ e com umidade relativa de 65- 75% (16 h de fotofase) e mantidos com uma dieta padrão constituída de farinha e gérmen de trigo integrais, na proporção de 3:2 (p/p).

2.3. Isolamento do inibidor de tripsina de *I. laurina* (ILTI)

O isolamento e a purificação de ILTI foram preparados, de acordo com Macedo et al. (2011) com algumas modificações no processo de purificação. A fração liofilizada (50mg) foi dissolvida em 1,5 ml de tampão Tris- HCl 0,05 M, pH 8,0. O material foi sonicado por 5 min, clarificado por centrifugação a 10.000 rpm por 10 min e aplicada em Coluna DEAE- Sepharose (3 x 12cm), equilibrada previamente com o mesmo tampão. Um gradiente salino de NaCl (0-1 M) no mesmo tampão, foi utilizado para eluir as proteínas adsorvidas, sendo coletadas frações de 3 ml num fluxo de 30ml/h. A detecção das proteínas foi feita a 280nm.

2.4. Obtenção das enzimas do fluido intestinal do inseto

As larvas foram imobilizadas e dissecadas em gelo. Os intestinos médios foram removidos cirurgicamente, usando pinça e colocados em solução iso-osmótica de solução salina. Os intestinos médio de *A. kuehniella* foram subsequentemente homogeneizadas no potter em 150 mM de NaCl e centrifugado a 10.000 xg durante 20 min a 4°C , e os sobrenadantes foram armazenados a -20°C até à sua utilização em ensaios enzimáticos.

2.5. Quantificação de proteína

O teor de proteína foi determinado por coloração com Coomassie blue, utilizando o método de **Bradford (1976)**, utilizando BSA (1mg/ml) como padrão.

2.6. Ensaio de atividade inibitória

Ensaio de atividade de inibição foram determinados através da medição da atividade hidrolítica residual da tripsina e quimiotripsina bovina para os substratos BApNA e SAAPFpNA, respectivamente. As amostras do intestino médio foram incubadas com concentrações crescentes de ILTI, durante 10 min a 37° C, em tampão Tris-HCl (50 mM, pH8,0). Após 15 min de incubação, a reação foi parada com a adição de 30% (v/v) de ácido acético. A absorbância foi feita a 405 nm. Os ensaios foram todos realizados em triplicata. Os controles de substrato e enzima foram realizados, para assegurar a validade de leituras de absorbância da amostra.

2.7. Parâmetros Nutricionais

Os números dos parâmetros nutricionais foram comparados entre as larvas de terceiro, quarto e quinto instar ambos alimentados com ILTI ou dieta controle. Foram separados as fezes, larvas e o resto da dieta, através de um estereoscópio e enfim calculado os parâmetros nutricionais da digestão, consumo e utilização de alimento, como descrito por **Waldbauer (1968)** e **Farrar et al. (1989)**. O índice nutricional, denominada eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI), eficiência de conversão do alimento digerido (ECD), digestibilidade aproximada (AD) e custo metabólico (CM) foram calculadas como se segue: $ECI (\Delta B / I) \times 100$; $ECD [\Delta B / (I - F)] \times 100$; $AD [(I - F) / I] \times 100$ E $CM 100 - ECD$ em que I = peso de alimento consumido, ΔB = alteração no peso corporal, e F = peso das fezes produzidas durante o período de alimentação.

2.8. Efeito de ILTI na atividade proteolítica endógena

O efeito de ILTI na atividade proteolítica foi determinado para verificar a sensibilidade das larvas ao inibidor, após contato com o mesmo nas dietas artificiais e inferir se houve uma adaptação do inseto. Esse ensaio foi realizado utilizando as enzimas tripsina e quimiotripsina do extrato do intestino médio de *A. kuehniella*, tanto alimentados com ILTI como o controle alimentado, utilizando BApNA e SAAPFpNA como substrato, respectivamente. ILTI (0 - 1,0 µg) foi incubado com as enzimas do intestino médio (2 µg) a 37° C por 10 min antes da adição do substrato. Após a adição do substrato, a reação procedeu durante 15 min a 37° C para o BApNA e 5 min para o SAAPFpNA. Em seguida, a reação foi parada com a adição de 30% (v/v) de ácido acético.

2.9. Digestão de ILTI e eletroforese em gel

Os intestinos médios de larvas de quarto instar foram dissecados, extraídos em 1 mL de 0,1 M de Tris, pH 8,0, e processada como descrito anteriormente na seção 2.4. ILTI foi incubado com este homogeneizado em tampão Tris (concentração final de 1 mg/ mL). A digestão foi realizada durante 0, 3h, 6h, 12h e 24h, a 30° C e foi interrompida por imersão dos tubos em água fervente durante 2 min. As relativas massas moleculares produto da digestão foram estimadas por SDS-PAGE usando marcadores de proteína com massa molecular conhecida.

2.10. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12,5% como descrito por **Laemmli (1970)**. As amostras e os marcadores de massa molecular foram dissolvidos em tampão amostra (Tris-HCl, 100 mM, pH 6,8; 20% de glicerol; 4% de SDS; 0,2% de azul de bromofenol). As proteínas utilizadas como marcadores moleculares foram: fosforilase (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa), e α -

lactoalbumina (14 kDa).As proteínas foram detectadas por coloração com 0,1% de azul brilhante de Coomassie R-250.

2.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média \pm D.S., onde apropriado. Os dados sobre mortalidade inicial, duração do período larval, peso médio larval e parâmetros nutricionais foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) (Modelos Lineares Gerais sobre o procedimento GLM). Quando encontrada diferença entre os tratamentos, o teste de Tukey foi usado para determinar o nível de significância ($p < 0.05$).

3. Resultados

3.1. Efeito do ILTI sobre tripsina e quimiotripsina de *A. kuehniella* in vitro

A atividade inibitória contra tripsina e quimiotripsina de *A. kuehniella* foram mensuradas em concentrações crescentes do ILTI em larvas de quarto instar e revelou uma maior inibição para tripsina. Este perfil é característico de alguns inibidores do tipo Kunitz, no qual ocorre a inibição contra tripsina e quimiotripsina, sendo esta última enzima, inibida em menor grau. A atividade residual da tripsina e quimiotripsina podem ser observadas através da quantidade de substrato hidrolizado (**Fig. 1**). ILTI apresentou uma atividade inibitória contra tripsina cerca de 76% com 0,5 ug de proteína, porém para quimiotripsina apresentou uma inibição fraca.

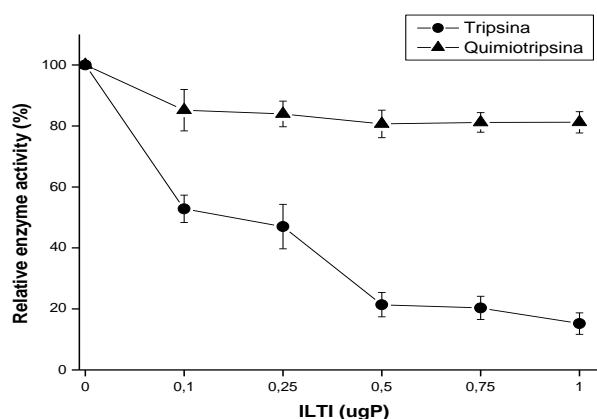


Fig. 1. Atividade da tripsina e quimiotripsina em concentrações crescentes de ILTI. Utilizou-se BApNA e SAAPFpNA como substratos para tripsina e quimiotripsina, respectivamente. Os pontos são a média \pm D.S. de três ensaios.

3.2. Efeito de diferentes concentrações de ILTI sobre o desenvolvimento larval de *A. kuehniella*

Para examinar os efeitos do ILTI no desenvolvimento de *A. kuehniella*, larvas neonatas foram alimentadas com uma dieta artificial contendo ILTI em diferentes concentrações. O efeito do ILTI foi avaliado através da determinação do número e percentual de sobrevivência das larvas de quarto instar, alimentados em dietas contendo quantidades crescentes de ILTI. A sobrevivência e o peso médio larval são mostrados na **fig. 2A e 2B**, respectivamente. As larvas alimentadas com dietas contendo ILTI 0,1% e 0,5% sofreram aproximadamente 30% e 90% de mortalidade, respectivamente.

As larvas alimentadas com a dieta controle pesavam 7 mg, enquanto que uma dieta contendo 0,5% de ILTI produziu uma diminuição de aproximadamente 80% no peso (Fig. 2B). Em 0,1% ILTI provocou um decréscimo de apenas 46% no peso larval (Fig. 2B). O gráfico visualizado na **figura 2B** mostra a variação no tamanho das larvas controle comparada às larvas alimentadas nas diferentes concentrações.

Para os próximos ensaios biológicos a concentração de ILTI 0,1% foi definida como a concentração mais interessante por ainda apresentar um baixo índice de mortalidade e uma redução de aproximadamente 50% do peso, o que ainda possibilitaria um conteúdo suficiente de extrato de intestino médio, viabilizando os ensaios bioquímicos. Após, as medições de peso e sobrevivência foram tiradas em terceiro, quarto e quinto instar.

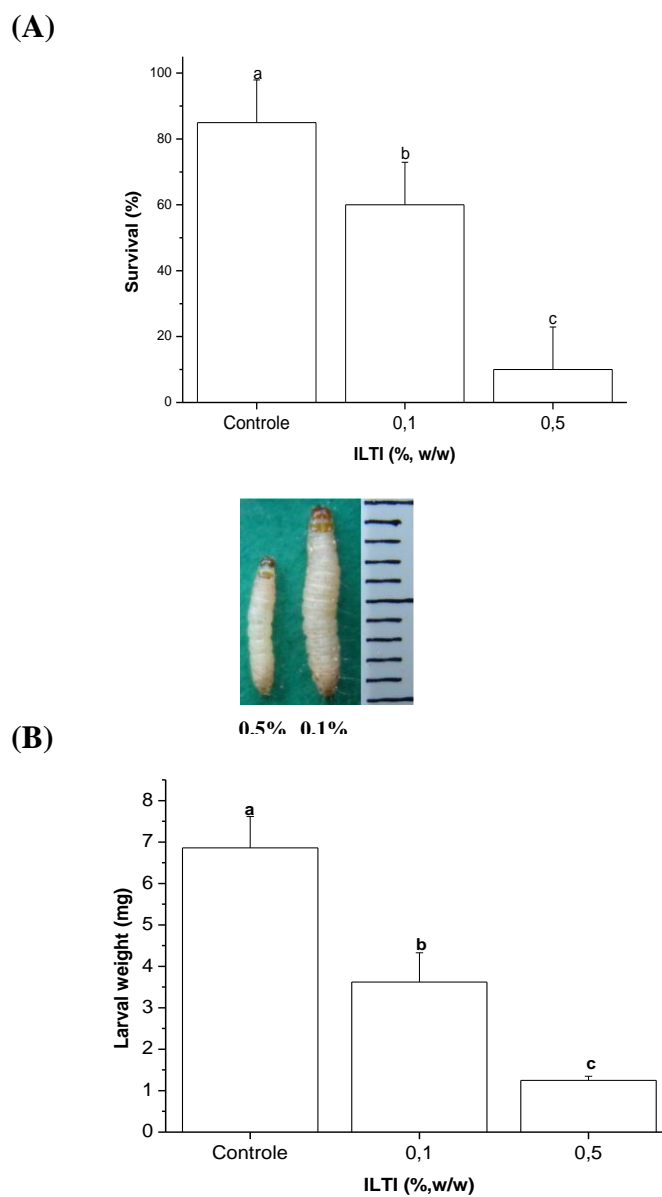


Fig. 2. Efeito do ILTI em larvas de *A. kuehniella* quando administrado em dietas artificiais. (A) Sobrevivência e (B) peso médio, utilizando bioensaios com dieta artificial. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

3.3. Efeito do ILTI 0,1% sobre o desenvolvimento de *A. kuehniella* no terceiro, quarto e quinto instar larval

O efeito do ILTI 0,1% sobre as larvas de *A. kuehniella* pode ser visualizados nas fig 3A e 3B. A mortalidade das larvas foram afetadas em todos os instares (Fig. 3A),

sendo a taxa de mortalidade do terceiro instar de 20%, do quarto instar 18% e do quinto instar 11%. Cada instar obteve diferenças significativas quando comparados com o mesmo grupo de cada instar (Anova, pós-teste de Tuckey, $p < 0,05$).

O peso médio larval também foram afetados em todos os instares. As larvas alimentadas com dieta contendo ILTI 0,1% apresentaram redução no peso larval em relação as larvas controle. (**Fig. 3B**). Em todos os instares as diferenças de peso foram consideradas significativas (Anova, pós-teste de Tuckey, $p < 0,05$), apresentando uma redução de peso de 64% no terceiro ínstar, 45% no quarto ínstar e 42% no quinto ínstar quando comparados com o controle.

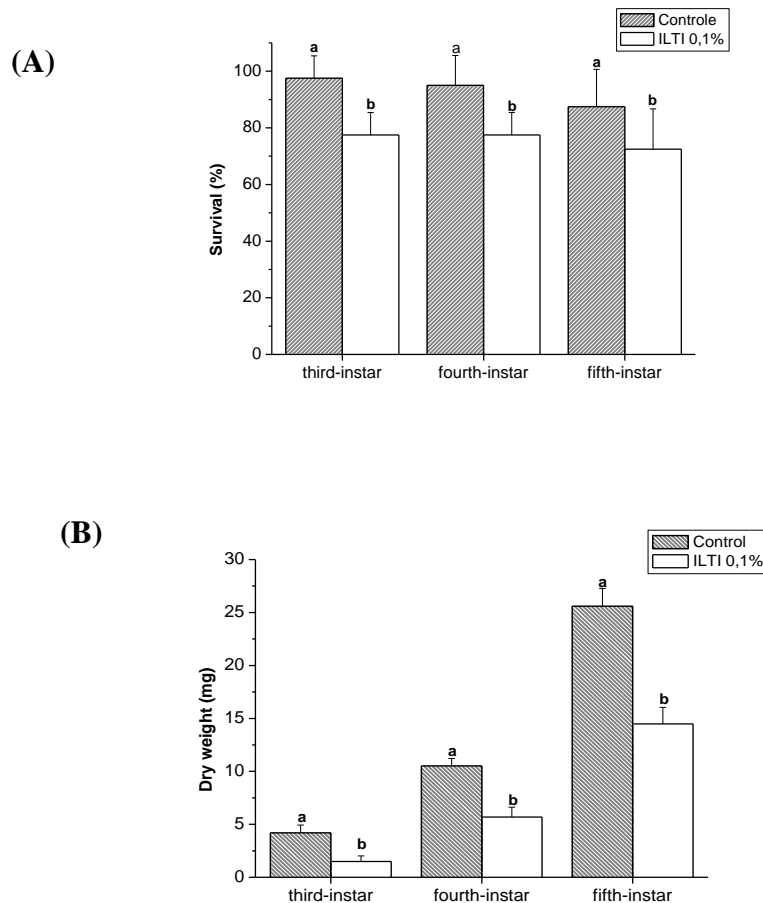


Fig. 3. Efeito da dieta artificial contendo 0,1% de ILTI no desenvolvimento larval de *A. kuehniella* no terceiro, quarto e quinto instar. (A) Sobrevivência larval (B) e Peso médio larval. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) dos valores quando comparados com o mesmo grupo de cada instar.

3.4. Índices Nutricionais

As análises nutricionais revelaram que ILTI apresentou um efeito tóxico quando ingerido pela larva. ILTI, quando incorporado em uma dieta artificial com 0,1% em diferentes instares, apresentaram uma diminuição na eficiência de conversão do alimento ingerido e digerido (ECI e ECD) e um aumento da digestibilidade aparente e do custo metabólico (AD e CM) para larvas de *A. kuehniella* quando comparados ao controle de cada instar (**Tab 1**).

Table 1

Eficiência de Conversão do alimento Ingerido (ECI), Eficiência da Conversão do alimento Digerido (ECD), Digestibilidade Aparente (AD) e Custo Metabólico (CM).

Nutritional índices (mean ±SE)	3° instar		4° instar		5° instar	
	Control	0,1 ILTI	Control	0,1 ILTI	Control	0,1 ILTI
ECI (%)	9,3±0,9a	7,7±0,6b	8,1±0,6a	7,2±0,9b	8,5±0,4c	6,9±0,4b
ECD (%)	11,2±1,1a	8,2±0,7b	10,7±0,7a	8,5±0,7b	12,0±0,5c	8,9±0,5b
AD (%)	83,0±1,0a	93,8±0,7b	87,5±0,9c	91,2±0,7b	77,7±1,6a	81,9±0,7d
CM (%)	88,8±1,0a	91,8±0,7b	89,0±0,6a	91,9±1,2b	88,0±0,5a	90,5±0,6b

Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo. Índices nutricionais de larvas em quarto instar de *A. kuehniella* com 0,1% ILTI-dieta controle e tratamento.

3.5. Quantidade de Proteína Total, Tripsina e Quimiotripsina no intestino de larvas alimentadas com ILTI 0,1%

A concentração de proteínas do intestino médio das larvas alimentadas com dieta controle apresentou um pico no quarto instar, diminuindo brevemente no quinto instar. Porém, em larvas alimentadas com ILTI, a quantidade de proteínas totais dobra no quinto instar comparadas as larvas controle (**Fig. 4**). O mesmo acontece com a atividade da tripsina em insetos alimentados com ILTI, havendo um aumento no quarto instar, chegando a mais de 100% de aumento no quinto instar, diferindo dos insetos controle, onde a atividade da tripsina decresce consideravelmente no quinto instar (**Fig. 5**).

Nas larvas alimentadas com dieta controle, a atividade quimiotrípica decresce no quarto instar, obtendo um pequeno aumento dessa atividade no quinto instar (**Fig. 6**). Em larvas alimentadas com ILTI, ambas as enzimas digestivas aumentaram sua atividade, obtendo a quantidade máxima dessa enzima no quinto instar.

Para os próximos ensaios biológicos foi escolhido o período de quarto instar, devido o mesmo, apresentar melhores resultados em relação a sobrevivência, peso médio larval e índice nutricional quando comparados aos outros instares.

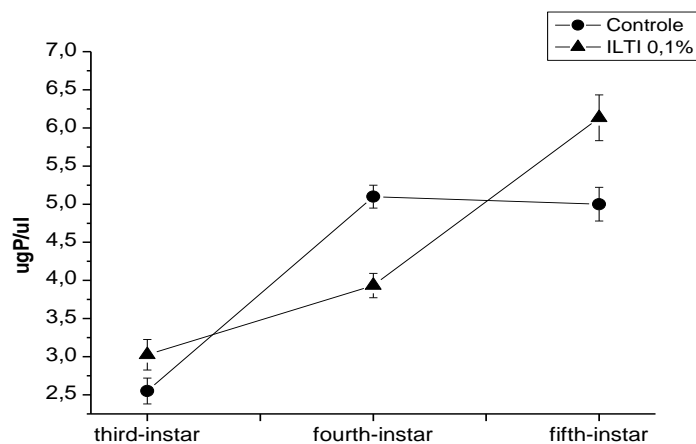


Fig. 4. Dosagem de proteínas de larvas de terceiro, quarto e quinto instar, alimentadas em dieta sem inibidor e com 0,1% de ILTI. As barras mostram a média \pm D.S; ($p < 0.05$) comparado ao controle. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

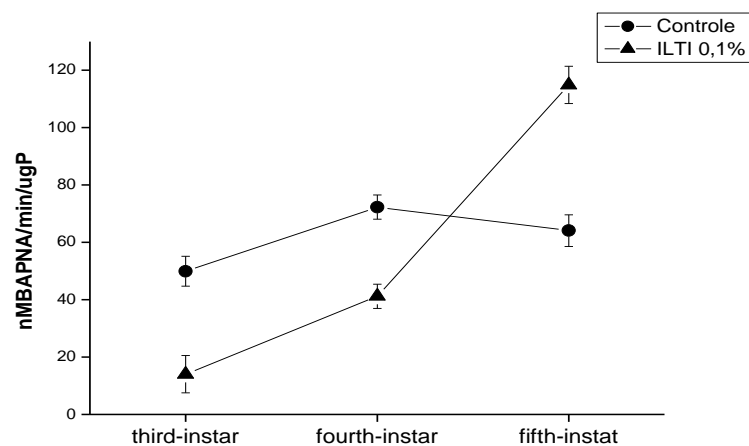


Fig. 5. Atividade da tripsina do conteúdo do intestino médio de larvas submetidas à dieta contendo ILTI 0,1%. As barras mostram a média \pm D.S; ($p < 0.05$) comparado ao controle. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

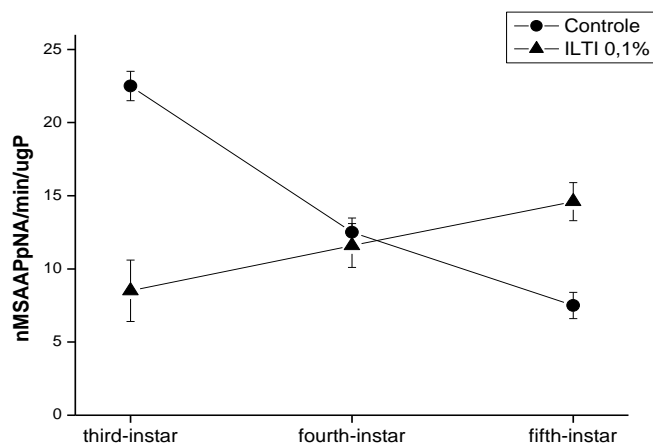


Fig. 6. Atividade da quimi tripsina do conteúdo do intestino médio de larvas submetidas à dieta contendo ILTI 0,1%. As barras mostram a média \pm D.S; ($p < 0.05$) comparado ao controle. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

3.6. Efeito de ILTI na análise do consumo e utilização de alimento das larvas de 4º instar de *Anagasta kuehniella*

Avaliando os efeitos do inibidor no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas (**Figs. 7 e 8**) verificou-se que a presença de ILTI 0,1% na dieta artificial das larvas de *A. kuehniella* em quarto instar, causou um efeito significativo no consumo da dieta de 16%, quando comparado ao consumo da dieta das larvas alimentadas com dieta controle. Já na produção fecal das larvas de *A. kuehniella*, ocorreu uma diminuição na produção de fezes de 65% quando comparada à produção de fezes das larvas do grupo controle. Podendo concluir que a ação do ILTI no trato intestinal do inseto pode interferir em sua digestão.

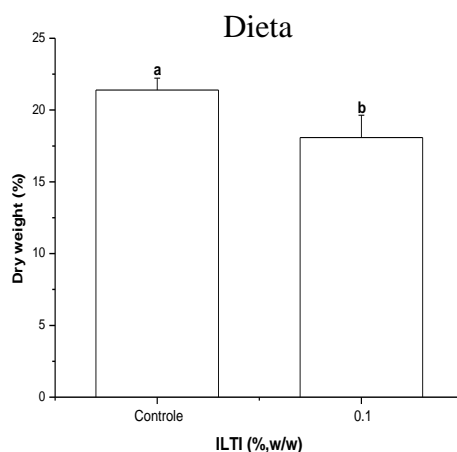


Fig. 7. Quantidade de dieta consumida pelas larvas de quarto instar de *A.kuehniella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo ILTI 0,1%. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa ($P<0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

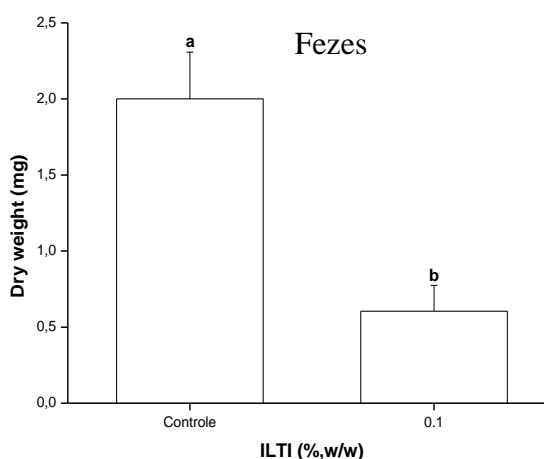


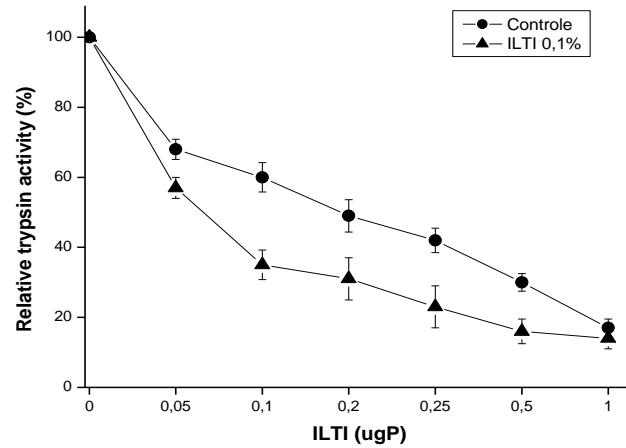
Fig. 8. Quantidade de fezes produzidas pelas larvas de quarto instar de *A. kuehniella* alimentadas com dieta controle e dieta artificial contendo ILTI 0,1%. Letras diferentes indicam que houve diferença significativa ($P<0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

3.7. Efeito do ILTI nas enzimas digestivas

A atividade proteolítica do extrato do intestino médio das larvas alimentadas previamente com o ILTI 0,1% e de larvas controle foi analisada após a incubação com concentrações crescentes de ILTI *in vitro*. Em ambos os grupos, controle e alimentado, a atividade proteolítica da tripsina foi proporcional à adição de ILTI (**Fig. 9A**). Na

atividade proteolítica da quimiotripsina, observou-se uma queda da atividade quando adicionado 0,05 µgP do ILTI, porém com o aumento das concentrações, a atividade se manteve estável (**Fig. 9B**).

(A)



(B)

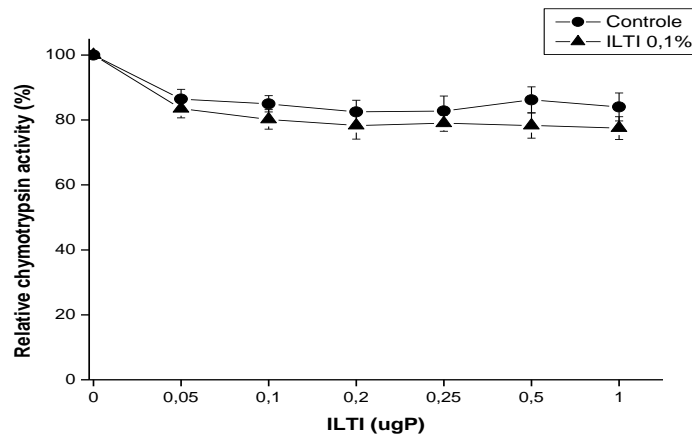


Fig. 9. Análise de sensibilidades a tripsina (A) e a quimiotripsina (B) de *A. kuehniellade* quarto instar incubadas com 0,1% ILTI e utilizando como substrato BAPNA e SAAPNA, respectivamente. Cada ponto representa a média de três ensaios realizados.

3.8. Digestão do ILTI e gel eletroforese

O conteúdo do intestino médio de larvas controle e de larvas alimentadas com 0,1% de ILTI foi incubado a 30°C por até 24 horas. Ambas as **figuras 10 (A e B)**, mostram a perda da atividade trípica até 24 horas à 30°C do intestino médio controle e

do intestino médio de larvas que se alimentaram de ILTI 0,1%, verificando –se que não houve diferença significativa entre eles.

A sensibilidade do ILTI à ação de enzimas proteolíticas básicas do intestino médio foi determinada pela incubação destas enzimas com o ILTI seguido de SDS-PAGE. Após 1 h de incubação com tripsina, ILTI foi hidrolisado (dados não mostrados). Porém, quando incubado com as enzimas de *A. kuehniella*, ILTI não foi hidrolisado após 6 h de incubação (**Fig. 11**).

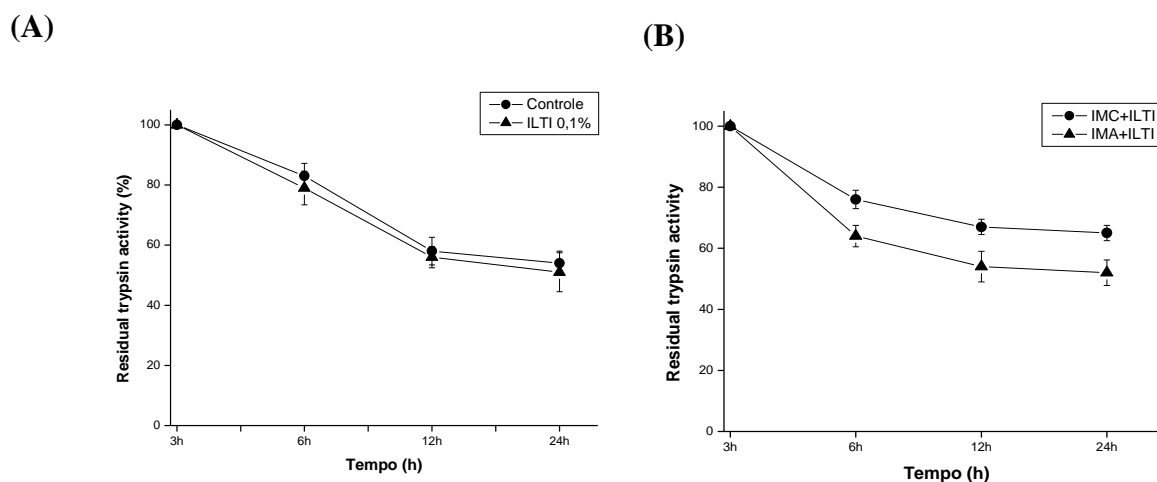


Fig. 10. Estabilidade do ILTI após incubação de 3h à 24 h com intestino médio de larvas de quarto instar alimentadas em dieta controle (IMC) e de larvas alimentadas em dieta contendo ILTI 0,1% (IMA) incubado até 24 horas à 30°C **(A)**. Estabilidade do ILTI em larvas alimentadas em dieta controle (IMC) junto com o inibidor e de larvas alimentadas em dieta contendo ILTI 0,1% (IMA) **(B)**. Cada ponto representa a média de três ensaios realizados.

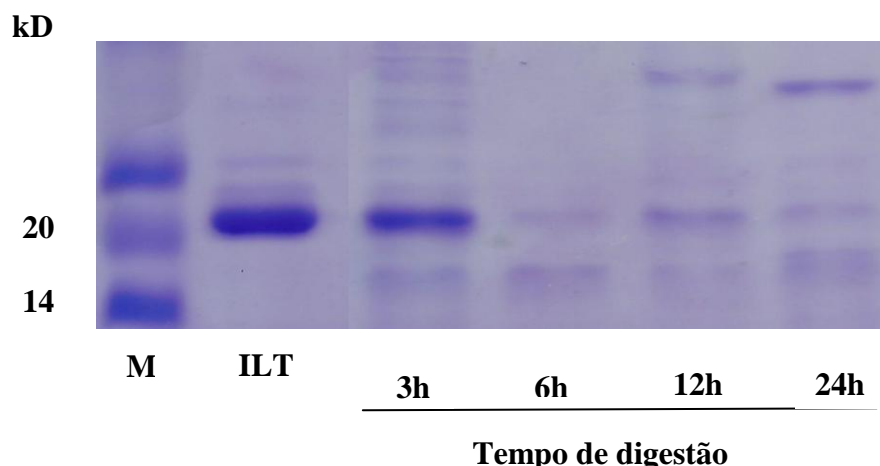


Fig. 11. SDS-PAGE do ILTI incubado com intestino médio de larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dieta controle de 3h a 24 h para verificar a digestibilidade do ILTI.

4. Discussão

Estratégias alternativas a utilização de inseticidas convencionais necessitam ser amplificadas, dentre elas a utilização de inibidores vegetais de enzimas digestivas, pode ser destacada. IPs são polipeptídeos que ocorrem numa variedade de plantas, podendo inibir proteinases digestivas encontradas em insetos fitófagos (**Broadway 1993; Gatehouse et al., 1993**). Os inibidores protéicos são moléculas que apresentam frequentemente baixo peso molecular, sendo diferenciada pela sua especificidade e o mecanismo de ação (**Richardson, 1991**).

O presente estudo mostra o mecanismo de ação de um inibidor de sementes de *Inga laurina* (ILTI) contra protease do inseto *A. kuehniella* e seu efeito na sobrevivência, peso médio e consumo de alimentos, em diferentes instares larval.

ILTI apresentou uma atividade inibitória contra tripsina cerca de 76% com 0,5 ug de proteína, porém para quimiotripsina apresentou uma inibição fraca (**Fig. 1**). Estudos realizados com inibidores Kunitz mostram esse mesmo perfil de inibição para tripsina e quimiotripsina (**Macedo et al., 2003, 2007 ; Bhattacharyya et al., 2006, 2007**).

ILTI (0,1% e 0,5%, w/w, de proteínas de dieta) presente numa dieta artificial em larvas de quarto instar, obteve efeito na mortalidade das larvas de *A. kuehniella* para 30% e 90%, respectivamente (**Fig. 2A**), o peso médio também afetou as larvas, tendo uma redução de 46% e 80%, respectivamente (**Fig. 2B**). Estes resultados foram semelhantes aos encontrado para o inibidor de tripsina de sementes de *Poecilante parviflora* (PPTI) sobre *Sitotroga cerealella* (**Garcia et al., 2004**), sugerindo que o inibidor pode afetar o crescimento e/ ou a sobrevivência destes insetos, quando incorporado na sua dieta.

Através de bioensaios *in vivo* e *in vitro*, estudos relatam a ação dos inibidores de proteases contra as enzimas de diferentes espécies de insetos (**Mosolov et al., 2001; Rahbé et al., 2003**).

Experimentos utilizando 0,1% de ILTI incorporado numa dieta artificial alteraram a sobrevivência e o peso médio das larvas de *A. kuehniella* em diferentes instares. No terceiro, quarto e quinto instar, a mortalidade das larvas foi de 20%, 18% e 11%, respectivamente (**Fig. 3A**). Larvas alimentadas com ILTI mostraram diferenças

significativas no ganho do peso ($p < 0,05$) reduzindo 64% no terceiro instar, 45% no quarto instar e 42% no quinto instar, quando comparados com larvas alimentadas no controle (**Fig. 3B**). **Babu e Subrahmanyam (2010)** relatam o efeito inseticida do inibidor de protease AsPI sobre o lepidóptero *Helicoverpa armigera*, afetando o desenvolvimento das larvas do inseto. Alguns autores relataram que a ingestão de inibidores de tripsinas, em dieta natural ou artificial, causa um aumento na mortalidade e modificam o desenvolvimento larval de alguns insetos, como o de *A. kuehniella* (**Macedo et al., 2009, 2010**) e *Sitophilus oryzae* (**Pittendrigh et al., 1997**).

Parâmetros nutricionais indicaram que ECI e ECD diminuíram quando uma dieta de 0,1% ILTI foi empregada. O valor de AD aumentou comparado ao controle de cada instar, sugerindo que o alimento permanecesse por um tempo maior no intestino do inseto, para permitir a neutralização dos efeitos do inibidor ou a desintoxicação da proteína (**Tab. 1**). Este comportamento foi observado também por outros (**Coelho et al., 2007; Ramos et al., 2009**). O ECI indica a capacidade do inseto de utilizar o alimento que ingere para o seu crescimento. Uma queda no valor do ECI indica que uma quantidade maior de alimento está sendo metabolizado para energia e menos está sendo convertido para a produção de biomassa do inseto (**Koul et al., 2003**). Já a queda do valor de ECD indica que ele diminui à medida que o alimento digerido foi sendo metabolizado para o aumento de energia (**Wheeler e Isman, 2001**). A **tabela 1** mostra o aumento do valor de CM (custo metabólico) como relatado por **Mordue (Luntz) e Blackwell (1993)**.

A concentração de proteínas do intestino médio das larvas alimentadas com ILTI 0,1% aumentou, de acordo com o aumento dos instares (**Fig. 4**). Há um pico de atividade em tripsina no quarto instar, a reduzir no quinto instar (**Fig. 5**), provavelmente, devido ao fato que o quinto instar é o último antes do estágio de pupa, sugerindo uma provável diminuição da atividade proteolítica nesse, devido o inseto não se alimentar nesse período, não sendo necessárias grandes concentrações de enzimas digestivas. A atividade quimiotríptica decresce a partir do quarto instar, nas larvas alimentadas com dieta controle. Porém, nas larvas alimentadas com ILTI 0,1%, houve um aumento na atividade das enzimas digestivas no período de quinto instar (**Fig.6**). Avaliações bioquímicas e moleculares indicam que alguns insetos tentam se adaptar a presença do inibidor de proteinase através da superprodução de proteinases digestivas já

existentes (De Leo et al., 2001; Lopes et al., 2004), ou há síntese de novas isoenzimas em resposta ao inibidor (Macedo et al., 2010), o que pode explicar o aumento da atividade trípica e quimiotrípica em larvas alimentadas.

Este perfil é característico de alguns inibidores do tipo Kunitz, que apresenta inibição contra tripsina e quimiotripsina, embora a esta última enzima, em menor grau, tais como em alguns inibidores de tripsina, PDTI (Macedo et al., 2003), AeTI (Bhattacharyya et al., 2007) e ApTI (Lopes et al., 2009).

Experimentos utilizando dieta mostraram que ILTI, incorporado a uma dieta artificial, alterou significativamente a taxa de consumo e a produção fecal de larvas de *A. kuehniella*, havendo uma diminuição de 25% e 75%, respectivamente (Fig.7 e 8). A baixa produção de fezes em larvas alimentadas com o inibidor foi reportada em insetos *Platymenia foliosa* (Ramos et al., 2009).

Foi avaliado o efeito do ILTI em proteinase endógena de *A. kuehniella* e sobre a tripsina bovina. Houve uma diminuição na atividade trípica, de acordo com o aumento da concentração do ILTI (Fig. 9A). Porém, a atividade quimiotrípica se mantém estável a partir de uma determinada concentração do inibidor (Fig 9B). O resultado sugere que as enzimas das larvas alimentadas com ILTI 0,1% continuam sensíveis a ação do inibidor incubado no ensaio. Estudos anteriores em larvas de *A. kuehniella* mostraram que esse inseto foi sensível a outros inibidores de proteinases PFTI (Ramos et al., 2009) e ApTI (Macedo et al., 2010), testados sobre larvas de quarto ínstar.

A queda na atividade trípica do intestino médio, tanto de larvas controle, quanto de larvas alimentadas com inibidor indicaram que há uma degradação natural do intestino médio ao longo do tempo nessas condições de temperatura. Porém nessas mesmas condições quando o conteúdo do intestino foi incubado com ILTI, houve um decréscimo mais acentuado da atividade trípica, indicando a ação do inibidor (Fig. 10A e 10B).

Algumas plantas desenvolvem eficientes estratégias em seu favor, e a produção de proteínas resistentes a protease defensiva é uma delas. A incubação de ILTI com protease do intestino médio de *A. kuehniella* mostrou que ILTI não foi hidrolisado quando incubado até 24 h, indicando que o ILTI não é resistente à hidrólise por enzimas de *A. kuehniella*. Esse resultado pode ser visualizado em SDS-PAGE (Fig. 11). Através

desse ensaio foi possível avaliar as modificações no perfil enzimático, em resposta a presença do inibidor em dieta artificial.

5. Conclusão

Neste trabalho, foi avaliado o mecanismo de ação do inibidor de proteinase (ILTI) em larvas de *A. kuehniella*. Os resultados apresentados aqui mostram que o efeito tóxico de ILTI pode envolver (1) o efeito do inibidor na sobrevivência, no peso e no crescimento larval, (2) inibição da tripsina, (3) ligação a enzimas digestivas presentes no intestino.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamentos de Pessoal de Nível Superior).

Referências

BAEK, J.M., SONG, J.C., CHOL, Y.D., KIM, S.I. 1994. Nucleotide sequence homology of cDNAs encoding soybean Bowman-Birk type proteinase inhibitor and its iso-inhibitors. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 58, 843-846.

BABU, S.R., SUBRAHMANYAM, S., 2010. Bio-potency of serine proteinase inhibitors from *Acacia senegal* seeds on digestive proteinases, larval growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 98, 349-358.

BOLETI, A.P.A., 2003. Isolamento, caracterização físico-química e estudo da atividade inseticida e fungicida da lectina de sementes de *Pouteria torta* (MART.) RADLK. Tese de Mestrado. Unicamp-Campinas, 117.

BHATTACHARYYA, A., MAZUMAR, S., LEIGHTON, S.M., BABU, C.R., 2006. A kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: purification, characterization and kinetic properties. *Phytochemistry*, 232–241.

BHATTACHARYYA, A., LEIGHTON, S.M., BABU, C.R., 2007. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 145, 669-677.

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

BROADWAY, R.M., 1993. Purification and partial characterization of trypsin/chymotrypsin inhibitors from cabbage. *Phytochemistry*. 33, 21-27.

COELHO, M.B., MARANGONI, S., MACEDO, M.L.R., 2007. Insecticidal action of *Annona coriácea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 146, 406- 414.

DE LEO, F., BONADÉ-BOTTINO, M., CECI, L.R., GALLERANI, R., JOAUNIN, L., 2001. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 31, 593- 602.

FARRAR, R.R., BARBOUR, J.D., KENEDY, G.G., 1989. Quantifying food consumption and growth in insects. *Annals of the Entomological Society of America* 82, 593–598.

FERRY, N., EDWARDS, M.G., GATEHOUSE, T., CAMPBELL, P., CHRISTOU, P., GATEHOUSE, A.M.R., 2006. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. *Transgenic Research*. 15, 13-19.

GALLO, D., NAKANO, O., NETO, S.S., CARVALHO, R.P.L., BATISTA, G.C., FILHO, E.B., 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.

GARCIA, V.A., FREIRE, M.G.M., NOVELLO, J.C., MARANGONI, S., MACEDO, M.L.R., 2004. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. *The Protein Journal*, 23, 343- 350.

GATEHOUSE, A.M.R., SHI, Y., POWELL, K.S., BROUGH, C., HILDER, V.A., HAMILTON, W.D.O., NEWELL, C.A., BOULTER, D., GATEHOUSE, J.A., 1993. Approach to insect resistance using transgenic plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 342, 279-286.

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

KOUL, O., MULTANI, D.W.M., GUMULCA, J.S., SINGH, M.G., 2003. Antifeedant effects of the limonoids from *Entandrophragma candolei* (Meliaceae) on the gram pod borer, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51, 7271–7275.

LAEMMLI, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680–685.

LECARDONNEL, A., CHAUVIN, L., JOUANIN, L., BEAUJEAN, A., PREVOST, G. 1999. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Science*. 140, 71–79.

LEMOS, D., EZQUERRA, J.M., GARCIA-CARREÑO, F.L., 2000. Protein digestion in penaeid shrimp: digestive proteinases, proteinase inhibitors and feeding digestibility. *Aquaculture*. 186, 89-105.

LEPLÉ, J.C., BONADÉ- BOTTINO, M., AUGUSTIN, S., PILATE, G., DUMANOIS-LE, T.V., DELPLANQUE, A., CORNU, D., JOUANIN, L. 1995. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Molecular Breeding*. 4, 319–328.

LOPES, A.R., JULIANO, M.A., JULIANO, L., TERRA, W.R., 2004. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 55, 140–152.

LOPES, A.R., SATO, P.M., TERRA, W.R., 2009. Insect chymotrypsins: chloromethyl ketone inactivation and substrate specificity relative to possible coevolutional adaptation of insects and plants. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 70, 188-203.

MACEDO, M.L.R., FREIRE, M.G.M., CABRINI, E.C., TOYAMA, M.H, NOVELLO, J.C., MARANGONI, S. 2003. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects*. 1621, 170–181.

MACEDO, M.L.R., GARCIA, V.A., FREIRE, M.G.M., RICHARDSON, M., 2007. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. *Phytochemistry*. 68, 1104–1111.

MACEDO, M.L.R., PANDO, S.C., CHEVREUIL, L.R., MARANGONI, S., 2009. Properties of a Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from *Delonix regia* Seeds Against Digestive Proteinases of *Anagasta kuehniella* (Z.) and *Corcyra cephalonica* (S.) (Lepidoptera: Pyralidae). *Protein & Peptide Letters*. 16, 1459-1465.

MACEDO, M.L.R., DURIGAN, R.A., SILVA, D.S., MARANGONI, S., FREIRE, M.G.M., PARRA, J.R.P., 2010. *Adenanthera pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology. 73, 213-231.

MACEDO, M.L.R., FREIRE, M.G.M., FRANCO, O.L., MIGLIOLO, L., OLIVEIRA, C.F.R., 2011. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. Comparative Biochemistry and Physiology. 158, 164-172.

MORDUE, (LUNTZ) A., BLACKWELL, A.J., 1993. Azadirachtin: an update. Journal of Insect Physiology. 39, 903–924.

MOSOLOV, V.V., GRICOGOEVA, L.I., VALUEVA, T.A., 2001. Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection (Review). Applied Biochemistry and Microbiology. 37, 115–123.

PITTENDRIGH, MB.R., HUESING, J.E., SHADE, R.E., MURDOCK, L.L., 1997. Effects of lectin, CRY1A\CRY1B Bt δ -endotoxin, PAPA, protease and α -amylase inhibitors, on the development of the rice weevil, *Sitophilus oryzae*, using an artificial seed bioassay. Entomology Experimentalis et Applicata. 82, 201-211.

RAHBÉ, Y., FERRASSON, E., RABESONA, H., QUILLIEN, L., 2003. Toxicity to the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* of anti-chymotrypsin isoforms and fragments of Bowman Birk protease inhibitors from pea seeds. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 33, 299-306.

RAMOS, V.S., FREIRE, M.G.M., PARRA, J.R.P., MACEDO, M.L.R., 2009. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). Comparative Biochemistry and Physiology. 152, 255-261.

RICHARDSON, M., 1991. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*. 5, 259-306.

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

SILVA, W., FREIRE, M.G.M., PARRA, J.R.P., MARANGONI, S., MACEDO, M.L.R., 2012. Evaluation of the *Adenanthera pavonina* seed proteinase inhibitor (ApTI) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of *Diatraea saccharalis*. *Process Biochemistry*. 47, 257-263.

SCHULER, T.H., POPPY, G.M., KERRY, B.R., DENHOLM, I., 1998. Insect-resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology*. 16, 168-175.

TIFFIN, P., GAUT, B.S., 2001. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor wip1 in *Zea* and related genera. *Molecular Biology and Evolution*. 18, 2092-2101.

VOLPICELLA, M., CECI, L.R., CORDEWENER, J., AMERICA, T., GALLERANI, R., BODE, W., JONGSMA, M., BEEKWILDER, J., 2003. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea* adapted to proteinase inhibitors. *European Journal of Biochemistry*. 270, 10–19.

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

WHEELER, D.A., ISMAN, M.B., 2001. Antifeedant and toxic activity of *Trichilia americana* extract against the larvae of *Spodoptera litura*. *Entomology Experimentalis et Applicata*. 98, 9–16.

YEH, K.W., LIN, M.I., TUAN, S.J., CHEN, Y.M., LIN, C.Y., KAO, S.S., 1997. Sweet potato (*Ipomea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. *Plant Cell Reports*. 16, 696–699.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, os resultados apresentados aqui mostram que a tripsina é a enzima digestiva principal do intestino médio de *A. kuehniella*. ILTI inibiu as proteinases intestinais e afetou no crescimento do inseto. O efeito inibitório do ILTI sobre o crescimento larval faz desta uma proteína com potencial bioinseticida, podendo ser utilizado como um método alternativo ao combate de inseto praga.

ANEXOS



Figura 16. *Inga laurina*. A- Árvore, B- Ramos e flores, C- Fruto, D- Sementes

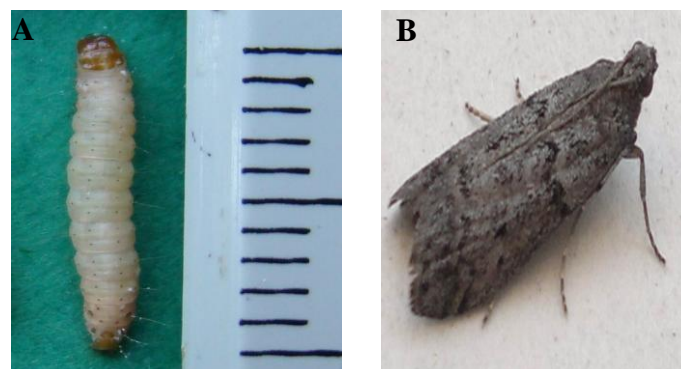


Figura 17. *Anagasta kuehniella* Zeller, 1879 (Lepidoptera: Pyralidae): A- Larva; B- inseto adulto.