

FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

TAYLLA MICHELLE DE OLIVEIRA FLORES

POTENCIAL DE INIBIDORES SERINICOS EM FOLHAS DE
Croton urucurana (MALPIGHIALES, EUPHORBIACEAE) PARA O
CONTROLE DE *Spodoptera Frugiperda* (LEPIDOPTERA,
NOCTUIDAE)

Trabalho de Conclusão de Curso

DOURADOS – MS
2017

TAYLLA MICHELLE DE OLIVEIRA FLORES

POTENCIAL DE INIBIDORES SERINICOS EM FOLHAS DE
Croton urucurana (MALPIGHIALES, EUPHORBIACEAE) PARA O
CONTROLE DE *Spodoptera Frugiperda* (LEPIDOPTERA,
NOCTUIDAE)

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Liliam Silvia Cândido

Co-orientadora: Dr.^a Jannaina Velasques da Costa Pinto

Trabalho de conclusão de curso apresentado
a Universidade Federal da Grande Dourados
como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Liliam Silvia
Cândido

Co-orientadora: Dr.^a Jannaina Velasques da
Costa Pinto

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

F632p	<p>Flores, Taylla Michelle de Oliveira. Potencial de inibidores serinicos em folhas de <i>Croton urucurana</i> (MALPIGHIALES, EUPHORBIACEAE) para o controle de <i>Spodoptera Frugiperda</i> (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE). / Taylla Michelle de Oliveira. – Dourados, MS : UFGD, 2017. 43f.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Liliam Silvia Cândido. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Grande Dourados.</p> <p>1. Compostos proteicos. 2. Proteases. 3. Inibidores de proteases. 4. Mecanismos de defesa vegetal. 5. <i>Spodoptera frugiperda</i>. 6. Milho. I. Título.</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

TAYLLA MICHELLE DE OLIVEIRA FLORES

**POTENCIAL DE INIBIDORES SERINICOS EM FOLHAS DE
Croton urucurana (MALPIGHIALES, EUPHORBIACEAE) PARA O
CONTROLE DE *Spodoptera Frugiperda* (LEPIDOPTERA,
NOCTUIDAE)**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Liliam Silvia Cândido
FCBA/UFGD
(Orientadora)

Dr^a. Jannaina Velasques da Costa Pinto
Universidade Católica Dom Bosco
(Co-orientadora)

Prof. Dr. Paulo Eduardo Degrande
FCA/UFGD
Banca examinadora

Prof. Dr. Ludovico Migliolo
Universidade Católica Dom Bosco
Banca examinadora

Dourados, 07 de abril de 2017

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que me capacitou, me deu forças, e me acompanhou em todos esses anos, me levantando em cada queda e mostrando que podemos mais e mais quando nos arriscamos em lutar pelos nossos sonhos. A Nossa Senhora, que se fez minha mãe, não só nesses últimos quatro anos morando longe de casa, mas sempre em minha vida, obrigada mãezinha de Deus por me guiar pelos caminhos escuros da vida sempre me protegendo e intercedendo por mim ao Pai.

A minha amada família, que mesmo de longe não negou esforços para que eu trilhasse esse caminho, vocês foram/são/serão sempre minha base. Obrigada em especial a minha amada mãe Gelciane Libera de Oliveira por acreditar em mim, quando mais ninguém o fazia, por me ouvir chorar horas e horas no telefone e me estimular sempre a levantar a cabeça e continuar lutando, seu exemplo de força e determinação me trouxe até aqui. Ao meu pai Edinaldo Rodrigues, que me criou como filha, e sempre apoiou meus sonhos. Ao meu pai Luiz Ivanir Flores, que hoje intercede por mim ao lado do nosso Pai celestial. Aos meus irmãos, que apesar de tantas brigas, sempre acreditaram em mim, e se mantiveram ao meu lado independente das minhas escolhas.

A minha V turma de Biotecnologia, no qual compartilhamos os melhores 4 anos da minha vida, obrigada pelo companheirismo, estudos pré-prova na biblioteca, risadas, viagens, e até mesmo as discussões. Acredito que hoje saímos mais maduros que ontem, e um até logo, vejo vocês nesse mundão.

Aos presentes que a Biotecnologia me concedeu, Lucas Bernazzoli de Assis e Dalila Nara Vasques, meus queridos irmãos de outra mãe, obrigada por cada momento compartilhado e por sempre estarem ao meu lado nas lutas diárias, com vocês vivi os melhores momentos da minha vida universitária, sentirei falta das nossas manhãs de mau humor compartilhado.

A minha amiga Mari Ortiz, que em pouco tempo de convivência se tornou muito especial, obrigada por todo o suporte, amor, amizade e amparo que vem me dando. As minhas amigas Thayane Skorupa e Tupiara Mergen, que mesmo separadas pela distância se mantiveram presentes na minha vida, incentivando sempre a busca dos meus sonhos, obrigada pela amizade linda que temos. Aos meus amigos Guilherme Tonial, Gláucia Vasques, Amanda Roberta, Thais Maria, Patricia Machado, Marcia Pozzi que se mantiveram presentes nos dias bons e ruins dessa caminhada, sempre me dando força e

coragem para prosseguir lutando, uma verdadeira família que aqui em Dourados construímos. A Família Cansação pela acolhida, amizade e suporte durante minha estadia em Campo Grande.

A minha Orientadora/Mãe Prof^ª. Dr^ª. Liliam Cândido pelos 4 anos de orientação, ensinamentos, lições, discussões, e toda compreensão e amor. Obrigada por confiar e acreditar no meu potencial, a Senhora é um grande exemplo de profissional para mim. A minha Co-orientadora Prof^ª. Dr^ª. Jannaina Velasques pela oportunidade de trabalhar em sua linha de pesquisa, pelos ensinamentos, conselhos e incentivos. Obrigada por mostrar como o mundo da ciência pode ser mais interessante, principalmente quando trabalhamos com plantas, e despertar esse desejo de buscar sempre mais em prol da ciência. Obrigada a toda equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular S-Inova / Biotech, se não fosse o empenho e ajuda de vocês esse trabalho não existiria. Em especial a minha parceira de trabalho Fernanda Alencar por toda paciência e companheirismo. Ao mestrando Guilherme Sousa pela paciência e ensinamentos. Aos ICs Odaias Pereira (rei do Bradford), Wellington Coelho e Thais Alves pelo auxílio nas atividades, ensinamentos, e principalmente pela amizade e conselhos trocados.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	23
2.1.	Objetivo Geral.....	23
2.2.	Objetivos específicos	23
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1.	Importância econômica da Cultura do Milho	16
3.2.	<i>Spodoptera frugiperda</i>	16
3.3.	Peptidases	17
3.4.	Inibidores de peptidases	18
3.5.	<i>Croton urucurana</i>	20
4.	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1.	Coleta de Material	24
4.2.	Obtenção do Extrato Bruto.....	24
4.3.	Precipitação de Proteínas do Extrato de Tris-HCl	24
4.4.	Análises do perfil proteico em SDS-PAGE.....	25
4.5.	Determinação de Proteína Total.....	25
4.6.	Homogenato do trato digestivo do inseto.....	25
4.7.	Ensaio enzimático	26
4.8.	Análise estatística	27
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
	CONCLUSÃO.....	36
	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: A- Folhas; B- Caule; C- Árvore de *C. urucurana*.....21
- Figura 2: Eletroforese em SDS-PAGE 12% revelado com nitrato de prata e *Coomassie Brilliant Blue* dos extratos obtido das folhas de *C. urucurana*.....27
- Figura 3: Concentração de proteínas totais nas amostras de Extrato Bruto obtido das folhas de *C. urucurana*.28
- Figura 4: Porcentagem da atividade inibitória da enzima tripsina bovina utilizando os substratos azocaseína (1%) em seis concentrações distintas com extratos obtido das folhas de *C. urucurana*30
- Figura 5: Porcentagem da atividade inibitória da enzima tripsina utilizando os substratos azocaseína (1%) e BApNA (1,25 mM) em nove concentrações distintas da fração F2 fracionado em (NH₄)₂SO₄ do Extrato obtido de *C. urucurana*31
- Figura 6: Porcentagem da atividade inibitória do Homogenato Intestinal da lagarta *S. frugiperda* utilizando o substrato BApNA (1,25 mM) em cinco concentrações diferentes da fração F2 fracionado em (NH₄)₂SO₄ do Extrato obtido das folhas de *C. urucurana*32

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Famílias de enzimas proteolíticas.....	17
--	----

FLORES, TAYLLA MICHELLE DE OLIVEIRA. Universidade Federal da Grande Dourados, Abril de 2017. **Potencial de inibidores serinicos em folhas de *Croton urucurana* (Malpighiales, Euphorbiaceae) para o controle de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae).** Orientadora Prof^ª Dr^ª Liliam Silvia Cândido. Co-orientadora Dr^ª Jannaina Velasques da Costa Pinto.

RESUMO

A cultura do milho tem grande destaque econômico no agronegócio brasileiro, porém a sua produtividade é considerada baixa quando comparada a alguns países desenvolvidos. Um dos principais fatores que impedem números mais expressivos na colheita é a grande incidência de pragas na lavoura, sobretudo da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera, Noctuidae). Os mecanismos adaptativos dessa praga polífaga garantem sua aquisição de resistência a diversos compostos químicos após poucas gerações, tornando-a de difícil controle. Uma tendência das últimas décadas vem sendo a prospecção de moléculas naturais no controle de pragas, sobretudo os de origem proteica que constitutivamente participam dos mecanismos de defesa das plantas. Nesse sentido, diversas pesquisas com inibidores de peptidases (IPs) vêm ganhando destaque graças ao seu potencial inseticida, reduzindo a disponibilidade de aminoácidos essenciais ao desenvolvimento das larvas, levando à morte. Neste trabalho, foram utilizados extratos proteicos de folhas de *Croton urucurana*, tradicionalmente conhecido por suas propriedades medicinais, é uma planta típica do Cerrado Brasileiro, bioma considerado hotspot de biodiversidade onde as plantas desenvolveram mecanismos de adaptação e resistência. Os extratos foram preparados em tampão Tris-HCl 50mM pH 8 e em tampão ácido (HCl 1000mM), e os extratos em Tris foram submetidos à precipitação proteica com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄ nas saturações 0-30% denominado de F1, 30-60% denominado de F2 e 60-100% denominado de F3. A análise do perfil proteico foi realizada por eletroforese SDS-Page 12 %, e a determinação de proteínas totais dos extratos e dos precipitados F1, F2 e F3 foram realizadas pela metodologia de Bradford. Um ensaio enzimático preliminar foi realizado utilizando-se o substrato inespecífico Azocaseína (1%) e Tripsina Bovina. Ao constatar maior atividade antitriptica do precipitado F2, este fora então submetido ao ensaio com substrato específico BApNA (1,25mM) em Tripsina Bovina. Ao constatar significativa atividade inibitória, deu-se prosseguimento ao ensaio com substrato BApNA em Homogenato intestinal da lagarta *S. frugiperda* que apresentou atividade inibitória de 80% quando utilizados 2,7 µg.mL⁻¹ do extrato. Apesar de serem necessárias novas etapas envolvendo o fracionamento e

purificação do IP, os resultados obtidos constatou o potencial inseticida da planta e apontam para a possibilidade de um produto biotecnológico destinado ao controle de lepidóptera.

Palavras chaves: Compostos proteicos, proteases, inibidores de proteases, mecanismos de defesa vegetal, *Spodoptera frugiperda*, milho.

FLORES, TAYLLA MICHELLE. Universidade Federal da Grande Dourados, Abril de 2017. **Potential of serinic inhibitors in leaves of *Croton urucurana* (Malpighiales, Euphorbiaceae) in control of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae).** Supervisor Prof Dr Liliam Silvia Cândido. Co-supervisor Dr Jannaina Velasques da Costa Pinto.

ABSTRACT:

The maize crop is one of the principal and most economically important in Brazilian agribusiness, but its productivity is still considered low when compared to some developed countries. One of the major factors that prevents more expressive numbers in the harvest is the high pest incidence in the crop, especially the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*, Lepidopterae, Noctuidae). The adaptive mechanisms of this polyphagous pest ensure its acquisition of resistance to several chemical compounds after a few generations, making it difficult to control. On the last decades the tendency on bioprospection of natural molecules focused on pest control have largely increased, especially the proteinaceous compounds that constitutively participate on the plant defense mechanisms. In consequence, several researches with plant peptidase inhibitors (PPIs) are highlighting their insecticidal activity, it reduces the availability of essential amino acids to the growth of the larva, leading to death. In this work, we've bioprospected leaf extracts of *Croton urucurana*, a plant traditionally known by its medicinal properties and native of the Brazilian Cerrado, a biome considered as a hotspot of biodiversity where plants have developed particular mechanisms to resist and survive in extreme environmental conditions. The extracts were prepared in Tris-HCl buffer (50 mM) and acid buffer (1000 mM HCl). The extracts in Tris were precipitated with ammonium sulfate at distinct saturations, F1(0-30%), F2 (30-60%) and F3 (60-100%). The protein profile analysis was performed by SDS-Page 12% electrophoresis and total protein determination of the extracts and precipitated by the Bradford methodology. A preliminary enzyme assay was performed using the non-specific substrate Azocasein (1%) and Trypsin Bovine. Upon finding higher antitryptic activity in the F2, we proceed an specific substrate assay using BApNA (1.25 mM) in bovine trypsin. When significant inhibitory activity was observed, the BApNA substrate assay was performed in intestinal homogenate of *S. frugiperda*, which returned 80% of inhibitory activity when $2.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of the extract was used. Although new steps are required involving the fractionation and purification of the PPI, the results obtained prove the insecticide potential of the plant and

point to the possibility of a biotechnological product destined to the control of Lepidoptera.

Key words: Proteinaceous compounds, plant defense mechanisms, pest control, *Spodoptera frugiperda*, maize.

1. INTRODUÇÃO

Estimativas oficiais da ONU (2015) apontam que a população mundial deve chegar a 9,6 bilhões de pessoas em 2050. Com esse aumento, também cresce a necessidade de buscar tecnologias mais eficientes para suprir a demanda por produtos agrícolas. Em consequência disso, os produtores vêm buscando soluções inovadoras por meio da biotecnologia para ajustar os problemas de baixa produtividade (COPPING HEWITT, 1998).

A produção de milhos (*Zea mays*, Poales, Poaceae) é uma das culturas de maior destaque no Brasil, perdendo apenas para a soja. A colheita anual de grãos chegou a 84,5 toneladas, na safra 2015/2016, ocupando aproximadamente 16 milhões de hectares. Apesar disso, sua produtividade é considerada baixa quando comparado com países desenvolvidos, a exemplo dos Estados Unidos (CONAB, 2016).

Um dos principais fatores que comprometem a produtividade do milho no Brasil é a grande incidência de insetos-pragas na lavoura. Levando em conta que o Brasil está inserido numa zona tropical, que favorece a colonização, reprodução e adaptação dos insetos-pragas, que ocorrem de forma mais acelerada que em outras zonas do globo. Dentre as pragas mais incidentes, a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae), (SMITH, 1797), também conhecida como lagarta-do-cartucho, é uma das de difícil controle, podendo levar a 100% de perda da produção. (ÁVILA; DEGRANDE; GOMEZ, 1997).

As técnicas de manejo para controle da lagarta são variadas. Dentre as mais comuns está o controle químico, no entanto a resistência adquirida por parte da *S. frugiperda* vem aumentando, e com isso essas técnicas estão perdendo sua eficiência rapidamente. Esta resistência está muitas vezes relacionada à falta de manejo adequado nas pulverizações, seja pela dosagem inadequada ou pela repetição indiscriminada da prática ao longo do ciclo da lavoura (COSTA et al., 2005; WAQUIL, 2007; LIMA et al., 2012).

As plantas são consideradas como uma rica fonte de compostos bioativos, sendo estes, na maioria, isentos de efeitos adversos e usados na medicina tradicional e no controle de insetos-pragas na produção agrícola. Os conjuntos de reações químicas que ocorrem nas plantas são conhecidos como metabolismo primário e/ou metabolismo secundário (GARCÍA e CARRIL, 2011).

Em outra vertente, o uso de extratos vegetais no controle de insetos é uma prática comum e ancestral, historicamente datada de há 4000 anos a.C. Os povos antigos reconheciam as plantas como fonte de venenos e compostos inseticidas para o controle de pragas agrícolas. Existe uma tendência em se prospectar compostos originados do metabolismo primário das plantas, de natureza proteínica, utilizados constitutivamente como mecanismo de defesa natural a campo. Um exemplo típico é o uso de inibidores de peptidases. (ADDOR, 1995; THACKER, 2002).

Os Inibidores de peptidases (IPs) são compostos proteicos que inibem a atividade de peptidases do intestino das lagartas, resultando na redução da disponibilidade de aminoácidos necessários para o crescimento e desenvolvimento da praga, levando-as à morte (DE LEO, 2002). Os IPs estão presentes, em sua maioria, nos órgãos de reserva, mas podem também ser encontrados em outros tecidos vegetais e desempenham importante papel na defesa aos ataques de insetos e microrganismos patogênicos em lavouras, podendo ser utilizados como potencial bioinseticida.

Prospecção de compostos naturais em ambientes inóspitos vem crescendo significativamente, partindo do princípio que os organismos que se adaptam a essas condições ambientais são capazes de desenvolver mecanismos de defesa a partir de seu metabolismo celular. Nesse sentido, as espécies do Cerrado brasileiro tornam-se importantes candidatas na busca por moléculas bioativas. A *Croton urucurana* (Malpighiales, Euphorbiaceae), popularmente conhecida como sangra d'água graças ao látex vermelho liberado pelo seu caule, é uma planta típica deste bioma, e utilizada entre as populações indígenas pelas suas propriedades medicinais, como anti-diarreico, anticancerígenos, anti-inflamatório intestinal, antioxidante, antirreumáticos, tratamento de feridas infeccionadas e aceleração da cicatrização dessas feridas (SIMIONATTO et al., 2007).

Na literatura existem estudos relacionando a capacidade de *C. urucurana* no controlar pragas agrícolas, como as larva de *Anagasta kuehniella* que atacam lavouras de algodão (SILVA et al., 2009). No entanto, não são encontrados dados relacionados aos compostos de origem proteica em extratos da sangra d'água. Diante disso, neste trabalho foram aplicados métodos de prospecção de moléculas proteicas em *C. urucurana* com intuito de identificar a presença de inibidores de peptidase e sua aplicabilidade no controle de lepidóptera, principalmente em modelos agrícolas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importância econômica da Cultura do Milho

Milho e soja são as principais culturas produzidas no Brasil. Juntos, correspondem a praticamente 90% do que é produzido no país. Só a cultura do milho ocupa aproximadamente 16 milhões de hectares, com produtividade média de 84,5 milhões de toneladas por ano. Ainda assim, a média de rendimento da cultura no Brasil é considerada baixa: 5.700 kg ha⁻¹, na safra 2015/2016, o que representa menos da metade da média de produtividade norte-americana (CONAB, 2016).

Diversos fatores podem ser responsáveis pela baixa produtividade, dentre eles a alta incidência de pragas na lavoura. Dentre os principais insetos-pragas que atacam a cultura do milho, destacam-se a lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*), a broca-do-colmo (*Diatraea saccharali*) e a lagarta-da-espiga do milho (*Helicoverpa zea*) (SANGOI et al., 2003; RIBEIRO et al., 2005; FORSTHOFER et al., 2006; FARIAS et al., 2013).

2.2. *Spodoptera frugiperda*

Dentre os insetos capazes de causar grandes danos econômicos, a *S. frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) é considerada como a principal praga da cultura do milho no Brasil. Polífaga, ela ataca diversas espécies vegetais, cerca de 180 espécies de plantas, e se destaca especialmente pela dificuldade de controle eficiente (LIMA et al., 2012).

A lagarta *S. frugiperda* é de ocorrência sazonal nas áreas de clima temperado, e sob temperaturas mais elevadas, pode reproduzir até 13 gerações por ano nas plantações de milho. O período de desenvolvimento larval varia de 12,1 a 29,7 dias e o pupal de 9 a 27 dias, podendo variar em relação ao clima, ambiente e dieta que a lagarta e submetida. Ela se alimenta da planta em todas as fases fenológicas, porém são os cartuchos de plantas jovens que apresentam maior incidência de ataque dessa praga, ocasionando perdas significativas à produção (AFONSO et al., 2009).

Apesar de essa praga ser conhecida há mais de 200 anos, ainda não foram desenvolvidas técnicas de controle totalmente eficientes contra ela. Uma das medidas de manejo mais utilizadas no Brasil tem sido o controle químico. Outro aspecto que vem

preocupando os agricultores é a resistência adquirida por parte da *S. frugiperda* em relação aos métodos de controle já existentes (COSTA et al., 2005; WAQUIL, 2007).

2.3. Peptidases

As peptidases são proteínas que promovem a clivagem proteolítica de peptídeos, isto é, elas promovem a quebra de substratos em regiões específicas, liberando aminoácidos. Dentre as peptidases mais estudadas estão as presentes nas secreções gástricas e pancreáticas. As peptidases intestinais presentes no intestino médio da lagarta são responsáveis pela clivagem das proteínas presente na dieta desse inseto, facilitando a absorção de aminoácidos pelas células. A classificação dessas peptidases é realizada segundo o tipo de reação catalisada, de acordo com sua estrutura e a natureza química do sítio catalítico (TREMACOLDI, 2009; NEURATH, BEYNON, BOND, 1990).

Dessa maneira, elas podem ser subdivididas em endopeptidases, clivando peptídeos distantes dos terminais dos substratos, e exopeptidases, clivando peptídeos terminais. Essas enzimas proteolíticas são divididas em quatro classes entre as quais se distribuem seis famílias (tabela 1) (NEURATH, 1986).

Família	Peptidase(s) representativa(s)
Serino Peptidase I	Quimiotripsina Tripsina Elastase
Serino Peptidase II	Calicreína pancreática Subtilisina
Cisteíno Peptidase	Papaína Actinidina Catepsina
Aspártico Peptidases	Penicilopepsina Renina
Metalo Peptidases I	Carboxipeptidase A
Metalo Peptidases II	Termolisina

Tabela 1: Famílias de enzimas proteolíticas

Fonte: Adaptada de Neurath (1986)

2.4. Inibidores de peptidases

Inibidores de peptidase (IPs) são proteínas ou peptídeos, no qual em plantas são formados através do metabolismo primário, e possuem uma concentração elevada nos órgãos reprodutivos e de reserva, mas que também podem ser encontradas nas folhas em resposta aos ataques de insetos e microrganismos patogênicos (RYAN, 1990; MACEDO et al., 2009).

Os inibidores de peptidases são capazes de inibir a atividade catalítica de enzimas proteolíticas, causando uma redução na disponibilidade de aminoácidos necessários para o crescimento e desenvolvimento do organismo, levando-o até à morte (DE LEO, 2002; LINGARAJU e GOWDA, 2008).

A descrição e classificação dos IPs são realizadas de acordo com o órgão vegetativo onde são isolados e pelos seus mecanismos catalíticos, sendo assim divididos em famílias. As famílias mais conhecidas e estudadas são os inibidores tipo Kunitz, Bowman-Birk, Batata I e Batata II. (BODE e HUBER, 1992). Dentro dessas famílias podemos encontrar classes distintas de inibidores de peptidases: inibidores de peptidases serínicas, cisteínicas, aspárticas e as metalo-peptidases (RAWLINGS e BARRETT, 1993).

A atividade do IP é notável devido à sua capacidade para formar complexos estáveis com as peptidases alvo, bloqueando, alterando ou impedindo o acesso ao sítio ativo da enzima (VALUEVA e MOSOLOV, 2000). Sítio reativo é o nome dado à região responsável pela formação do complexo enzima-inibidor, sendo que a composição de aminoácidos pode variar de acordo com a classe de inibidores, determinando a especificidade de um inibidor para uma determinada classe de enzimas (MACEDO et al., 2007).

A ativação de genes únicos é responsável pela obtenção dos IPs, com isso a produção de plantas transgênicas que expressam esses IPs vem aumentando gradativamente nos últimos 15 anos, e muitos testes vêm sendo realizados para melhorar a capacidade de defesa das plantas contra pragas e microrganismos (FAN e GUO-JIANG, 2005).

Durante o processo evolutivo as plantas adquiriram estratégias para manutenção de seu crescimento e desenvolvimento, mesmo em situações ambientais desfavoráveis, garantindo sua adaptação e sobrevivência. Um desses mecanismos, amplamente reconhecido, são os sistemas de defesa através da síntese de compostos ativos que selecionam populações resistentes e/ou tolerantes aos ataques de insetos-pragas (JACKSON e TAYLOR, 1996; MALEC e DIETRICH, 1999; STOTZ, KROYMANN, MITCHELL-OLDS, 1999).

Numerosas espécies de insetos representam ameaças econômicas e sanitárias para a sociedade, alguns impactam fortemente na cultura de alimentos, danificando as lavouras, outras transmitindo doenças graves, como malária, leishmaniose e tripanossomíase (MEDLOCK et al., 2012; SAVARY et al., 2012; VAN GRIENSVEN, DIRO, 2012).

O controle de pragas é, portanto, de grande importância e se baseia principalmente no uso de inseticidas químicos e biológicos (MEISSLE, ROMEIS, BIGLER, 2011; VAN DEN BERG, 2011). A principal ameaça para um eficiente controle de pragas é a capacidade de selecionar populações resistentes a quase todas as moléculas utilizadas, levando a uma brusca queda da eficácia dos produtos (TABASHNIK et al., 2008; RIVERO, et al., 2010).

Por muitos anos, o controle químico foi considerado a forma mais eficaz de reduzir a população de insetos-pragas nas lavouras. Entretanto, a aplicação indiscriminada de inseticidas resultou em muitos inconvenientes, principalmente no desenvolvimento de resistência por parte das espécies alvo contra os diversos vetores utilizados, independente de sua natureza. Essa resistência pode ser apresentada contra agentes biológicos (*Bacillus thuringiensis* e *Bacillus sphaericus*), reguladores de crescimento, mas sobretudo contra as moléculas sintéticas como do inseticida methoprene (GUILLAUME, 2013; AMIRI, BANDANI, RAVAN, 2010). Diante disso, diversos estudos vem sendo direcionados ao desenvolvimento de alternativas ao uso de compostos sintéticos, alguns empregando extratos vegetais e óleos essenciais, na tentativa de se encontrar novas moléculas bioativas e eficazes no combate às pragas (KIM, et al. 2010).

A resistência expressa naturalmente pelas plantas hospedeiras, assim como os compostos naturais obtidos a partir delas, oferece um método potencial no controle de insetos-pragas. As plantas que mais frequentemente se destacam por sua capacidade inseticida são as pertencentes à família das Meliaceae, Rutaceae, Asteraceae, Labiateae,

Piperaceae e Annonaceae. Elas apresentam um amplo espectro de ação tanto em relação ao número de espécies de insetos afetados como em seus diferentes modos de ação (AKHTAR e ISMAN, 2004).

Dentre os compostos mais bioprospectados, os inibidores de peptidase e lectina têm sido amplamente reportados como agentes inseticidas. Esses fatores vêm ocasionando a morte dos insetos em todos os estágios da planta, assim como alteração na morfologia da praga e efeito repelente. Alguns extratos de plantas são capazes de interferir no desenvolvimento larval até a fase adulta (KAMIABI, JAAL, KENG, 2013).

Alguns inibidores de peptidases são capazes de interferir na ação das peptidases presentes no sistema digestivo de insetos, através de ligações competitivas com a peptidase digestiva impedindo que ocorra a ligação substrato-peptidase, resultando na deficiência de aminoácidos e conseqüentemente no crescimento, desenvolvimento, fecundidade e sobrevivência dos insetos (LAWRENCE e KOUNDAL, 2002; OPPERT et al., 2003; AZZOUZ et al., 2005).

No caso de inibidores de cisteínas, quando presentes no organismo dos Bruquídeos impedem a digestão de proteínas (SILVA, TERRA, LIMA, 2001). Outro exemplo é o caso de plantas produtoras de cistatina, que diminuem a atividade de peptidase no sistema digestivo de coleópteros (WALSH, STRICKLAND, 1993; KOIWA et al., 1998). Pesquisadores têm voltado suas atenções para a ideia de usar inibidores de enzimas digestivas que afetam no crescimento, desenvolvimento e reprodutibilidade em espécies de pragas agrícolas (MEHRABAD; BANDAMI; SAADATI, 2010).

2.5. *Croton urucurana*

O Brasil é considerado um dos países de maior diversidade biológica do planeta (VALOIS, 2004). Dentre os biomas brasileiros, o Cerrado ocupa 21% do território nacional e é também conhecido como um dos *hotspots* mundiais de biodiversidade (KLINK e MACHADO, 2005). Nesta área encontra-se o gênero *Croton*, um dos maiores constituintes da família Euphorbiaceae. (PALMEIRA et al., 2006)

O *Croton urucurana* é uma espécie arbórea, de copa aberta e folhas cordiformes. Seu tronco chega a medir 20 cm de diâmetro com tonalidades claras (Figura 1), atribuindo à espécie importantes características para a exploração madeireira. Na medicina popular são utilizados três produtos distintos advindos dessa espécie, como a seiva vermelha, a casca do caule e o exsudato de goma (LORENZ e MATOS et al., 2008).



Figura 1: A- Folhas; B- Caule; C- Árvore de *C. urucurana*.

Fonte: Viveiro Ipê

Extratos ou infusões de partes distintas da planta de várias espécies do gênero *Croton* como *C. lechleri*, *C. palanostigma*, *C. draconoides* e *C. urucurana* são conhecidos e utilizados por populações indígenas como remédios tradicionais para tratamento e aceleração da cicatrização de feridas infeccionadas. *C. urucurana* e outras espécies do gênero *Croton* são tradicionalmente conhecidas como Sangue de Dragão ou Sangra d'água. Esse nome popular é devido à casca do caule, que quando cortada, libera um látex de cor vermelho-sangue (SIMIONATTO, et al., 2007).

Já foi descrita na literatura uma variedade de efeitos farmacológicos do *C. urucurana*, como cicatrização de úlcera, anti-diarréico, anticancerígenos, anti-inflamatório intestinal, antioxidante, antirreumáticos (GURGEL, 2005; PERES, et al., 1998; SALATINO, SALATINO, NEGRI, 2007). Peres e colaboradores (1997) observaram que o extrato aquoso e algumas frações do extrato metanólico do *C.*

urucurana apresentaram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium*. Há trabalhos que comprovam que o óleo essencial extraído da casca do caule possui um ótimo potencial de inibição no crescimento microbiano de *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* (SIMIONATTO, et. al., 2007).

C. urucurana não possui apenas propriedades farmacológicas, mas também pode ser eficaz como bioinseticida. Silva e colaboradores (2009) constataram que os extratos metanólicos semipurificados de *C. urucurana* foram eficientes contra a larva de *Anagasta kuehniella*, que ataca as plantações de trigo, levando a 100% de mortalidade da praga.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a presença de inibidores de peptidases serínicas em folhas de *Croton urucurana* e seu potencial no controle da lagarta-do-cartucho (*S. frugiperda*) nas culturas de Milho.

3.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito inibitório do Extrato das folhas de *C. urucurana* sobre peptidases serínicas intestinais;

Avaliar o efeito inibitório do extrato das folhas de *C. urucurana* sobre o homogenato intestinal da *S. frugiperda*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Coleta de Material

Folhas de *Croton urucurana* foram coletadas no Parque das Nações Indígenas, localizado na cidade de Campo Grande – Mato Grosso do Sul (20.4555° S, 54.5797° W). Nove progênes distintas, de porte médio e com baixo nível de injúrias ao limbo foliar foram escolhidas para coleta. As folhas foram misturadas e transportadas até o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular S-Inova Biotech, do programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. As folhas foram lavadas, secas e colocadas em estufa de circulação fechada, a 36,5° C por quatro dias. Após a secagem das folhas, foi realizada a remoção da nervura central, e o limbo foliar foi moído em moinho de facas para obtenção do material totalmente pulverizado.

4.2. Obtenção do Extrato Bruto

Dois métodos de extração proteica foram empregados durante a bioprospecção do *C. urucurana*.

Extração Tris-HCl: Foram homogeneizados 100g de folhas pulverizadas com adição de 2000 mL de solução tampão de extração Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (proporção de 1:20 p:v) sob agitação magnética *overnight*. Com o auxílio de um funil e gaze de malha dupla, as amostras foram filtradas e, em seguida, centrifugadas a 10000 rpm por 30 min à 4°C. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi posteriormente liofilizado.

Extração Ácida: Em 600 mL de água destilada foram adicionados 30 gramas de NaCl (600mM) e 1 mL de HCl (1000mM) e deixado sob agitação magnética até a total solubilização do sal. Com auxílio de uma proveta, o volume foi completado até 1000 mL. Nesses 1000 mL de solução tampão de extração ácida foram adicionados 50 gramas de folhas pulverizadas e deixado sob agitação magnética *overnight*. Com o auxílio de um funil e gaze de malha dupla, a amostra foi filtrada e em seguida centrifugada à 10000 rpm por 30 min a 4 °C. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi liofilizado.

4.3. Precipitação de Proteínas do Extrato de Tris-HCl

O extrato obtido do tampão Tris-HCl de *Croton urucurana* foi submetido à precipitação por Sulfato de Amônio segundo metodologia descrita por Burgess (2009) empregando faixas de saturação inicial-final de 0-30; 30-60 e 60-100% de (NH₄)₂SO₄.

Após a adição do sal, as amostras foram homogeneizadas em agitador magnético à 4 °C overnight, distribuídas em tubos de polietileno e posteriormente centrifugadas a 10000 rpm por 10 min à 4°C. O precipitado respectivo de cada fração foi coletado, dialisado em membrana de nitrocelulose (cutoff 200~500 Da) com consecutivas trocas de água destilada em um período de 48h, a 4°C até estabilização do pH em 7,5, e concentradas por meio de liofilização. As frações respectivas a cada faixa de saturação foram denominadas F1 para faixa de 0-30, F2 para a faixa de 30-60 e F3 para a faixa de 60-100% de saturação de (NH₄)₂SO₄.

4.4. Análises do perfil proteico em SDS-PAGE

Para a análise em gel, foram aplicadas as amostras de extração Ácida, extração por Tris-HCl e os precipitados (F1,F2 e F3), em uma concentração de 8 µg de amostra. A eletroforese foi realizada em gel de separação 12%: (H₂O milli-Q; acrilamida 30%, N,N'-Metileno Bis-bisacrilamida 0,8%; Tampão Tris-HCl 1500mM pH 8,8 + SDS 0,4 %; Persulfato de amônio 10%; TEMED Ultra-Puro) e gel de empilhamento 5%: (H₂O milli-Q; acrilamida 30%, N,N'-Metileno Bis-bisacrilamida 0,8%;Tampão Tris-HCl 1000mM pH 6,8 + SDS 0,4 %; Persulfato de Amônio 10%; TEMED Ultra-puro). Em todas as amostras foi adicionado tampão composto por Tris 50mM, pH6,8, glicerol 10%, SDS 10%, azul de bromofenol 0,008 mg/ml. Em seguida as amostras receberam tratamento térmico por 5 min a 100 °C em banho-seco. O tampão de corrida foi preparado com adição de Glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 10%, pH 8,3. A corrida de separação foi realizada em 100V (20 mA) por duas horas. O gel foi corado com Azul de Coomassie e revelado com Nitrato de Prata.

4.5. Determinação de Proteína Total

A concentração de proteínas totais dos extratos foi estimada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando a curva de BSA (albumina sérica bovina) como padrão. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (BioDrop) a 595 nm.

4.6. Homogenato do trato digestivo do inseto

Larvas de *S. frugiperda* de 5º instar, obtidas no Laboratório de Controle de Pragas da Universidade Católica Dom Bosco, foram dissecadas com auxílio de lupa e pinça, os tratos intestinais selecionados foram transferidos para microtubos contendo 200µL de

tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e mantidos a $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$. O homogenato intestinal foi preparado de acordo com a metodologia estabelecida por Terra e colaboradores (1997), seguindo algumas modificações feitas por Amorim (2007). Os intestinos foram homogeneizados com o auxílio de pistilo em microtubos de 2 mL sob banho de gelo por 10 minutos. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 10.000rpm por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi coletado e quantificado pelo método de Bradford (1976) em espectrofotômetro (595 nm), diluído a $1\ \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ e a leitura padronizada para cerca de 0,100 de absorbância.

4.7. Ensaio enzimático

As atividades inibitórias proteolíticas foram conduzidas por meio de ensaio enzimático com tripsina bovina utilizando solução de Azocaseína a 1% e BApNA 1,25mM como substratos.

Atividade inibitória realizada com substrato não específico Azocaseína a 1%:

O meio de pré- incubação consistiu em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 3 μL de Tripsina Bovina, 120 μL de HCl 2,5mM e diferentes volumes das amostras (0 μL ; 2,5 μL ; 5 μL ; 10 μL ; 25 μL ; 50 μL ; 100 μL) completando um volume final de 500 μL . Para a amostra de precipitado de amônio F2 (30-60 %) também foram realizados os volumes de 0,156 μL , 0,312 μL , 0,625 μL e 1,25 μL . A pré-incubação foi efetuada durante 12 minutos a 37°C . Após este período foi adicionado 200 μL de substrato Azocaseína 1% prosseguindo-se a incubação por mais 20 minutos a 37°C . A reação foi interrompida pela adição de 300 μL de TCA 20% (v/v). As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm, por 10min a 20°C e 500 μL do sobrenadante foi alcalinizado pela adição de 500 μL de NaOH 2 N à reação. A absorbância foi medida a 440 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e nos ensaios em branco o substrato foi adicionado após a reação ter sido parada com TCA 20% na concentração final.

Atividade inibitória realizada com substrato BApNA (β -N-benzoil-arginina-

p-nitroanilida): O meio de pré-incubação consistiu em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 3 μL de Tripsina Bovina e diferentes volumes das amostras (0 μL ; 2,5 μL ; 5 μL ; 10 μL ; 25 μL ; 50 μL ; 100 μL) completando um volume final de 500 μL . Para a amostra de precipitado de amônio a 60 % também foram realizados nos volumees de 0,156 μL , 0,312 μL , 0,625 μL e 1,25 μL . A pré-incubação foi efetuada durante 10 minutos a 37°C . Após este período foi adicionado 250 μL de substrato BAPNA (1,25 mM), prosseguindo a

incubação por mais 15 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 60 µL de ácido acético 30 % (v/v) e a hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada fotometricamente à 410 nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas e, nos ensaios em branco, o substrato foi adicionado após a reação ter sido parada com adição de ácido acético na concentração final. O cálculo da atividade inibitória foi gerado a partir da determinação da atividade residual da tripsina no ensaio, de acordo com Erlanger e colaboradores (1961).

Outros testes de atividades inibitórias proteolíticas foram conduzidos por meio de ensaio enzimático com a amostra de precipitação por sulfato de amônio a 60%. Foi utilizado o homogenato intestinal de *S. frugiperda* como enzima de clivagem e substrato BApNA (1,25 mM). O meio de pré- incubação consistiu em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), 1 µL de homogenato intestinal de *S. frugiperda*, e diferentes concentrações da amostra (0 µg.ml⁻¹; 0,084 µg.ml⁻¹; 0,168 µg.ml⁻¹; 0,337 µg.ml⁻¹; 0,674 µg.ml⁻¹; 1,35 µg.ml⁻¹; 2,7 µg.ml⁻¹; 5,4 µg.ml⁻¹; 13,5 µg.ml⁻¹; 26,95 µg.ml⁻¹) completando um volume final de 500 µL. A pré-incubação foi efetuada durante 10 minutos a 37 °C. Após este período foram adicionados 250 µL de substrato BApNA (1,25 mM) prosseguindo-se a incubação por mais 15 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 60 µL de ácido acético (v:v). A absorbância foi medida a 410 nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas e, nos ensaios em branco, o substrato foi adicionado após a reação ter sido parada com adição de ácido acético na concentração final.

4.8. Análise estatística

A análise estatística ANOVA foi realizada pelo software SPSS ,com os dados dos ensaios de inibição. No primeiro ensaio foi utilizando delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 extrações (Tris-HCl, HCl, F1,F2 e F3) por 6 volumes (2,5 µL, 5 µL, 10 µL, 25 µL, 50 µL e 100 µL) seguido dos testes de media Waller-Duncan^{a,b} à 5%.

No segundo ensaio foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, avaliando as diferentes concentrações do extrato F2 utilizando o substrato BApNA. e das diferentes concentrações do extrato F2 utilizando o substrato Azocaseína, seguido dos testes de media Waller-Duncan^{a,b} à 5%.

No terceiro ensaio foi utilizado delineamento inteiramente casualizado, avaliando as diferentes concentrações do extrato F2 utilizando Homogenato intestinal da lagarta, seguido dos testes de media Waller-Duncan^{a,b} à 5%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando corada em Coomassie Brilliant Blue, a análise eletroforética do extrato de *C. urucurana* em tampão Tris-HCl apresentou cinco bandas proteicas equivalentes à massa molecular variando entre 15 e 25 kDa, enquanto que o extrato em HCl apresentou duas bandas de massa aproximada de 15 e 25 kDa, respectivamente. O perfil das amostras F1 e F2 obtidas a partir da precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentaram sete bandas com massa molecular variando de 15 a 40 kDa; enquanto que a F3 obteve quatro bandas de massas estimadas entre 15 e 40 kDa. O mesmo gel poliacrilamida foi também revelado com nitrato de prata (Figura 2), para obtenção de coloração ultrasensível que permitisse observar até 0,1 ng. de proteínas. A amostra do extrato em tampão Tris-HCl (50 mM e pH 8,0) apresentou 3 bandas proteicas com massa molecular correspondente a 35 a 45 kDa, cuja coloração com Coomassie não permitiu a visualização, a extração ácida apresentou 2 bandas com massa molecular variando entre 17 a 21 kDa e outra com 8 kDa, também não observadas no gel corado com *Coomassie*. As amostras submetidas à precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ apresentaram oito bandas proteicas para as frações F1 e F2, seis destas com massas moleculares entre 30 a 18 kDa e outras duas entre 15 a 9 kDa, e a F3 apresentou uma banda de aproximadamente 48 kDa e outra de 25 kDa que não haviam aparecido quando corado com *Coomassie*. Todas as amostras apresentaram bandas com massas moleculares de aproximadamente 9 kDa, estimada na literatura como faixa de inibidores do tipo Bowman Birk (BOWMAN, 1946; BIRK, 1963).

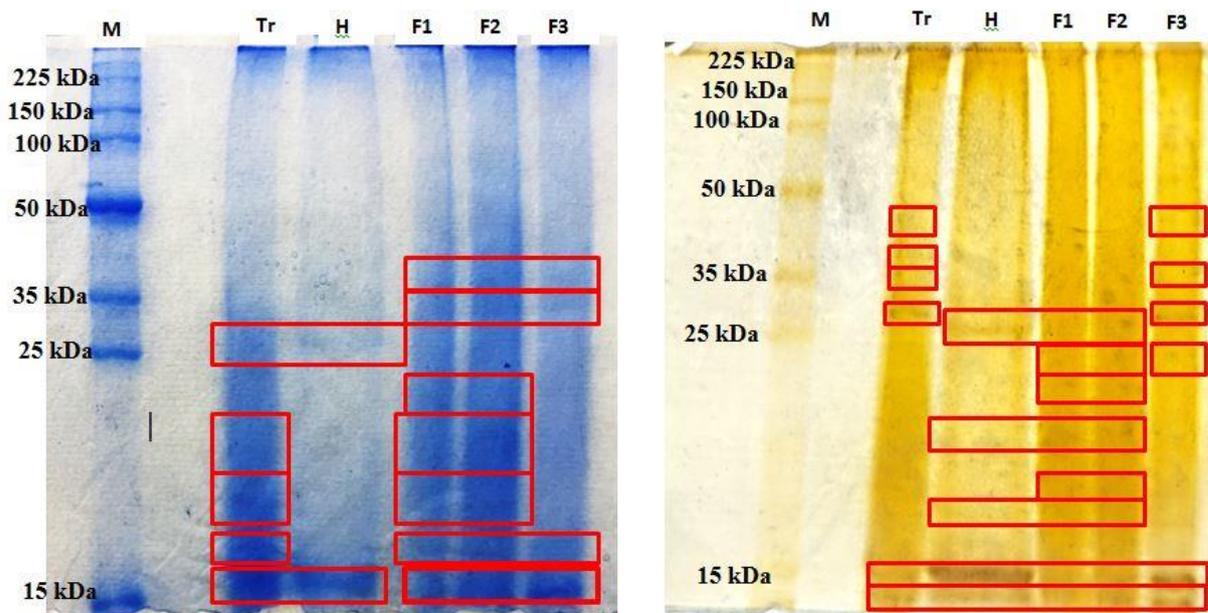


Figura 2: Eletroforese em SDS-PAGE 12%, (à esquerda) corado com *Coomassie Brilliant Blue* (à direita) revelado com nitrato de prata, do extrato obtido das folhas de *C. urucurana* em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 (Tr), extrato das folhas de *C. urucurana* em tampão ácido HCl 1000mM (H), e das precipitações em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do extrato bruto obtido com tampão Tris-HCl nas frações de F1, F2 e F3.

A extração de proteínas das áreas foliares tem alguns fatores complicadores, devido aos aspectos quantitativos destas biomoléculas nesse tecido vegetal. A fitomassa verde chega a 5% nas folhas, enquanto que nos tecidos de reserva (tubérculos, sementes, etc.) esse valor pode representar até 40% da massa (PIRIE, 1978). Devido a essa baixa concentração de fitomassa, a visualização no gel SDS-PAGE pode ter sido prejudicada, além da presença de pigmentos, flavonoides, carboidratos, capazes de gerar hiperpigmentação e ‘rastros’ durante a eletroforese.

E possível observar que a amostra extraída em tampão ácido obteve significativa redução na pigmentação, no entanto quando a mesma foi submetida à quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (Figura 3), percebeu-se considerável redução na concentração de proteínas ($40 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) em comparação às demais amostras, como p.ex. tampão Tris ($130 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$).

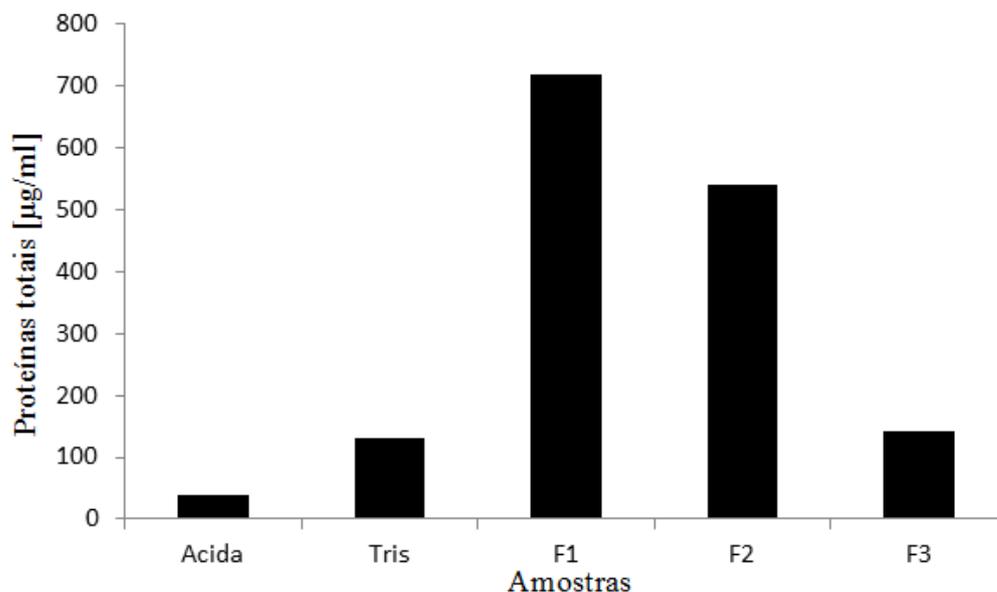


Figura 3: Concentração de proteínas totais nas amostras de Extrato Bruto obtido das folhas de *C. urucurana* [em tampão Acido (HCl 1M), Extrato Bruto obtido das folhas de *C. urucurana* em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8 e das precipitações em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do Extrato Bruto obtido com tampão Tris-HCl nas frações de F1,F2 e F3].

O baixo teor de proteínas em função do método de extração (solução tampão ácido) foi relatado em outros trabalhos na literatura. Carvalho, G. J. F. (2011) relatou que, tanto em sementes quanto em folhas de *Enterolobium schomburgkii* obteve-se baixo teor proteico em amostras submetidas à extração ácida.

Métodos alternativos, como o isolamento de proteínas por precipitações com sulfato de amônio, têm se mostrado mais eficazes, proporcionando resultados mais significativos em relação à concentração de proteínas totais, e principalmente para os inibidores de peptidases (PANDO et al., 2001; GOMES et al., 2005; BHATTACHARYYA e BABU, 2009).

A quantificação dos precipitados em suas respectivas frações obtiveram os seguintes resultados: $720 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de proteínas totais para F1, $540 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para F2 e $141 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para F3. Valores consideravelmente superiores aos da extração ácida, corroborando com a maior eficiência dessa metodologia.

Depois de estimada visualmente a presença de inibidores de peptidases em gel SDS- Page, foram realizados os ensaios preliminares da atividade antitriptica dos extratos, utilizando o substrato Azocaseína (1%). A azocaseína é um substrato não específico e muito usado preliminarmente nos experimentos para avaliar a atividade

enzimática dos inibidores mesmo quando não se tem a proteína purificada (IVERSEN, JØRGENSEN, 1995).

Nos ensaios de inibição foram testados os extratos em tampão Tris-HCl, tampão Ácido e precipitados F1, F2 e F3, nos volumes de 2,5 µL, 5 µL, 10 µL, 25 µL, 50 µL e 100 µL (Figura 4). Foi verificada diferença estatística significativa em função da natureza dos extratos ($p < 0,05$). A partir dos testes de media Waller-Duncan ($p < 0,05$) realizado entre e dentro das extrações, pode se observar que o precipitado F2 obteve a melhor atividade inibitória (aproximadamente 80% de inibição), quando comparada às extrações ácida, Tris-HCl, F1 e F3. A extração F1 demonstrou atividade inibitória de 70%, seguida de F3 e Tris, com atividade inibitória de 50 e 40% respectivamente. Já a extração ácida apresentou baixa atividade (30%), que pode estar relacionado à desnaturação de proteínas em contato com o HCl. De acordo com Burgess (2009), no precipitado F2 (30-60%) são esperadas as maiores concentrações de inibidores de peptidases, sobretudo da família Kunitz.

As maiores médias de inibição em contato com o precipitado F2 ocorreram entre os volumes de 5 a 25 µL, estatisticamente, não sendo observada diferença estatística significativa entre elas. Araújo (2014) apresentou resultados para a mesma fração (30-60%), utilizando extratos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.), inibindo em até 100% a atividade da enzima quando utilizado um volume de 100 µL, muito superior ao do *C. urucurana*.

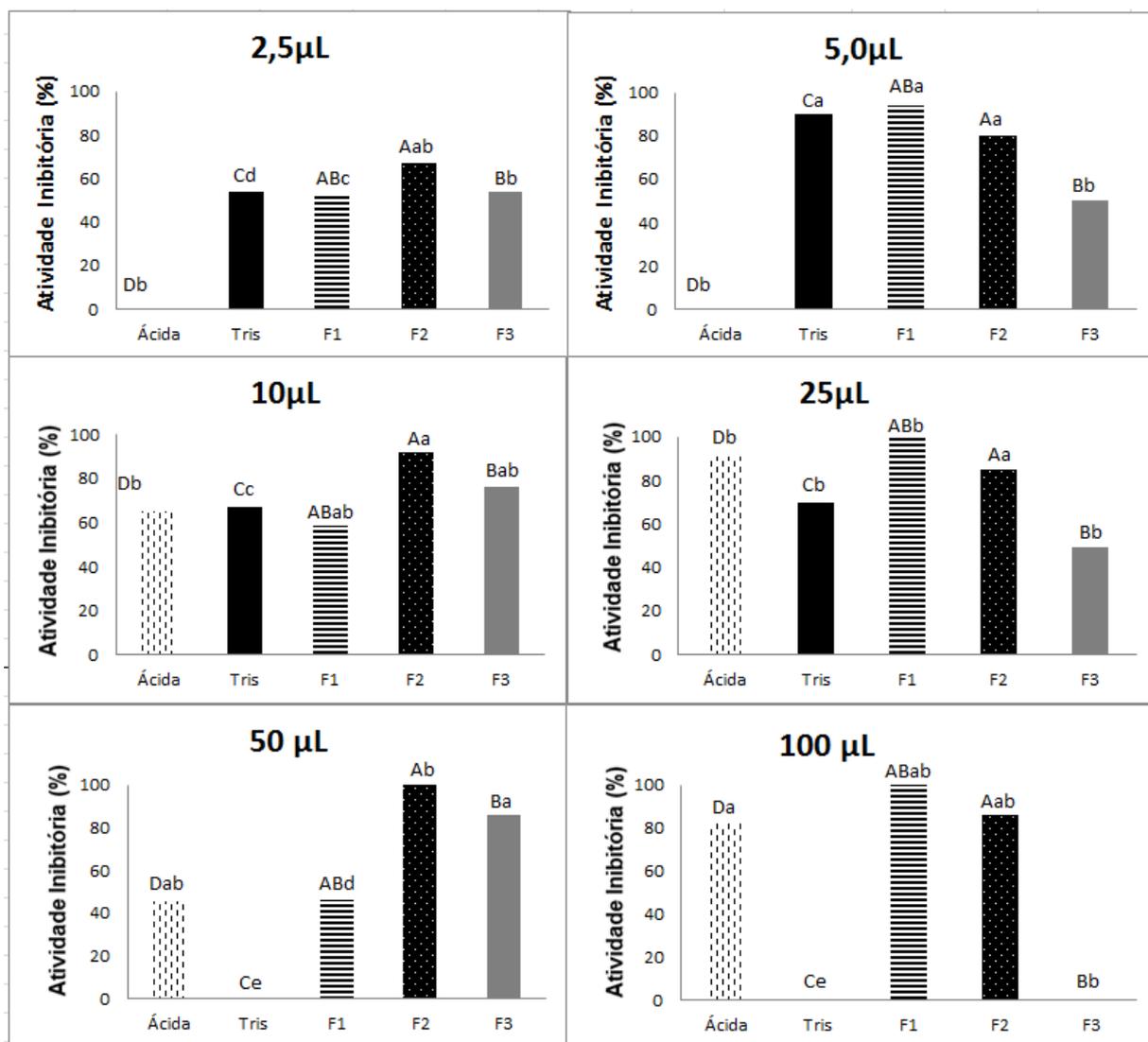


Figura 4: Porcentagem da atividade inibitória contra enzima tripsina ($0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$) utilizando os substratos azocaseína (1%) em seis volumes distintos ($2,5 \mu\text{L}$; $5 \mu\text{L}$; $10 \mu\text{L}$; $25 \mu\text{L}$; $50 \mu\text{L}$; $100 \mu\text{L}$) com Extrato Bruto obtido das folhas de *C. urucurana* em tampão Ácido (HCl 1000 mM), Extrato Bruto obtido das folhas de *C. urucurana* em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8 e das precipitações em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do Extrato Bruto obtido com tampão Tris-HCl nas frações de F1, F2 e F3. Letras maiúsculas distintas diferem as extrações entre si pelo teste Waller-Duncan á 5%. Letras minúsculas distintas diferem os volumes dentro das extrações pelo teste Waller-Duncan á 5%.

Em função dos resultados obtidos com azocaseína (1%), foram realizados os testes de atividade inibitória utilizando substrato específico BApNA ($1,25 \text{ mM}$) com a amostra F2. Além das concentrações já feitas, foi realizada diluição seriada ($0,674 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,337 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,168 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $0,084 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para observação em qual faixa de concentração mínima se tem a melhor atividade inibitória (Figura 5).

Para o substrato BApNA Pode-se observar que entre as concentrações de 1,35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 2,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 26,95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não ocorreu diferença estatística significativa, obtendo um media de atividade antitriptica de praticamente 80%. Podendo-se notar estabilização da atividade, independente das concentrações adicionadas. As concentrações 0,084 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 0,168 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 0,337 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 0,674 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ demonstraram atividade inibitória mediana, variando de 50 a 70%.

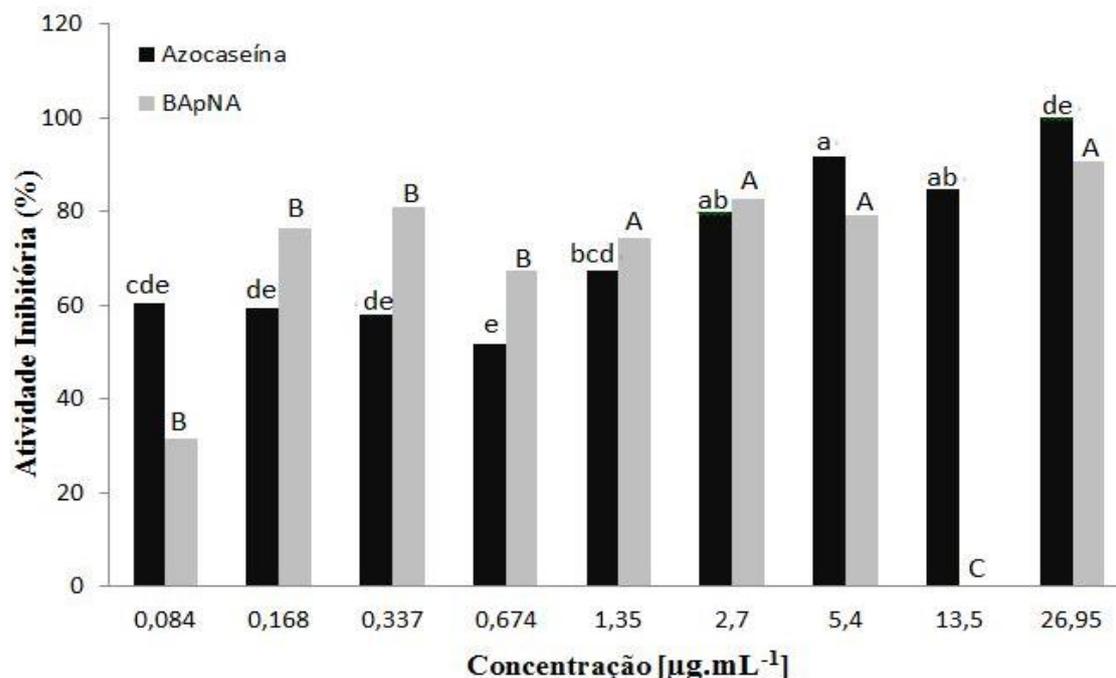


Figura 5: Porcentagem da atividade inibitória contra enzima tripsina (0,15 mg.mL^{-1}) utilizando os substratos azocaseína (1%) e BApNA (1,25 mM) em nove concentrações diferentes da fração F2 fracionado em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do Extrato Bruto obtido das folhas de *C. urucurana* em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. Letras maiúsculas distintas diferem as concentrações entre si, dentro de seus substratos, em substrato BApNA (1,25mM), pelo teste Waller-Duncan á 5%. Letras minúsculas distintas diferem as concentrações entre si, em substrato azocaseína (1%), pelo teste Waller-Duncan á 5%.

Há muitos estudos em relação à ampla distribuição dos inibidores nos diferentes tecidos vegetais. Vanderjagt et al. (2000) trazem resultados com as folhas de *Entada africana*, *Senna obtusifolia* e *Sesbania pachycarpa*, nos quais foram detectados inibidores de tripsina. Os inibidores de peptidases são proteínas constitutivas que permanecem armazenadas em tecidos de reserva da planta e, em função da sinalização exógena, em situação de estresse nutricional ou lesão mecânica, têm sua estrutura funcional modificada

pela ativação de genes que codificam o mecanismo de defesa da planta. (RYAN e MOURA 2002; SOUZA, DIAS, SILVA-FILHO, 2017).

A *Spodoptera frugiperda* é uma das maiores pragas da ordem Lepidoptera. Essa espécie se alimenta de uma vasta gama de culturas, sendo considerado um inseto polígrafo, resultando em perdas severas de rendimentos. De acordo com Terra e Ferreira (1994) em quase todas as espécies identificadas da ordem Lepidoptera, foi constatada a presença em grandes quantidades de serino endopeptidases no intestino médio desses insetos.

Nos testes realizados com o homogenato intestinal da *S. frugiperda* utilizando substrato BApNA (1,25 mM) (Figura 6), foi verificada diferença estatística significativa de atividade para as diferentes concentrações do precipitado F2. Com 2,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ obteve-se a melhor média de inibição das peptidases presentes no homogenato intestinal, aproximadamente 80%, e conforme a concentração de extrato diminuía, menor era a média de inibição observada, chegando a aproximadamente 45% de atividade inibitória em 0,084 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A partir disso observa-se que mesmo em baixíssimas concentrações de F2, ocorria atividade inibitória eficiente.

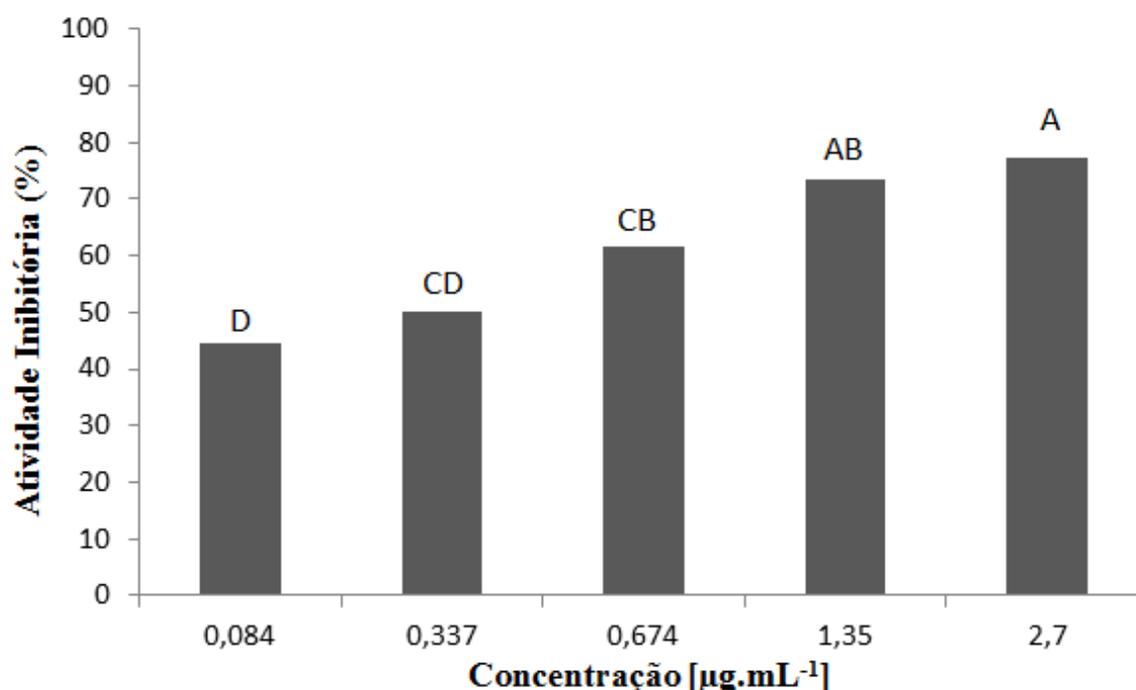


Figura 6: Porcentagem da atividade inibitória contra Homogenato Intestinal da lagarta *S. frugiperda* utilizando o substrato BApNA (1,25 mM) em cinco concentrações diferentes da fração F2 fracionado em $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do Extrato Bruto obtido das folhas de *C. urucurana* em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. Letras maiúsculas distintas diferem as concentrações entre si pelo teste Waller-Duncan á 5%.

A média de atividade inibitória considerada ideal para o controle de Lepidópteras é entre 50 a 80%, pois quando as lagartas são expostas aos inibidores com taxa alta de atividade, seu organismo sofre grande pressão, podendo induzir a polimorfismos ou mutações genéticas, desencadeando resistência pela praga ao inibidor e um curto período de tempo (SOUZA, et al. 2016).

Prospecção de inibidores em sementes de crotalaria (*Crotalaria pallida*) demonstram resultados promissores para inibição de enzimas digestivas de Lepdopteras como *Spodoptera frugiperda*, *Anastrepha grandis* e *Plodia interpunctella*, que foram inibidas em 100%, 98 e 67%, respectivamente (GOMES, et al. 2005).

Embora IPs vegetais sejam eficazes na inibição de peptidases digestivas de insetos, muitos autores têm mostrado que os insetos podem desenvolver estratégias para superar os efeitos dos inibidores. A *Spodoptera exigua* (Lepidoptera, Noctuidae) adapta-se à presença do efeito inibidor de peptidase da batata II através da síntese de tripsinas insensíveis (JONGSMA et al., 1995). Esses insetos se adaptam facilmente à presença desses inibidores por serem polívoros, isto é, se alimentam de uma ampla variedade de plantas.

Contudo, algumas plantas apresentam genes que codificam inibidores de peptidases em diferentes espécies, que podem ter evoluído para defendê-los contra pragas específicas e patógenos pertencentes a seus nichos ecológicos exclusivos, (HARUTA et al., 2001) dificultando o estabelecimento e adaptação desses insetos-pragas que se alimentam de um único tipo de cultura.

A aplicação de técnicas de Engenharia Genética tem se mostrado uma alternativa viável para a expressão de genes que codificam inibidores de peptidase em culturas ameaçadas por pragas agrícolas. Em um estudo realizado por Medeiros e colaboradores (2016) foi identificado um gene de cana-de-açúcar que codifica um conjunto de inibidores de peptidase conservados, o mesmo é visto como um gene promissor para abordagens transgênicas para melhoria da cana-de-açúcar, como já é realizado para maçãs, tomates, entre outros (ABDEEN et al., 2005; MAHESWARAN et al., 2007).

CONCLUSÃO

A partir do trabalho realizado foi possível constatar a presença de inibidores de peptidases serínicas em folhas de *C. urucurana*, através dos ensaios enzimáticos específicos realizados. Os resultados mostraram efeito inibitório significativo sobre a peptidase Tripsina Bovina, e quando testado com o homogenato intestinal da *S. frugiperda*, a atividade inibitória se manteve dentro da faixa de inibição considerada para a prospecção a campo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ainda é necessário prosseguir com testes *in vivo* em diferentes modelos agrícolas, e finalmente, para avaliar o modo de ação do composto, assim como o comportamento da praga em presença do inibidor em sua dieta.

Seria interessante estabelecer o protocolo de purificação dos possíveis inibidores presentes no extrato de *C. urucurana*, assim como identificar e/ou sequenciar a molécula a fim de empregar outros modelos de prospecção, considerando, sobretudo a expressão heteróloga do mesmo em culturas agrícolas, uma tendência biotecnológica cada vez mais utilizada no controle de pragas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEEN, A.; VIRGOS, A.; OLIVELLA, E.; VILLANUEVA, J.; AVILE'S, X.; GABARRA, R.; PRAT, S. A., Multiple insect resistance in transgenic tomato plants over-expressing two families of plant proteinase inhibitors. **Plant molecular biology**, vol. 57, n. 2, p. 189-202, 6 jan. 2005
- ADDOR. Insecticides. **Agrochemicals from Natural Products**. New York: **Marcel Dekker**, p. 1-63, 1995
- AFONSO, A. P. S.; WREGGE, M.; MARTINS, J. F. S; NAVA, D. E. et al. Simulação do zoneamento ecológico da lagarta-do-cartucho no Rio Grande do Sul com o aumento de temperatura. **Arquivos do Instituto Biológico**, Pelotas, vol. 76, p.607-612, 2009
- AKHTAR, Y.N.; ISMAN, M.B. Comparative growth inhibitory and antifeedant effects of plant extracts and pure allelochemicals on four phytophagous insect species. **Journal Of Applied Entomology**, p. 32-38. fev. 2004
- AMIRI, A.; BANDANI, A. R.; RAVAN, S. Effect of an anti-juvenile hormone agent (Precocene I) on Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Hemiptera: Scutelleridae) development and reproduction. **African Journal Of Biotechnology**, p. 9-9. 2010
- AMORIM, T. M. L. Avaliação da ação bioinseticida de SBTI e vicilina de *Erythrina velutina* em enzimas digestivas e membrana peritrófica de larvas de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) 81p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2007
- ARAÚJO, J.M.D., ALVES, J.C., PEIXOTO, T.K.O.D.N., MEDEIROS, A.F.D., MACHADO, R.J.D.A., SERQUIZ, A.C., NEVES, R.A.M.D., SANTOS, E.A.D., UCHÔA, A.F. AND MORAIS, A.H.D.A., Determination of antitryptic activity in proteins from peanut products isolated by affinity chromatography. **Química Nova**, vol. 37, n 10, p.1618-1623, 2014
- ÁVILA, C. J.; DEGRANDE, P. E.; GOMEZ, S. A. Insetos-praga: reconhecimento, comportamento, danos e controle. In: Empresa brasileira de pesquisa agropecuária. Milho informações técnicas, Dourados, p. 157- 180. 1997
- AZZOUZ, H.; CHERQUI, A.; CAMPAN, E. D. M.; RAHBE, Y.; DUPORT, G.; JOUANIN, L.; KAISER, L; GIORDANENGO, P., Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman–Birk inhibitor, on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera, Aphididae) and its parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphelinidae). **Journal of insect physiology**, vol. 51, n. 1, p. 75-86. 2005
- BHATTACHARYYA, A.; BABU, C.R. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. Seeds: Insight into structural and antimalarial features. **Phytochemistry**, vol. 70, p. 703-712, 2009

BIRK, Y., BONDI, A., GESTETNER, B., & ISHAAYA, I., A thermostable haemolytic factor in soybeans. **Nature**, n. 197, p. 1089-1090, 1963;

BODE, W; HUBER, R, Natural proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives of Insects Biochemistry**, vol. 204, n. 2, p. 433-451. 1992.

BOWMAN, D.E., Differentiation of soy bean antitryptic factors. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, vol. 63, n. 3, p.547-550, 1946.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. vol. 72, p. 248–254, 1976.

BURGESS, R.R., Protein precipitation techniques. *Methods in enzymology*, n. 463, p.331-342. 2009.

CARVALHO, G. J. F.; SOUZA, L. A. G.; SCHIMPL, F. C.; PANDO, S. C., Prospecção de inibidores de serinoproteinases em folhas de leguminosas arbóreas da floresta Amazônica. vol. 41, n. 1, p. 163-170, 2011.

Conab - Companhia Nacional de Abastecimento. Décimo Primeiro Levantamento Dezembro 2016, Safra 2015/2016. Brasília, Conab. p. 29, 2016.

COPPING, L. G.; HEWITT, H. G. Chemistry and mode of action of protection agents. Cambridge: CBAHWF, Royal Society of Chemistry, p. 145, 1998.

COSTA, M.A.G.; GRÜTZMACHER, A.D.; MARTINS, J.F. da S.; COSTA, E.C.; STORCH, G.; STEFANELLO JÚNIOR, G.J., Eficácia de diferentes inseticidas e de volumes de calda no controle de *Spodoptera frugiperda* nas culturas do milho e sorgo cultivados em várzea. **Ciência Rural**, v.35, p.1234-1242, 2005.

DE LEO, F.; VOLPICELLA, M.; LICCIULLI, F.; LIUNI, S.; GALLERANI, R.; CECI, L. R., PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. **Nucleic Acids Research**, vol. 30, n. 1, p. 347-348, 2002.

ERLANGER, B.F.; KOLOWSKY, N; COHEN, N. Preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n. 95, p 271-278, 1961.

FAN, S.G.; GUO-JIANG, W.U., Available from: <http://ejournal.sinica.edu.tw/bbas/content/2005/4/Bot464-01.html> Acesso em : 03/10/2016 2005.

FARIAS, J.R.; COSTA, E.C.; GUEDES, J.V.C.; ARBAGE, A.P.; B. NETO, A.; BIGO LIN, M.; PINTO, F.F., Managing the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*, and corn earworm, *Helicoverpa zea*, using Bt corn and insecticide treatments. **Journal of Insect Science**, v.13, p.1-10, 2013.

FORSTHOFER, E. L.; SILVA, P. R. F. D.; STRIEDER, M. L.; MINETTO, T. J.; RAMBO, L.; ARGENTA, G.; SANGOI, L.; SUHRE, E.; SILVA, A. A. D., Desempenho agrônomo e econômico do milho em diferentes níveis de manejo e épocas de semeadura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 41, n. 3, p. 399-407, 2006.

GARCÍA, A. Á.; CARRIL, E. P. U., Metabolismo secundário de plantas. **Reduca (Biología)**, vol. 2, n. 3, 2011.

GOMES, C.E.; BARBOSA, A.E.; MACEDO, L.L.; PITANGA, J.C.; MOURA, F.T.; OLIVEIRA, A.S.; MOURA, R.M.; QUEIROZ, A.F.; MACEDO, F.P.; ANDRADE, L.B.; VIDAL, M.S., Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). **Plant Physiology and Biochemistry**, vol. 46, n. 12, p. 1095-1102, 2005.

GUILLAUME, T.; RENAUD, S.; JEAN-PHILIPPE, D.; LAURENCE, D., Monitoring resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* in the field by performing bioassays with each Cry toxin separately. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. p. 108, 2013.

GURGEL, L. A.; SIDRIM, J. J. C.; MARTINS, D. T.; FILHO, V. C.; RAO, V. S., In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 409-412, 2005.

HARUTA, M.; MAJOR, I. T.; CHRISTOPHER, M. E.; PATTON, J. J.; CONSTABEL, C. P., A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology**, n. 46, p. 347-359, 2001.

IVERSEN, S.; JØRGENSEN, M., Azocasein assay for alkaline protease in complex fermentation broth. **Biotechnology Techniques**, v. 9, n. 8, p. 573-576, 1995;

JACKSON, A. O.; TAILOR, C. B., Plant-Microbe Interactions: Life and Death at the interface. **Plant Cell**, n. 8, p. 1651-1668, 1996.

JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W.J., Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant protease inhibitors by induction of gut protease activity insensitive to inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, n. 92, p. 8041-8045, 1995.

KAMIABI, F.; JAAL Z.; KENG C.L., Bioefficacy of crude extract of *Cyperus aromaticus* (Family: Cyperaceae) cultured cells, against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes. **Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine**, n. 3, p. 767-775, 2013.

KIM, S. I.; YOON, J. S.; JUNG, J. W.; HONG, K. B.; AHN, Y. J.; KWON, H. W., Toxicity and repellency of origanum essential oil and its components against *Tribolium castaneum* (Coleoptera; Tenebrionidae) adults. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, vol. 13, n. 1, p. 11-19, 2010.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, vol. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

- KOIWA, H.; SHADE, R.E.; ZHU-SALZMAN, K.; SUBRAMANIAN, L.; MURDOCK, L.L.; NIELSEN, S.S.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.M., Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. **The Plant Journal**, n. 14, p. 371–379. 1998.
- LAWRENCE, P. K. e KOUNDAL, K. R.. "Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects." **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 5, n. 1, p. 5-6, 2002;
- LIMA jr, I.S.; DEGRANDE P.E.; MELO, E.P.; BERTONCELLO, T.F.; SUEKANE, R., Infestação de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e seus inimigos naturais em milho nas condições de sequeiro e irrigado. **Revista Agrarian**, vol. 5, p. 14-19. 2012;
- LINGARAJU, M.H.; GOWDA, L.R. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. **Biochemical et Biophysical Acta**, v. 1784, p. 850–855. 2008;
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. "**Plantas Mediciniais no Brasil, 2ª edição**". Instituto Plantarum, Editora Nova Odessa", SP, 2008.
- MACEDO, M.L.R.; PANDO, S.C.; CHEVREUIL, L.R.; MARANGONI, S., 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**, v. 16, p. 1459-1465. 2009.
- MACEDO, M.L.R.; GARCIA, V.A.; FREIRE, M.G.M.; RICHARDSON, M., Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1104–1111, 2007.
- MAHESWARAN, G.; PRIDMORE, L.; FRANZ, P.; ANDERSON, M.A., A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants. **Plant Cell Rep.**, vol. 26, n. 6, p. 773–782, 2007.
- MALEC, K.; DIETRICH, R. A., Defence on Multiple Fronts: How Do Plants Cope with Diverse Enemies? **Trends Plants Science**, n. 4, p. 215-219, 1999.
- MEDEIROS, A.H.; MINGOSSO, F.B.; DIAS, R.O.; FRANCO, F.P.; VICENTINI, R.; MELLO, M.O.; MOURA, D.S.; SILVA-FILHO, M.C., Sugarcane Serine Peptidase Inhibitors, Serine Peptidases, and Clp Protease System Subunits Associated with Sugarcane Borer (*Diatraea saccharalis*) Herbivory and Wounding. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1444, 2016.
- MEDLOCK, J.M.; HANSFORD, K.M.; SCHAFFNER, F.; VERSTEIRT, V.; HENDRICKX, G.; ZELLER, H.; VAN BORTEL, W., A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, Vol. 12, p. 435–447, 2012.
- MEHRABADI, M.; BANDAMI, A. R.; SAADATI, F., Inhibition of sunn pest, *Eurygaster integriceps*, α -amylases by α -amylases inhibitors (T-AI) from triticale. **Journal of insect Science**, p. 10, 2010.

MEISSLE, M.; ROMEIS, J.; BIGLER, F., Bt maize and integrated pest management - a European perspective. **Pest Manage Sciences**, vol. 67, p. 1049–1058, 2011.

NEURATH, H.; (Eds) The versatility of proteolytic enzymes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v 32, n. 1, p. 35-49, 1986.

NEURATH, H.; BEYNON, R. J.; BOND, J. S The diversity of proteolytic enzymes. *Proteolytic enzymes - a practical approach*. Oxford: JRL Press, p. 259, 1990.

OPPERT, B., MORGAN, T.D., HARTZER, K., LENARCIC, B., GALESA, K., BRZIN, J., TURK, V., YOZA, K., OHTSUBO, K. AND KRAMER, K.J., Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinases and growth of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, vol. 134, n. 4, p. 481-490. 2003.

PALMEIRA Jr, S.F.; ALVES, V.L.; MOURA, F.S.; VIEIRA, L.F.; CONSERVA, L.M.; LEMOS, R.P., Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.16: p.397-402. 2006.

PANDO, S.C.; OLIVA, M.L.V.; SAMPAIO, C.A.M.; DI CIERO, L.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S., Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. **Phytochemistry**, vol. 57, p. 625-631, 2001.

PERES, M.T.L.P.; DELLE MONACHE, F.; CRUZ, A.B.; PIZZOLATTI, M.G.; Y UNES, R.A., Chemical composition and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, n. 3, p. 223-226, 1997.

PERES, M. T. L. P.; DELLE MONACHE, F.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J. B.; Y UNES, R. A.; RAWLINGS, N.D; BARRETT, A.J., Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmacological criteria used in their isolation. **Phytotherapy Research**, vol. 12, n. 3, p. 209-211, 1998.

PIRIE, N.W. Leaf protein and other aspects of fooder fractionation. **Cambridge University Press**, New York, NY, USA, p. 183, 1978.

RAWLINGS, N.D; BARRETT, A.J., Evolutionary families of peptidases. **Biochemical Journal**, vol. 290, p. 205-218, 1993.

RIBEIRO, N.A.; CASA, R.T.; BOGO, A.; SANGOI, L.; MOREIRA, E.N.; WILLE, L.A., Incidência de podridões do colmo, grãos ardidos e produtividade de grãos de genótipos de milho em diferentes sistemas de manejo. **Ciência Rural**, v. 21, n. 1, p. 1003-1009, 2005.

RIVERO, A.; VEZILIER, J.; WEILL, M.; READ, A. F., GANDON, S., Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem? **PLoS Pathogens**, p. 6, 2010.

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

RYAN, C. A.; MOURA, D. S., Systemic wound signaling in plants: a new perception. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 99, n. 10, p. 6519-20, 2002.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F., NEGRI, G.; Traditional uses, chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, n. 18, p. 11, 2007.

SANGOI, L., ARGENTA, G., REGIS FERREIRA DA SILVA, P., MINETTO, T.J. AND BISOTTO, V., Níveis de manejo na cultura do milho em dois ambientes contrastantes: análise técnico-econômica. **Ciência Rural**, v. 33, n. 6, p. 1021-1029, 2003.

SAVARY, S.; HORGAN, F.; WILLOCQUET, L.; HEONG, K. L., A review of principles for sustainable pest management in rice. **Crop Protection Journal**, vol. 32, p. 54–63, 2012.

SILVA, C. P.; TERRA, W. R.; LIMA, R. M.; Differences in midgut serine proteinases from larvae of bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. **Archives Insect Biochemistry and Physiology**, vol. 47, p. 18–28, 2001.

SILVA, C.P.; TERRA, W.R.; LIMA, R.M., Effects of *Croton urucurana* extracts and crude resin on *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 52, n. 3, p. 653–664, 2009.

SIMIONATTO, E.; BONANI, V.F.L.; MOREL, A.F.; POPPI, N.R.; RAPOSO JÚNIOR, J.L.; STUKER, C.Z., Chemical Composition and Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of the Essential oil of *Croton urucurana Baillon* (Euphorbiaceae) Stem Bark. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Vol. 18, n 5, p. 879-885, 2007.

SMITH, J. E. The natural history of the rarer lepidopterous insects of Georgia. **Journal of Entomologist**, London, p. 191, 1797.

SOUZA, T.P.; DIAS, R.O.; CASTELHANO, E.C.; BRANDAO, M.M.; MOURA, D.S.; SILVA-FILHO, M.C., Comparative analysis of expression profiling of the trypsin and chymotrypsin genes from Lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 196, p. 67-73, 2016.

SOUZA, T.; DIAS, R.; SILVA-FILHO, M. Defense-related proteins involved in sugarcane responses to biotic stress. **Genetics and Molecular Biology**, n. AHEAD, p. 0-0, 2017.

STOTZ, H. U.; KROYMANN, J.; MITCHELL-OLDS, T., Plant insects interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, n. 2, p. 268-272, 1999.

TABASHNIK, B.E.; GASSMANN, A.J.; CROWDER, D.W.; CARRIERE, Y., Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. **Nature Biotechnology**, vol. 26, p. 199–202, 2008.

TERRA, W. R. AND FERREIRA,C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 109B, n. 1, p. 1-62, 1994.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; BIANCHI, A. G. Action pattern, kinetical properties and electrophoretal studies of an alpha-amylase present in midgut homogenates from *Rhynchosciara americana* (Diptera) larvae. **Comparative Biochemistry Physiology**, vol. 56, p. 1-201-209, 1997.

THACKER, J. R. *An introduction to arthropod pest control*. Cambridge University Press, 2002;

TREMACOLDI, C. R. "Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas." *Embrapa Amazônia Oriental. Documentos*, 2009;

VALOIS, A. C. C. A biodiversidade e os recursos genéticos. Recursos genéticos e Melhoramento de plantas para o Nordeste Brasileiro, 2004; Disponível em: www.cpatsa.embrapa.br/livros/temas.html. Acesso em, 04/10/2016.

VALUEVA, T.A.; MOSOLOV, V.V., Protein inhibitors of proteinases in seeds: 1. Classification, distribution, structure, and properties. **Russian Journal of Plant Physiology**, n. 46, p. 362–378, 1999.

VAN DEN BERG, H., Global status of DDT and its alternatives for use in vector control to prevent disease. **Revista Ciência Saúde Coletiva**, vol. 16, p. 575–590, 2011.

VANDERJAGT, D.J.; FREIBERGER, C.; VU, H.T.; MOUNKAILA, G.; GLEW, R.S.; GLEW, R.H., The trypsin inhibitor content of 61 wild edible plant foods of Niger. **Plant Food for Human Nutrition**, vol. 55, p. 335-346, 2000.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E., Visceral leishmaniasis. **Infectious Disease Clinical of North America**, vol. 26, p. 309–322, 2012.

WALSH, T.A.; STRICKLAND, J.A., Proteolysis of the 85-kilodalton crystalline cysteine proteinase inhibitor from potato releases functional cystatin domains. **Journal of Plant Physiology**, n. 103, p. 1227–1234, 1993.

WAQUIL, J.M., Manejo fitossanitário e ambiental: milho transgênico Bt e resistência das plantas ao ataque da lagarta-do-cartucho, 2007. Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/ManFito/Index.htm. Acesso em: 20 fev. 2017.