**ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA AÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEINASE
DE SOJA SOBRE O DESENVOLVIMENTO E ATIVIDADE DAS
PROTEINASES INTESTINAIS DE LAGARTAS DA BROCA-DA-CANA
(*Diatraea saccharalis*) (FABR., 1794)**

PATRÍCIA POMPERMAYER

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **MÁRCIO DE CASTRO SILVA FILHO**

Dissertação apresentada à Escola superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Mestre em
Agronomia, Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Maio de 2000

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Pompermayer, Patrícia

Estudo *in vivo* e *in vitro* da ação de inibidores de proteinase de soja sobre o desenvolvimento e atividade das proteinases intestinais de lagartas da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) (FABR., 1794) / Patrícia Pompermayer. - - Piracicaba, 2000. 78 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2000. Bibliografia.

1. Broca da cana-de-açúcar 2. Dieta artificial 3. Inibidor de proteinase de soja 4. Planta transgênica I. Título

CDD 633.61

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AOS MEUS PAIS, ROSA MARIA E WALTER,
PELO CONSTANTE INCENTIVO E AMOR

OFEREÇO

À TODOS QUE DIRETA OU INDIRETAMENTE COLABORARAM PARA O
DESENVOLVIMENTO DESTES TRABALHOS

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho, professor do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), pela indispensável orientação, amizade, incentivo e apoio durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, professor associado do Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola (ESALQ/USP), pela orientação indispensável nos ensaios biológicos e amizade;

Ao Prof. Walter R. Terra, professor do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), pela oportunidade e orientação nos ensaios bioquímicos;

À Dra. Maria Cristina Falco pela inestimável amizade, auxílio na elaboração do “paper” e importantes contribuições ao trabalho apresentado;

Ao Prof. Dr. Ricardo Antunes de Azevedo, professor do Departamento de Genética (ESALQ/USP), amizade e valioso apoio;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de bolsa de estudo;

Aos funcionários, amigos e professores do Departamento de Genética da ESALQ/USP, pela oportunidade, apoio técnico, companheirismo e atenção recebido para a realização deste projeto;

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular de Plantas pela convivência, amizade e incentivo em todos os momentos, em especial ao técnico Rafael Colombi pelo auxílio e amizade;

À Adriana Rios Lopes, pela ajuda nos ensaios bioquímicos;

Aos amigos, professores e funcionários do Departamento de Entomologia da ESALQ - USP pelo apoio e amizade;

À Neide Graciano Zério, pela incansável colaboração, apoio durante a execução dos ensaios biológicos e amizade;

Aos funcionários do Setor de Biblioteca Central, pelos auxílios prestados;

À Marinéia de Lara Haddad e Aline de Holanda Nunes Maia pela valiosa ajuda na elaboração da tabela de vida de fertilidade;

À Copersucar, em especial ao Dr. Enrico De Beni Arrigoni e Maria José A. de Oliveira (Mazé); pela amizade, apoio e fornecimento de lagartas;

À Luciana Di Ciero, pela amizade e ajuda na extração dos inibidores de proteinase de sementes de soja;

À minha família, pelo estímulo e carinho indispensável;

Ao Umberto A. Sesso Filho pela paciência e apoio em todos os momentos;

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	vii
SUMMARY.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Broca da cana-de-açúcar (<i>D. saccharalis</i>).....	3
2.2 Aspectos da nutrição e digestão de insetos.....	7
2.3 Inibidores de proteinase.....	9
2.3.1 Efeito de inibidores de proteinase (IPs) sobre o desenvolvimento e metabolismo de insetos	11
2.3.2 Adaptação de insetos aos inibidores de proteinase (IPs).....	14
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Criação das lagartas em laboratório.....	15
3.2 Extração e purificação parcial dos inibidores de proteinase (IPs) de soja.....	16
3.3 Identificação das principais enzimas proteolíticas de <i>D. saccharalis</i>	16
3.3.1 Preparo do homogeneizado intestinal de <i>D. saccharalis</i>	16
3.3.2 Quantificação de proteína.....	17
3.3.3 Determinação da atividade enzimática.....	17
3.3.4 Ensaios de pH.....	18
3.3.5 Efeito <i>in vitro</i> de diferentes inibidores.....	19
3.4 Efeito <i>in vivo</i> dos inibidores de proteinase (IPs) de soja.....	19
3.4.1 Observações biológicas da broca da cana-de-açúcar.....	19
3.4.2 Ensaio biológico preliminar.....	22
3.4.3 Efeito dos inibidores de proteinase (IPs) de soja em duas gerações.....	23
3.4.4 Efeito da composição da dieta na resposta ao inibidor.....	24
3.4.5 Tabela de vida de fertilidade.....	25
3.4.6. Efeito dos inibidores de proteinase (IPs) de soja sobre a duração e desenvolvimento do período larval.....	26

3.4.6.1	Peso de lagartas.....	26
3.4.6.2	Número de ínstaes.....	27
3.5	Análises estatísticas.....	27
3.6	Efeito dos inibidores de proteinase (IPs) de soja <i>in vitro</i> após incorporação em dieta artificial.....	28
3.6.1	Inibidores de proteinase (IPs) de soja parcialmente purificados.....	28
3.6.2	Inibidores de proteinase (IPs) de soja puros.....	29
4	RESULTADOS.....	30
4.1	Identificação e caracterização das principais enzimas proteolíticas de <i>D. saccharalis</i>	30
4.2	Efeito <i>in vitro</i> de diferentes inibidores.....	31
4.3	Efeito <i>in vivo</i> dos inibidores de proteinase (IPs) de soja.....	33
4.3.1.	Ensaio preliminar.....	33
4.3.2	Efeito dos inibidores de proteinase (IPs) em duas gerações.....	34
4.3.3	Efeito da composição da dieta na resposta ao inibidor.....	37
4.3.4.	Tabela de vida de fertilidade.....	39
4.3.5	Efeito dos IPs de soja sobre a duração e desenvolvimento do período larval.....	44
4.3.5.1	Peso e tamanho de lagartas.....	44
4.3.5.2	Número de ínstaes.....	45
4.4	Efeito <i>in vitro</i> dos IPs de soja após a incorporação em dieta artificial.....	50
4.4.1	Inibidores de proteinase (IPs) de soja parcialmente purificados.....	50
4.4.2	Inibidores de proteinase (IPs) de soja puros.....	52
5	DISCUSSÃO.....	54
5.1	Identificação e caracterização das principais enzimas proteolíticas de <i>D. saccharalis</i> e efeito <i>in vitro</i> dos IPs de soja antes da incorporação em dieta artificial.....	54
5.2	Efeito <i>in vivo</i> dos inibidores de proteinase (IPs) de soja.....	56
5.3	Efeitos <i>in vitro</i> após incorporação dos IPs de soja em dieta artificial.....	60
6	CONCLUSÕES.....	63
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	64

**ESTUDO *IN VIVO* E *IN VITRO* DA AÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEINASE
DE SOJA SOBRE O DESENVOLVIMENTO E ATIVIDADE DAS
PROTEINASES INTESTINAIS DE LAGARTAS DA BROCA-DA-CANA
(*Diatraea saccharalis*) (FABR., 1794)**

Autora: PATRÍCIA POMPERMAYER

Orientador: Prof. Dr. MÁRCIO DE CASTRO SILVA FILHO

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar *in vivo* e *in vitro* a ação de inibidores de proteinase (IPs) de soja sobre o desenvolvimento e atividade das proteinases intestinais de lagartas da broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) (Fabr., 1794). Foram identificadas e caracterizadas as principais enzimas digestivas de *D. saccharalis*. As propriedades antimetabólicas dos IPs de soja, do tipo Kunitz e Bowman-Birk, foram determinadas *in vivo* e *in vitro*, antes e após a incorporação em dieta artificial, com avaliação do potencial de crescimento de populações da broca da cana. Baseando-se na hidrólise de substratos sintéticos específicos, dois picos de atividade triptica (pH 8,0 e 9,0) e a presença de um pico de atividade quimotriptica (pH 9,0) foram observados em lagartas de último ínstar. Conforme observado em outros lepidópteros, *D. saccharalis* apresentou pH ótimo alcalino para estas proteinases. A inibição da atividade da tripsina e da quimotripsina *in vitro* pelos IPs de soja sugeriu que ambos, Kunitz e Bowman-Birk, poderiam ter um efeito antimetabólico quando ingeridos pela lagarta. A incorporação dos IPs de soja, parcialmente purificados em dieta artificial de lagartas recém-eclodidas na concentração de 0,5% (p/p), reduziu significativamente o crescimento e desenvolvimento da broca refletindo no aumento do número e duração dos ínstaes, além da redução do peso larval e do alongamento das fases larval e pupal. No entanto, a ingestão dos IPs não influenciou a sobrevivência nem a segunda geração das lagartas mantidas em dieta artificial contendo estes inibidores. Além disso, houve um aumento

na atividade trípica e redução da porcentagem de inibição das mesmas pelos IPs, *in vitro*. Foi observado também que o valor nutricional da dieta afeta a resposta do inseto ao inibidor. Por meio de estudos de tabela de vida de fertilidade, menores valores da taxa líquida de reprodução (R_o), capacidade inata de aumentar em número (R_m), razão finita de aumento (λ), maiores durações de média de uma geração (T) e tempo para a população duplicar (Dt) foram obtidas para adultos provenientes de dieta contendo os IPs. As diferenças observadas refletem na redução do crescimento da população, indicando um alto potencial dos IPs na proteção de plantas de cana-de-açúcar contra os danos provocados pela broca da cana.

**IN VIVO AND IN VITRO STUDIES OF PROTEINASE INHIBITOR ACTION ON
THE DEVELOPMENT AND MIDGUT PROTEINASE ACTIVITIES OF THE
SUGARCANE BORER (*Diatraea saccharalis*) (FABR., 1794)**

Author: PATRÍCIA POMPERMAYER

Adviser: Prof. Dr. MÁRCIO DE CASTRO SILVA FILHO

SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate, *in vivo* and *in vitro*, the action of soybean proteinase inhibitor (SPI) on the development and midgut proteinase activities of the sugarcane borer (*Diatraea saccharalis*) (Fabr., 1794). The major proteinase activities of *D. saccharalis* were characterized. The antimetabolic properties of the SPI, Kunitz and Bowman-Birk *in vitro*, before and after incorporation into artificial diet, *in vivo*, and its interference on population increase potential of the pest have been evaluated. Based on hydrolysis of the synthetic substrates, two major trypsin activities were identified (pH 8.0 and 9.0) and also a chymotrypsin activity with an optimum pH at 9.0. *D. saccharalis* trypsin and chymotrypsin display alkaline pH optima, as observed to most Lepidoptera insects. The inhibition of trypsin and chymotrypsin activities *in vitro* by SPI suggested that either, Kunitz and Bowman-Birk, could have a potential antimetabolic effect when ingested by these insect larvae. The incorporation of semi-purified extract SPI into an artificial diet of neonate larvae at 0.5% (w/w), significantly reduced the growth and development of the insect, reflecting an increase of the instar number and duration, and a significantly lower average weight. However, ingestion of SPI did not influence larval survival and the second generation of larvae fed SPI diet. In addition, there was an increase of the level of tryptic activity and a decrease of inhibition by the SPI *in vitro*. It was also observed that the diet nutrition value affects the insect susceptibility to the inhibitor. Studies on the fertility life table

showed that lower net reproduction rates (Ro), instantaneous rate of increase (Rm) and finite ratio of increase (λ) and the higher mean generation time (T) and the doubling time (Dt) were obtained from adults reared on diet supplemented with SPI. The observed differences potentially translate into large differences in population growth, indicating a potential value of SPI for protecting sugarcane plants against damage by *D. saccharalis*.

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica para alguns países das Américas, especialmente o Brasil, que apresenta a maior área cultivada e ocupa a primeira posição em produção, em termos mundiais (FNP Consultoria & Comércio, 2000).

No Estado de São Paulo esta cultura sofre o ataque de inúmeros insetos-pragas, os quais se constituem, muitas vezes, em fatores limitantes à produção sucro-alcooleira. Dentre estes, destaca-se a broca-da-cana, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794), que é uma das pragas mais importantes da cultura da cana-de-açúcar no Brasil, não só pelos danos econômicos que ocasiona à agroindústria sucro-alcooleira, mas também pelas dificuldades de controle devido ao seu hábito alimentar (Vendramin, 1987).

Embora já há alguns anos o seu controle venha sendo realizado de forma biológica, especialmente através do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Degaspari et al., 1987), recentemente novas estratégias vêm sendo testadas com o objetivo de reduzir os danos causados pelos insetos pragas. A engenharia genética, aliada ao estabelecimento de protocolos eficientes de transformação genética da cultura, tem propiciado alternativas importantes ao controle das pragas. Dentre os genes que codificam proteínas, com propriedades antimetabólicas aos insetos, destacam-se os inibidores de proteinase.

Inúmeros estudos demonstraram que os inibidores de proteinase, presentes em dietas artificiais ou em plantas transgênicas, são capazes de interferir no crescimento e desenvolvimento de um grande número de insetos (Ryan, 1990). Ensaio biológicos, nos quais inibidores são incorporados em dietas artificiais de insetos, fornecem uma valiosa informação sobre os tipos de inibidores com potencial para serem usados como fatores

de resistência na manipulação genética e programas de melhoramento de plantas (Johnson et al., 1993).

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a atuação dos inibidores de proteinase de soja, presentes em dietas artificiais, sobre as proteinases digestivas de lagartas de *D. saccharalis* e avaliar os efeitos sobre o desenvolvimento e biologia de lagartas de *D. saccharalis*, visando a produção de plantas transgênicas de cana-de-açúcar expressando inibidores de proteinase de soja, a fim de auxiliar no controle desta praga.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Broca da cana-de-açúcar (*D. saccharalis*)

O Brasil é hoje o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo ocupando cerca de 4,9 milhões de hectares no território brasileiro. Mais da metade desta área encontra-se no Estado de São Paulo, de onde provém aproximadamente 52% da produção nacional desta cultura, estimada em cerca de 339 milhões de toneladas (FNP Consultoria & Comércio, 2000).

Na cidade de Piracicaba, a cultura da cana-de-açúcar representa 35% da área do município (47.000 hectares), gerando 6.100 do total de 7.150 empregos rurais (85%) segundo a União da Agroindústria Canavieira do Estado de São Paulo (Fernandes, 1999).

A agroindústria canavieira é responsável por milhões de empregos, o que evidencia a importância social da cultura (Sgrillo, 1979), e geração de divisas pelo açúcar e o álcool, além do aproveitamento racional de biomassa vegetal, gerando energia elétrica e produtos para a indústria alcoolquímica e para a alimentação animal, entre outros (Raizer, 1998).

A produção de açúcar é regulada tanto pela produtividade da cultura como pelo rendimento industrial. Dentre os fatores que interferem nesse dois itens encontra-se um inseto-praga, a broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794) (Lepidoptera, Crambidae) (Sgrillo, 1979).

A broca da cana-de-açúcar foi descrita pelo naturalista Jonhann Christian Fabricius em 1794, sob o nome de *Phalaena saccharalis*, um inseto-praga da cana-de-açúcar na América do Sul. Alguns autores mencionam ser esta espécie originária das

Antilhas, América Central e do Sul, sendo que nos EUA foi introduzida em 1856. No Brasil foi Gustavo D'utra em 1880 quem pela primeira vez ocupou-se desta praga, apresentando seu desenho e uma descrição. Além da cana-de-açúcar, as lagartas deste inseto atacam outras gramíneas, sendo consideradas prejudiciais ao milho, arroz e sorgo (Guevara, 1976). Embora atacando elevado número de gramíneas, *D. saccharalis* gera prejuízos significativos à cana-de-açúcar (Mattos, 1982).

A broca-da-cana é uma das principais pragas da cana-de-açúcar na região Centro-Sul e, sem dúvida, a praga mais conhecida na indústria açucareira. Os prejuízos causados por ela são bastante significativos e sua ampla distribuição nos canaviais brasileiros (Câmara & Oliveira, 1993; Paranhos, 1987) e em diversos países da América do Sul, Central e do Norte, a tornam uma praga de grande importância econômica (Valsechi et al., 1976; Gallo, 1985/86; Paranhos, 1987).

A lagarta mede, quando completamente desenvolvida, cerca de 25 mm de comprimento por aproximadamente 3 a 3,5 mm de diâmetro. Ao eclodirem, as lagartas medem mais ou menos 1 mm de comprimento, sendo que, a cabeça tem o comprimento 1,5 vezes o diâmetro do corpo (Valsechi et al., 1976). Após a eclosão, as lagartas permanecem no colmo, onde completam o desenvolvimento larval (Sgrillo, 1979). A partir do terceiro mês após o plantio, quando ocorre a formação dos primeiros internódios, os danos tornam-se significativos. Inicialmente os danos são observados em brotos ou perfilhos novos, que têm sua gema apical afetada pelas lagartas da praga, resultando na morte da gema, secamento das folhas mais novas e, posteriormente, seca e morte do broto ou perfilho atacado. Este sintoma é conhecido como "coração morto" e permite visualizar a condição inicial de infestação de um canavial. Pode ocorrer a morte da gema apical nos colmos em desenvolvimento, causando o secamento das folhas e induzindo a brotação das gemas laterais e enraizamento aéreo, fatos que contribuem negativamente na produção e na qualidade da matéria prima (Valsechi et al., 1976; Sgrillo, 1979). Outro tipo de dano é causado pela praga no interior do colmo, escavando galerias e alimentando-se dos tecidos da planta. As galerias longitudinais nos colmos provocam a perda em açúcar, porém as galerias circulares escavadas nos colmos causam a quebra das canas, o que interfere de maneira mais significativa na produção e no teor

de açúcar (Hayward, 1943; Gallo, 1968; Valsechi et al., 1976). Através dos orifícios abertos pelas larvas, ocorre a penetração de fungos dos gêneros *Fusarium* e *Colletotrichum*, que causam a podridão vermelha e provocam a inversão da sacarose (as plantas invadidas por esses patógenos reagem, produzindo substâncias de defesa a partir da sacarose), em glucose e levulose, dificilmente cristalizáveis pelos processos industriais comuns, com a conseqüente redução no teor de açúcar (Hayward, 1943; Valsechi et al., 1976; Castilho, 1982; Bastos, 1987). Isto pode gerar perdas de 50 a 70,0% da sacarose em colmos atacados (Bastos, 1987). Estes valores representam danos indiretos ocasionados pela broca da cana (Gallo, 1968; Valsechi et al., 1976).

Os levantamentos de danos são realizados por ocasião da colheita da cana, coletando-se pelo menos 20 canas/ha, rachando-se longitudinalmente os colmos e efetuando-se a contagem dos entrenós totais e dos entrenós danificados pela broca. A Intensidade de Infestação (I.I.) é a porcentagem dos entrenós brocados em relação ao total examinado. A infestação é a porcentagem de canas brocadas em relação ao total examinado. Para a determinação das perdas industriais de açúcar e álcool são necessárias análises tecnológicas da cana-de-açúcar, comparando-se amostras infestadas e não infestadas ou amostras com diferentes níveis de infestação pelo complexo broca-podridões sendo que os danos variam de acordo com as cultivares (Vendramin, 1987). Experimentos conduzidos em telados e campo indicam que para cada 1% de I.I. ocorrem perdas de 0,77% na produção de cana, acrescidas de 0,25% na produção de açúcar e 0,20% na produção de álcool (Almeida et al., 1997).

As lagartas após sua penetração no interior do colmo estão protegidas, sendo difícil controlá-las por métodos culturais, mecânicos ou químicos (Bergamin, 1948a; Bergamin, 1948b; Guevara, 1976). Embora o controle químico apresente, a curto prazo, uma maior eficiência de controle, a sua aplicação nos canaviais não apresenta os mesmos resultados obtidos no controle de pragas de outras culturas, em virtude, principalmente, da praga passar a maior parte de sua fase larval dentro do colmo, onde o inseticida não a atinge. Além disso, devido ao porte da cultura, as aplicações são muito onerosas. É possível controlar a broca-da-cana com inseticidas durante o período em que há ovos ou poucos dias antes da entrada no colmo (Hayward, 1943). O perigo potencial

da poluição ambiental, o uso indiscriminado de inseticidas, o efeito adverso em organismos benéficos, a resistência adquirida pelos insetos e o aumento das restrições legais ao comércio internacional de produtos agrícolas com resíduos tóxicos, são alguns dos pontos que devem ser considerados quando se pretende a utilização de inseticidas (Sgrillo, 1979). É sabido que muitas espécies de insetos da ordem Lepidoptera desenvolveram resistência a pesticidas convencionais e, portanto, novos métodos de controle são necessários (Lee & Anstee, 1995).

O controle biológico da broca da cana-de-açúcar utilizando parasitóides larvais é uma prática comum nos canaviais paulistas e brasileiros desde a década de 50. Nos últimos anos utiliza-se praticamente só o parasitóide importado *Cotesia flavipes* (Cam.). Entretanto, existem áreas em que estes parasitóides não conseguem controlar eficientemente a praga, por problemas climáticos e/ou de não adaptação, ou mesmo devido à baixa predação da fase de ovos da broca-da-cana. Desta forma, vem sendo estudado o microhimenóptero *Trichogramma galli* Zucchi, 1988, que é um parasitóide de ovo, encontrado parasitando ovos de *D. saccharalis* no Estado de São Paulo e em outras parte do País (Pinto, 1999). Segundo Parra (1998), este parasitóide já vem sendo produzido massalmente e suas liberações inundativas mostram que ele é um eficiente regulador da população de *D. saccharalis* no Brasil. Resultados de pesquisa de campo mostram tal viabilidade de utilização (Botelho et al., 1999).

As variedades comerciais de cana-de-açúcar são obtidas de esquemas de seleção que consomem de doze a quinze anos, nos quais os melhoristas identificam alguns clones-élite a partir de uma grande população de “seedlings”. Estes clones algumas vezes são abandonados por apresentarem pequenos, mas importantes defeitos, como por exemplo a susceptibilidade a alguma doença. A correção destas falhas por meio de técnicas tradicionais de melhoramento é impraticável na cultura da cana-de-açúcar, devido à sua complexidade genética e aos longos períodos necessários em cada ciclo de seleção para características de importância agrônômica, como por exemplo a capacidade de enraizamento (Birch, 1996). Todas estas limitações, aliadas à capacidade de rápida propagação vegetativa, tornaram a cana-de-açúcar uma cultura bastante conveniente para a aplicação de técnicas de transformação genética.

Durante os últimos anos, uma nova estratégia tem sido desenvolvida para oferecer proteção às culturas, reduzindo o nível de pesticidas no meio ambiente e atingindo as pragas mais especificamente. Ela consiste na transferência de genes de resistência a pragas, em plantas de interesse econômico via Engenharia Genética (Belzunces et al., 1994). Dentre os genes em estudo, destacam-se os genes cujos produtos exercem um efeito antimetabólico, como os inibidores de proteinase (Hilder et al., 1987; Johnson et al., 1989).

2.2 Aspectos da nutrição e digestão de insetos

Os insetos têm como exigências nutricionais básicas aminoácidos, vitaminas e sais minerais (nutrientes essenciais) e carboidratos, lipídeos e esteróides (nutrientes não essenciais), os quais devem ser adequadamente balanceados, especialmente na relação proteína:carboidratos. O consumo e utilização de alimento constituem condição básica para crescimento, desenvolvimento e reprodução. Desta forma, a quantidade e qualidade do alimento consumido na fase larval afetam a taxa de crescimento, o tempo de desenvolvimento, peso do corpo, sobrevivência, bem como influenciam a fecundidade, longevidade, movimentação e capacidade de competição de adultos (Parra, 1991).

A criação de insetos, sob condições controladas, é necessária para a realização de pesquisas em muitos campos da Entomologia, sendo que informações básicas da biologia e comportamento de insetos tem servido como guia para o desenvolvimento de certos tipos de controle (Parra, 1979). No Brasil, desde 1970 são utilizadas “dietas artificiais” para a criação da broca da cana-de-açúcar em laboratório, onde os componentes são dosados de tal forma que permitem o fornecimento de nutrientes essenciais ao desenvolvimento da fase larval de *D. saccharalis*. Esses nutrientes são homogeneizados e estabilizados em uma mistura, de consistência apropriada, que favorece o desenvolvimento dos insetos (Araújo, 1987).

A digestão é realizada por uma série de enzimas que atuam em seqüência e vão reduzindo os polímeros presentes no alimento (principalmente amido e proteínas) a

fragmentos de tamanho cada vez menor. As enzimas que agem primeiro sobre os polímeros são chamadas de enzimas de digestão inicial, ou polímero-hidrolases. Dentre essas, encontra-se a amilase, enzima que quebra o amido, principal carboidrato dos alimentos e a tripsina (proteínase), enzima que quebra proteínas sendo a mais difundida no reino animal (Terra & Ferreira, 1991).

O desempenho de cada estágio de vida do inseto depende basicamente do sucesso do estágio anterior em obter, sintetizar e acumular as substâncias nutricionais em quantidades apropriadas (Parra, 1991).

As proteases são enzimas que hidrolizam ligações peptídicas. Elas podem ser divididas em três grandes grupos: as proteinases, que clivam ligações peptídicas internas em proteínas; as peptidases, que atacam seqüencialmente as ligações de oligopeptídeos a partir do resíduo N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxipeptidases) e as dipeptidases que hidrolizam dipeptídeos. As proteinases são classificadas na base de seu mecanismo catalítico em: serino-proteinase, cisteino-proteinase, aspartato-proteinase e metaloproteinases (Terra, 1991).

A maior parte dos insetos da ordem Lepidoptera possui proteinases do tipo serina, tais como enzimas do tipo tripsina e quimotripsina, para a proteólise das proteínas ingeridas (Masoud et al., 1993).

Com os progressos obtidos a partir da caracterização do processo digestivo dos insetos, notadamente o mecanismo de digestão das proteínas pelas proteinases intestinais (Terra, 1991; Terra & Ferreira, 1994), foi possível o desenvolvimento de estratégias que interferissem no processo, resultando em plantas tolerantes a pragas. Os produtos químicos produzidos pelas plantas podem ser mais importantes que qualquer outro fator isolado no controle dos insetos na natureza (Maugh, 1982), e talvez o melhor método para conseguir o controle de pragas seja o de fortalecer o próprio sistema de defesa das plantas contra o ataque dos insetos, uma vez que este procedimento não deve causar problemas ecológicos (Shields, 1987). Este objetivo vem sendo tentado via expressão de genes heterólogos em plantas de interesse econômico através de engenharia genética.

Diferentes abordagens estão sendo exploradas para se obterem plantas resistentes a insetos. A principal abordagem é baseada nas δ -endotoxinas originárias da

bactéria *Bacillus thuringiensis*, e o auge deste processo ocorreu em 1996 quando a primeira geração de plantas inseticidas foi introduzida no mercado. As δ -endotoxinas são solubilizadas no intestino do inseto e são ativadas pelas proteases intestinais que clivam a pró-toxina em pequenos polipeptídeos (toxina). Esta toxina se liga à superfície das células epiteliais do intestino, induzindo lesões que destroem as células e levam à morte do inseto. Os primeiros resultados referentes a transferência de genes do *B. thuringiensis* em tabaco e tomate foram publicados em 1987. Desde então, diversos genes do *B. thuringiensis* têm sido transferidos para inúmeras espécies de plantas (Jouanin et al., 1998).

Arencibia et al. (1997) mostraram que plantas de cana-de-açúcar transformadas com o gene *cryIA(b)*, do *Bacillus thuringiensis*, que codificam a δ -endotoxina possuem significativa atividade larvicida contra a broca da cana-de-açúcar. Além disso, num trabalho posterior os autores avaliaram uma população de 42 clones de canas-de-açúcar transformadas com o este mesmo gene (*cryIA(b)*) sob o ataque de *D. saccharalis* e verificaram uma consistente resistência à broca associada à boas características agronômicas (Arencibia et al., 1999).

Outra estratégia é o uso de genes derivados de plantas que apresentam atividade antimetabólica. Tem sido mostrado que diversas classes de proteínas de plantas conferem proteção contra um grande número de insetos-praga que são economicamente importantes. Assim, genes codificando proteínas com efeito no metabolismo dos insetos têm sido isolados de várias espécies de plantas e transferidos para culturas por engenharia genética. Entre esses genes estão aqueles que codificam inibidores de proteinase.

2.3 Inibidores de proteinase

Os inibidores são moléculas protéicas capazes de se associar com proteinases, a fim de formar complexos estequiométricos, inibindo competitivamente todas as funções catalíticas das enzimas proteolíticas (Xavier-Filho, 1992).

Os inibidores de proteinase são amplamente distribuídos em plantas, animais e microrganismos e seus papéis em plantas estão associados a um mecanismo de defesa contra as pragas (Lee et al., 1999). As plantas são capazes de reagir contra uma série de condições estressantes via alteração na expressão de genes capazes de adaptá-las à nova situação. Basicamente, este processo envolve o acúmulo de uma série de proteínas de defesa que incluem os inibidores de proteinase (IPs) (Balandin et al., 1995). Os IPs podem também apresentar um papel fisiológico na forma de proteína de reserva das sementes (Xavier-Filho, 1992). Uma grande variedade dos inibidores de proteinase tem sido estudada para utilização na proteção das culturas (Lee et al., 1999).

Os IPs reduzem a atividade proteolítica de enzimas digestivas para um grande número de espécies de insetos (Christeller & Shaw, 1989; Wolfson & Murdock, 1987). O crescimento de algumas espécies de insetos é significativamente reduzido pela ingestão crônica destes inibidores incorporados em dietas artificiais (Broadway & Villani, 1995; Johnson et al., 1993) ou quando presentes em níveis elevados na planta (Orozco-Cardenas et al., 1993). Assim, é possível que a presença de IPs limite o consumo de algumas plantas por alguns insetos herbívoros (Broadway, 1997). Entretanto, tem-se descoberto que algumas espécies de insetos não são susceptíveis aos inibidores de proteinase. Normalmente, estas espécies de insetos secretam enzimas digestivas que são pouco afetadas por certos inibidores de proteinase. Portanto, a ingestão deste IPs não afeta necessariamente o crescimento e/ou desenvolvimento deste insetos (Broadway & Villani, 1995; Broadway, 1995; Paulillo et al., 2000).

Diferentes classes de proteínas em plantas mostraram ser inseticidas para uma grande número de insetos pragas de importância econômica, quando testadas em dietas artificiais ou plantas transgênicas (Gatehouse & Gatehouse, 1998). Os inibidores de proteinase (IPs) formam complexos altamente estáveis com as proteases digestivas e apresentam lenta dissociação. A inativação da proteólise intestinal leva a uma sub-utilização dos nutrientes, retarda o desenvolvimento e pode causar morte por desnutrição (Gatehouse et al., 1998).

Os inibidores de proteinase melhor caracterizados são os inibidores das serino-proteinases. Eles são encontrados em altas concentrações em sementes de leguminosas e

em quantidades menores em cereais e tubérculos (Richardson, 1991). Um número significativo de inibidores das cisteíno-proteinases também são conhecidos (Abe et al., 1992), embora poucos foram identificados para aspartato- e metalo-proteinases. Os inibidores de serino proteinase são agrupados em 16 famílias, baseando-se na similaridade de sua seqüência e no mecanismo de ligação à proteína (Ryan, 1990).

As proteinases digestivas do tipo serina têm sido indicadas como alvos para mecanismos de resistência contra pragas pertencentes à ordem Lepidoptera (Gatehouse et al., 1998). Dentre as espécies vegetais mais estudadas, as plantas de batata, tomate e soja apresentam duas pequenas famílias de genes que codificam dois inibidores de serino-proteinases, chamados inibidores do tipo I e II. O inibidor do tipo I inibe proteinases do tipo quimotripsina, enquanto o inibidor do tipo II possui dois sítios de inibição, um para tripsina e um outro para quimotripsina (Atkinson et al., 1993). No caso das plantas de soja em particular, duas classes de inibidores de proteinase são bem caracterizadas: os inibidores do tipo Kunitz e o Bowman-Birk. Os inibidores do tipo Kunitz apresentam um peso molecular da ordem de 20.000 Da e possuem uma especificidade direcionada contra as tripsinas. O inibidor do tipo Bowman-Birk, apresenta um peso molecular de 6.000 a 10.000 Da e possui uma atividade inibitória contra as tripsinas e quimotripsinas (Liener, 1994). Além de sua atividade inibitória, o inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz (SKTI) é uma das principais proteínas armazenadas nas sementes (Lee et al., 1999).

2.3.1 Efeito de inibidores de proteinase (IPs) sobre o desenvolvimento e metabolismo de insetos

Inúmeros estudos têm demonstrado que os inibidores de proteinase (IPs), presentes em dietas artificiais ou em plantas transgênicas, são capazes de interferir no crescimento e desenvolvimento de um grande grupo de insetos (Ryan, 1990). Jongsma et al. (1996) mostraram que os inibidores de proteinase da soja foram efetivos contra as tripsinas de *Manduca sexta* (Linnaeus), e contra as elastases de *Teleogryllus commodus* (Walker).

Estas observações sugerem que estes inibidores, quando incorporados em dietas artificiais, podem retardar o desenvolvimento larval do inseto.

Steffens et al. (1978) estudaram os efeitos dos inibidores de tripsina de soja no crescimento e metamorfose de *Ostrinia nubilalis* (Hübner), e observaram que a incorporação de 2 a 5% (p/p) do inibidor do tipo Kunitz na dieta artificial inibiu o crescimento larval e atrasou a pupação dos insetos, embora não tenha impedido a conclusão do ciclo vital. Em lagartas de *Manduca sexta* (Linnaeus) a incorporação de 0,5% (p/p) do inibidor do tipo Kunitz na dieta promoveu um atraso no desenvolvimento larval (Shukle & Murdock, 1983). Segundo os autores, a concentração utilizada na dieta é semelhante à encontrada em muitas sementes de plantas leguminosas, ou seja, entre 3 a 4%.

Larvas de *Aubeonymus mariaefranciscæ* (Roudier), alimentadas em dietas contendo 0,2% (p/p) de inibidores de soja do tipo Kunitz e Bowman-Birk, apresentaram uma taxa de sobrevivência menor e um atraso no desenvolvimento dos períodos larval e pupal (Ortego et al., 1998). Outra observação interessante feita por estes pesquisadores foi a que os níveis de mortalidade mais significantes (aproximadamente 90,0%) ocorreram com larvas alimentadas em dietas contendo uma combinação de dois ou três inibidores, sugerindo uma toxicidade sinérgica.

Broadway & Duffey (1986) mostraram que a atividade das proteinases intestinais de *Spodoptera exigua* (Smith, 1797) e *Heliothis zea* (Buddie) foi similar ou aumentada quando as lagartas foram expostas a níveis elevados de inibidores de proteinase de batata II (PIN2) ou inibidor de tripsina da soja em dietas artificiais. A hipótese de que as taxas de crescimento foram reduzidas pela redução das taxas de proteólises não foi, entretanto, comprovada. Os resultados foram interpretados pelos autores como sendo um mecanismo de resposta que conduziu a uma hiperprodução de proteinases para compensar a perda de atividade. Este mecanismo levou a uma falta de aminoácidos essenciais na síntese de outras proteínas resultando no atraso das taxas de crescimento (Broadway, 1995).

Bioensaios realizados com plantas transgênicas, expressando inibidor de soja do tipo Kunitz (SKTI), revelaram que estas são mais resistentes à praga do arroz *Nilaparvata*

lugens (Stal) do que as plantas controle. Assim, a introdução de SKTI em plantas de arroz pode ser utilizada no controle de insetos pragas (Lee et al., 1999).

Duan et al. (1996), transformaram diversas variedades de arroz com o gene *pin2* (inibidor de tripsina e quimotripsina) de batata. Os autores observaram que as plantas transgênicas mostraram-se resistentes à principal praga da cultura no Japão, além de constatarem que o transgene foi herdado após sucessivas gerações. Neste trabalho, Duan et al. (1996), sugerem que os estudos relacionados à transformação de plantas com genes que codificam inibidores de proteinase não somente fornecem subsídios sobre o papel dos IPs na auto-proteção de plantas, mas também demonstram a possibilidade da engenharia genética em culturas importantes. Sendo estes IPs componentes comuns de alimentos derivados de plantas e por serem facilmente inativados pelo cozimento, a introdução destes genes em novas culturas pode ser considerada como uma estratégia viável para o controle de insetos do ponto de vista da segurança alimentar (Duan et al., 1996).

Trabalho realizado por Mochizuki et al. (1999) mostrou que o desenvolvimento de larvas de *Chilo suppressalis* (Walker), broca do colmo de arroz, uma praga de grande importância, foi significativamente retardado quando alimentadas com plantas transgênicas de arroz expressando inibidor de tripsina de feijão (WTI-1B). Também a proteína expressando o inibidor de tripsina, extraída das plantas transgênicas de arroz, inibiu as proateases intestinais da larva *in vitro*.

Em um trabalho interessante Broadway & Villani (1995) mostraram que a ingestão crônica de inibidores de proteinase do tipo serina, inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz (STI), reduziu significativamente a atividade proteolítica *in vivo* das espécies estudadas com hábitos alimentares relativamente especializados. Também foram observados atrasos e redução no crescimento larval e aumento da mortalidade larval em algumas destas espécies. No entanto, a ingestão crônica de STI não influenciou a sobrevivência larval daquelas espécies polífagas.

2.3.2 Adaptação de insetos aos inibidores de proteinase (IPs)

Insetos podem adaptar-se aos inibidores de proteinase presentes na planta hospedeira através presença de atividades proteolíticas “resistentes ao inibidor”. Estas enzimas “resistentes ao inibidor” podem ser proteinases secretadas normalmente no tubo digestivo ou podem ser ativadas após a ingestão de inibidores de proteinase (Broadway, 1996). Os insetos podem ainda, aumentar a expressão da enzima inibida. Gatehouse et al. (1999) mostraram que a atividade proteolítica do tubo digestivo de lagartas de *Lacanobia oleracea* (Linnaeus) aumentava até quatro vezes quando em presença do inibidor de tripsina de soja do tipo Kunitz.

Outro mecanismo adaptativo, consiste na síntese de proteinases que promove a degradação dos inibidores das plantas no lúmen intestinal dos insetos. Michaud (1997) observou a degradação proteolítica de orizacistatina II por proteinases de pragas de cotilédones (*Otiorynchus sulcatus*, Fabricius).

Jongsma et al. (1995) propuseram que a eficiência dos inibidores de proteinase depende da afinidade ou especificidade de um inibidor para a principal proteinase intestinal do inseto, embora o mecanismo de ação e o efeito dos inibidores de proteinase sejam parcialmente entendidos.

De acordo com Yeh et al. (1997), plantas transgênicas resistentes a pragas representam uma oportunidade atrativa para a biotecnologia agrícola. Muitos estudos, entretanto, precisam ser realizados desde a caracterização das enzimas dos insetos até a identificação, isolamento e introdução destes genes em plantas de interesse econômico. Larocque & Houseman (1990) enfatizam a importância da determinação das interações bioquímicas envolvendo inibidores de plantas e proteases de insetos no sentido de entender o efeito antimetabólico potencial deste inibidores.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratório de Biologia Molecular de Plantas - Departamento de Genética, no Laboratório de Biologia de Insetos - Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola, ambos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) da Universidade de São Paulo - (USP), Piracicaba/SP e no Laboratório de Bioquímica de Insetos - Instituto de Química - (USP) - São Paulo.

3.1 Criação das lagartas em laboratório

As lagartas de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) utilizadas nos ensaios bioquímicos e biológicos, foram criadas em dietas artificiais no Laboratório de Biologia de Insetos/ESALQ/USP e no Laboratório de Entomologia da Cooperativa dos Plantadores de Cana, Açúcar e Álcool do Estado de São Paulo (COPERSUCAR) localizado em Piracicaba, Estado de São Paulo. Foram utilizados tubos de vidro de fundo chato de 2,5 cm de diâmetro x 8,5 cm de altura tampados com algodão hidrófugo, mantendo-os à 25 ± 2 °C, umidade relativa (UR) de $60 \pm 10,0\%$ e fotofase de 14 horas.

Lagartas no sexto (último) ínstar foram selecionadas para a utilização nos ensaios bioquímicos. Realizou-se um acompanhamento diário dos tubos, analisando-se os diversos parâmetros biológico envolvidos.

3.2 Extração e purificação parcial dos inibidores de proteinase (IPs) de soja

Os inibidores de proteinase foram extraídos a partir de sementes de soja, variedade Cometa, por homogeneização de 100g de sementes moídas em 1000 ml de 150mM de NaCl por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, o homogeneizado foi filtrado em gaze a fim de remover o material sólido. O filtrado foi centrifugado a 3000g durante 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação adicionou-se um volume quatro vezes maior ao do sobrenadante de acetona gelada, em condições de agitação. Em seguida, a solução foi centrifugada a 6000g durante 20 minutos à 4°C. O precipitado obtido foi seco ao ar, moído e ressuspendido em água destilada. O produto desta extração foi denominado inibidor de proteinase parcialmente purificado e contém os inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk (adaptado de Broadway, 1995).

A quantidade de IP presente no produto de extração foi calculada usando o programa Enzifitter (Elsevier Biosoft).

3.3 Identificação das principais enzimas proteolíticas de *D. saccharalis*

3.3.1 Preparo do homogeneizado intestinal de *D. saccharalis*

Lagartas no último estágio larval (aproximadamente 25 dias após a postura) foram imobilizadas em gelo por alguns minutos. Em seguida, com auxílio de microscópio estereoscópico e pinças, os intestinos foram dissecados em uma solução 125 mM de NaCl gelada e a membrana peritrófica, que envolve o conteúdo alimentar dos insetos, foi separada da membrana do ventrículo (posicionada externamente à membrana peritrófica) (Figura 1).

Figura 1: Diagrama generalizado do tubo digestivo dos insetos (Terra, 1991).

Lotes de 25 intestinos por ml (membranas peritróficas juntamente com o conteúdo alimentar) foram homogeneizados em água Milli-Q gelada, utilizando-se um homogeneizador Potter-Elvehjen. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a uma rotação de 20.000g, por 30 minutos, à 4°C. O sobrenadante resultante foi coletado, filtrado em algodão de vidro (para retenção do lipídeos que poderiam afetar a determinação de proteína pelo método de Bradford, 1976) e utilizado em ensaios bioquímicos (Ferreira et al., 1994).

3.3.2 Quantificação de proteína

As proteínas foram quantificadas de acordo com método de Bradford (1976) utilizando-se soro de albumina bovina (BSA) como padrão.

3.3.3 Determinação da atividade enzimática

Para a determinação da atividade enzimática, foi feita uma curva de quatro tempos (20, 40, 60 e 80 minutos) a 30°C. A atividade da tripsina foi determinada pela hidrólise do

substrato *N*-benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide (BAPA) e a atividade da quimotripsina foi medida pela hidrólise do substrato *N*-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine *p*-nitroanilide (S(Ala)₂ProPhe pNA). A leitura foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 405 nm e determinada a atividade enzimática em nmoles de *p*-nitroanilina/min./mg de proteína.

O BAPA foi utilizado a uma concentração de 1 mM, enquanto o S(Ala)₂ProPhe-pNA a de 0,1 mM. Os substratos foram dissolvidos em 0,8% (v/v) de dimetilformamida (solvente orgânico) e o volume completado com tampão CAPS (fervente, no caso do BAPA) em pH 9,0. A reação foi interrompida com ácido acético 30,0%, sendo em seguida feita a determinação da atividade enzimática em nmoles *p*-nitroanilina/min./mg proteína (Souza et al., 1995).

3.3.4 Ensaio de pH

Para a avaliação de uma enzima é necessário escolher a temperatura e o pH de incubação. A IUB (International Union of Biochemistry) recomenda que os ensaios sejam feitos a 30°C. Essa temperatura é considerada ideal, uma vez que praticamente todas as enzimas permanecem estáveis e pode-se obter uma atividade facilmente mensurável.

A escolha do pH foi feita incubando-se igual quantidade da enzima, pelo mesmo tempo, em diferentes pHs e determinou-se o melhor pH, ou seja, o pH no qual a enzima em questão apresentou maior atividade como recomendado por Terra & Ferreira (1994).

Tampões numa faixa de pH entre 6,0 e 10,0 foram preparados a uma concentração de 0,1 M. Os tampões utilizados foram: Citrato/fosfato (pH 6,0 a 7,0); Tris-HCl (pH 7,0 a 9,0) e Piperazina (pH 9,0 a 10,0) para o substrato BAPA e Fosfato de Sódio (pH 6,0 a 8,0); Tris-HCl (pH 7,0 a 9,0) e Glicina (pH 9,0 a 10,5) para o substrato S(Ala)₂ProPhe pNA.

Todo os ensaios foram mantidos à 30°C e as reações interrompidas com 200 µl de ácido acético 30,0%. Construiu-se uma curva de 4 tempos (20, 40, 60 e 80 minutos). A produção de pNA foi medida à 410 nm em espectrofotômetro e determinada a atividade enzimática em nmoles de *p*-nitroanilina/min./mg de proteína para cada pH.

3.3.5 Efeito *in vitro* de diferentes inibidores

Foram utilizados diferentes inibidores de proteinase contra as enzimas do tipo tripsina, presentes no homogeneizado intestinal de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas em dieta artificial. Foram usados os inibidores extraído de uma planta chinesa (Arrowhead), Kunitz (Sigma) e Aprotinina (Sigma).

Posteriormente, antes da incorporação em dieta artificial, foram realizados diversos ensaios enzimáticos/bioquímicos para estudar o efeito *in vitro* dos IPs de soja. Além dos inibidores do tipo Kunitz (Sigma), Bowman-Birk (Sigma), Kunitz + Bowman-Birk foram testados os IPs parcialmente purificados extraídos de sementes de soja (que apresentam os inibidores do tipo Kunitz e Bowman-Birk). Esta etapa foi realizada com o objetivo de incorporar os IPs em dietas artificiais de *D. saccharalis*, uma vez que são necessárias quantidades expressivas de inibidores, tornando inviável e oneroso utilizá-los puros (provenientes da Sigma, por exemplo).

A inibição da tripsina foi determinada pela medida da inibição da hidrólise do substrato BAPA pela enzima, como descrito por Souza et al. (1995). A inibição da quimotripsina foi determinada pela medida da inibição da hidrólise de S(Ala)₂ProPhe pNA (Houseman & Philogène, 1988).

3.4 Efeito *in vivo* dos inibidores de proteinase (IPs) de soja

3.4.1 Observações biológicas da broca da cana-de-açúcar

a) fase de ovo

Ovos do segundo dia de postura de *D. saccharalis*, provenientes dos casais utilizados no estudo de fecundidade, foram empregados para se determinar a duração do seu período embrionário e viabilidade. Cerca de 20 ovos por casal foram acondicionados em placas de Petri com 10 cm de diâmetro por 2 cm de altura, forradas com papel filtro,

umedecido com água destilada. As placas (tampa x tampa ou fundo x fundo) foram vedadas com auxílio de fita adesiva e colocadas em câmara climatizada, regulada para a temperatura de 25°C, UR de 60% e fotofase de 14 horas. Nos ensaios biológicos (em 3.4.5) a determinação do período de incubação e viabilidade dos ovos foi realizada através de contagens diárias de lagartas eclodidas nas placas.

b) fase larval

As lagartas recém-eclodidas de *D. saccharalis*, provenientes da criação estoque do Laboratório de Biologia de Insetos da ESALQ/USP ou da Copersucar, foram transferidas para tubos de vidro esterilizados (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura), contendo as dietas artificiais e tampados com algodão hidrófugo esterilizado. Foram utilizadas dietas à base de farelo de soja e germe-de-trigo (King & Hartley, 1985) (Tabela1). O preparo do meio artificial, transferência de lagartas e cuidados assépticos foram feitos segundo recomendações propostas por Parra (1999). A quantidade de dieta colocada foi de aproximadamente 1/3 do comprimento do tubo de vidro (cerca de 15 ml).

Cada lagarta foi transferida, com auxílio de um pincel, para os tubos contendo a dieta, acomodados em estantes de madeira com a extremidade superior dos tubos voltadas para baixo, permitindo assim que o excesso de água fosse absorvido pelo algodão e facilitando a remoção das fezes que nele eram depositadas. Esta posição reduz a possibilidade da proliferação de microrganismos e conseqüente ocorrência de doenças.

Tabela 1 – Composição da dieta à base de farelo-de-soja e germe-de-trigo para criação de *D. saccharalis* (King & Hartley, 1985).

Componentes	quantidade
Germe-de-trigo	35,00 g
Farelo-de-soja	120,00 g
Sacarose	120,00 g
Sais-de-Wesson	17,00 g
Metil-parahidroxibenzoato (nipagin)	7,00 g
Ácido ascórbico	4,20 g
Cloreto de colina	0,90 g
Formaldeído 37%	1,70 ml
Vita Gold®	0,90 ml
Mistura vitamínica	25,00 ml
Tetraciclina (Tetrex)	500,00 mg
Ágar	25,00 g
Água destilada	2.000 ml

c) fase de pupa

Completado o desenvolvimento larval, observou-se a data da pupação. As pupas foram separadas por sexo como descrito por Butt & Cantu (1962) e pesadas em balança de precisão, com idade fixa de 24 horas, para evitar que a perda de água afetasse os valores, e verificando-se deformações, viabilidade e duração desta fase.

As pupas foram retiradas da dieta artificial e colocadas sobre bandejas de alumínio perfuradas e forrada com papel de filtro umedecido diariamente e em seguida cobertas individualmente por copos descartáveis (40 ml) devidamente identificados, permanecendo assim até a emergência dos adultos.

d) Fase adulta

Logo após a emergência dos adultos, casais individualizados (macho e fêmea emergidos no mesmo dia), foram transferidos para gaiolas cilíndricas de PVC (10,0 cm de diâmetro x 20,0 cm de altura), fechadas nas extremidades por uma placa de Petri de 14 cm de diâmetro. Cada gaiola foi revestida internamente por papel sulfite branco, umedecido diariamente com água destilada, o qual serviu de substrato para postura; os ovos foram retirados e mantidos em sacos plásticos umedecidos para posterior contagem. Como alimento, foi oferecido uma solução aquosa de mel a 10,0%, colocada em um recipiente de vidro, com tampa de plástico com um orifício na parte central. Através deste orifício, foi colocado um rolo dental Johnson's®, que permitiu a alimentação do inseto por capilaridade. Este alimento foi renovado a cada dois dias para evitar problemas de contaminação por patógenos.

Para aumentar a precisão e por facilidade de manuseio e visualização, a contagem dos ovos foi efetuada no final do desenvolvimento embrionário, quando era visível a cabeça da lagarta (pontos escuros).

3.4.2 Ensaio biológico preliminar

Com o objetivo de determinar a concentração (p/p) do inibidor a ser usada nos ensaios biológicos, lagartas de *D. saccharalis* foram alimentadas em dieta artificial (dieta 1) sem inibidor (37 tubos), com 0,25% (p/p) de IPs (35 tubos) e 0,5% (p/p) de IPs (37 tubos), inibidores estes parcialmente purificados de sementes de soja (Kunitz e Bowman-Birk).

Foram colocadas 5 lagartas no 1º instar por tubo e avaliados os seguintes parâmetros: mortalidade larval (4º, 7º e 15º dia) e duração do período larval.

As concentrações estabelecidas foram baseadas na quantidade de inibidor presente nas sementes de soja.

3.4.3 Efeito dos inibidores de proteinase (IPs) de soja em duas gerações

a) Primeira geração

Visto que a concentração de 0,5% (p/p) de IPs foi a que apresentou os resultados mais significativos (item 3.4.2), repetiu-se o referido ensaio biológico, colocando-se apenas 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados (64 tubos), comparando-o com o tratamento sem inibidor (64 tubos). O objetivo foi estudar um maior número de parâmetros e avaliar os efeitos dos IPs na segunda geração. Foram colocadas 2 lagartas/tubo de 1º instar.

Foram avaliados, para cada tratamento, os seguintes parâmetros biológicos:

-Fase larval: mortalidade no 4º, 7º e 15º dia

duração (incluindo a fase de pré-pupa)

viabilidade (%)

- Fase pupal: duração

peso (macho e fêmea separadamente) com 24 horas de idade

viabilidade (%)

razão sexual (rs):
$$\frac{\text{fêmea}}{\text{fêmea} + \text{macho}}$$

deformação (%)

- Fase adulta: deformação (%)

total de ovos por fêmea

Para avaliar o número de ovos por fêmea, foram utilizados 2 adultos (1 macho e 1 fêmea) de *D. saccharalis*, um total de 12 casais para cada tratamento (sem inibido e 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados).

Para obtenção de ovos para a segunda geração, foram utilizados 20 adultos (10 fêmeas e 10 machos) de *D. saccharalis* provenientes das dietas sem inibidor e com 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados.

b) Segunda geração

A partir dos ovos obtidos da primeira geração iniciou-se um novo ensaio biológico com tratamento sem inibidor (63 tubos) e com 0,5% (p/p) de IPs de soja parcialmente purificados (74 tubos). Os parâmetros avaliados foram os mesmos da primeira geração, com exceção da razão sexual, colocando-se 2 lagartas/tubo.

3.4.4 Efeito da composição da dieta na resposta ao inibidor

No Brasil, desde 1969, vêm sendo utilizadas “dietas artificiais” para a criação da broca da cana-de-açúcar em laboratório. Essas dietas são balanceadas, onde os componentes são dosados de tal forma que permitem o fornecimento de nutrientes essenciais ao desenvolvimento da fase larval de *D. saccharalis*. Esses nutrientes são homogeneizados e estabilizados em uma mistura de consistência apropriada, que favoreça o desenvolvimento dos insetos (Araújo, 1987).

O objetivo deste ensaio biológico foi verificar se a composição da dieta poderia estar minimizando os efeitos dos IPs sobre o desenvolvimento e metabolismo das lagartas. Assim, foram comparados os mesmos parâmetros em duas dietas cujas composições eram diferentes.

Foram utilizadas para esses ensaios a dieta à base de farelo de soja e germe-de-trigo (King & Hartley, 1985) (Tabela 1) e germe-de-trigo, farinha-de-milho e levedura-de-cerveja (Parra & Mihsfeldt, 1992) (Tabela 2) contendo os IPs parcialmente purificados (0,5% (p/p)). Esta última é considerada mais pobre em nutrientes. Foram observados 40 tubos com 2 lagarta/tubo para cada tratamento.

Os parâmetros avaliados foram os mesmo descritos em 3.4.3.

Tabela 2 – Composição da dieta artificial à base de germe-de-trigo, farinha-de-milho e levedura-de-cerveja para criação de *D. saccharalis* (Parra & Mihsfeldt, 1992).

Componentes	quantidades
Germe-de-trigo	14,00 g
Farinha-de-milho	46,00 g
Levedura	15,00 g
Metil-parahidroxibenzoato (nipagin)	0,50 g
Ácido ascórbico	2,00 g
Ácido benzóico	0,50 g
Ágar	10,00 g
Água destilada	500,00 ml

As duas dietas foram submetidas à análise bromatológica para determinação da composição das mesmas. As análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Produção Animal da ESALQ/USP.

3.4.5 Tabela de vida de fertilidade

Para comparação das dietas sem inibidor e com 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados foram avaliados vários parâmetros biológicos. Foram analisados 57 tubos com 3 lagartas cada, para a dieta contendo o IP de soja parcialmente purificado (totalizando 171 lagartas) e 73 tubos com 3 lagartas cada (totalizando 219 lagartas), para a dieta sem o inibidor. Com relação à fecundidade, foram observados 29 casais por dieta.

Foram observados os seguintes parâmetros biológicos: período ovo-adulto, viabilidade das fases imaturas, período de pré-oviposição, relação sexual, mortalidade diária de machos e fêmeas e capacidade de postura diária, básicos para a elaboração de uma tabela de vida de fertilidade (Parra, 1999).

Os parâmetros associados à tabela de vida de fertilidade observados foram: taxa líquida de reprodução ($R_0 = \sum(l_x m_x)$); total de descendentes fêmeas produzidas por fêmea, durante todo o período de oviposição, que chegam a geração seguinte; duração de cada geração ($T = \sum(x l_x m_x) / \sum(l_x m_x)$); taxa intrínseca de crescimento ($R_m = \ln(R_0)/T$); é um parâmetro da curva de crescimento da população fêmea (suposta exponencial), relacionado com a velocidade de crescimento (ou decrescimento) populacional; intervalo médio entre gerações ($DT = \ln(2)/r_m$); duração média do período entre o nascimento dos indivíduos de uma geração e da geração seguinte; razão finita de crescimento ($\lambda = e^{r_m}$); fator de multiplicação da população original a cada intervalo unitário de tempo.

Os parâmetros associados à tabela de vida e suas variâncias foram estimados pelo método Jackknife (Meyer, 1986), utilizando-se um programa SAS desenvolvido por Maia et al. (2000).

Os parâmetros foram comparados pelo teste t, utilizando as estimativas Jackknife das respectivas médias e variâncias.

As curvas de sobrevivência foram obtidas através da distribuição de Weibull, segundo Sgrillo (1982).

3.4.6 Efeito dos inibidores de proteinase (IPs) de soja sobre a duração e desenvolvimento do período larval

3.4.6.1 Peso de lagartas

Visto que as lagartas que se alimentaram em dieta contendo 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados apresentaram tamanho reduzido, realizou-se um ensaio biológico no qual as lagartas foram pesadas em balança de precisão, no 20º dia após a eclosão. Foram pesadas 30 lagartas (10 tubos com 3 lagartas cada) de cada tratamento (sem inibidor e com 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados).

3.4.6.2 Número de ínstaes

O número de ínstaes larvais foi determinado através de medições diárias da largura da cápsula cefálica de uma amostra de 64 lagartas para a dieta sem inibidor e 67 lagartas para a dieta com 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados. Foi utilizado o aparelho WILD MMS 235 (Heerbrugg Switzerland) com uma ocular graduada WILD TYP 325400, acoplada a um microscópio-estereoscópico Wild M4A.

Tomadas as medidas das larguras das cápsulas cefálicas de ambos os tratamentos, os dados foram plotados de tal forma que no eixo das abscissas estivessem as larguras das cápsulas cefálicas e no eixo das ordenadas, as frequências de ocorrência.

A hipótese do número ínstaes larvais foi testada através do método linear considerando-se os parâmetros da regressão (Parra & Haddad, 1989). Estes foram obtidos utilizando-se o programa estatístico MOBAE (*Modelos Bioestatísticos Aplicados a Entomologia*) do Departamento de Entomologia da ESALQ. A partir deste modelo, foram obtidos a taxa de crescimento (K) e o coeficiente de determinação (R^2).

Foram analisados também os seguintes parâmetros biológicos: duração e viabilidade do período larval, duração, deformação e razão sexual do período pupal e peso de pupas com 24 horas (ambos os sexos).

3.5 Análises estatísticas

Os dados obtidos nos diversos ensaios foram submetidos à análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados da razão sexual foram comparados pelo teste não paramétrico de qui-quadrado (X^2).

3.6 Efeito dos inibidores de soja (IPs) *in vitro* após incorporação em dieta artificial

3.6.1 Inibidores de proteinase (IPs) de soja parcialmente purificados

Após a incorporação dos IPs de soja parcialmente purificados, em dieta artificial, foram realizado novos ensaios bioquímicos/enzimáticos. A determinação da atividade das enzimas do tipo tripsina presentes nos homogeneizados intestinais de lagartas de *D. saccharalis* que se alimentaram em dietas sem inibidor e com 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados, foi feita como descrito em 3.3.3. Também foi realizada uma curva de inibição, utilizando o inibidor do tipo Kunitz (Sigma) e IPs de soja parcialmente purificados (em 3.3.5).

Na tentativa de visualizar uma possível diferença nas características das enzimas proteolíticas de *D. saccharalis*, alimentadas em dieta artificial contendo os IPs parcialmente purificados, foram feitos géis de atividade.

Optou-se por utilizar um gel de gradiente de acrilamida para melhor separação das proteínas. Numa cuba de eletroforese vertical foi preparado o gel de acrilamida num gradiente de 7,5% (625 µl de solução B: 1,5 M Tris-HCL, pH 8,8; 25 µl de SDS 10,0%; 12,5 µl de persulfato de amônio 100 mg/ml; 1,25 µl de TEMED; 625 µl de solução A: acrilamida/bis 30,0%; 1212 µl de água) a 12% (625 ml de solução B; 25 ml de SDS 10,0%; 12,5 µl de persulfato de amônio 100 mg/ml; 12,5 µl de TEMED; 1000 µl de solução A e 840 µl de água). Após a polimerização acrescentou-se um gel de empilhamento (2,5 ml de solução A; 2,5 ml de solução C: Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8; 100 µl de SDS 10,0%; 50 µl de persulfato de amônio 100 mg/ml; 10 µl TEMED e 6,1 ml de água) (Laemmli, 1970). As amostras (homogeneizados intestinais) não foram fervidas e a elas foi acrescentado o tampão de amostra (4,4 ml de água; 1,0 ml de solução C; 0,8 ml de glicerol; 1,6 ml de SDS 10% e 0,2 ml de bromofenol 0,05%). A cuba com o gel foi preenchida com o tampão de corrida (Tris, Glicina e SDS). A corrida foi feita em geladeira (4°C) à 100 volts, por duas horas. Após a corrida, o gel de empilhamento foi removido e foi retirado das placas de vidro e lavado por 10 minutos com Triton-X-100 (2,5% v/v) em tampão Tris-HCl 100 mM pH

8,5, sob agitação. Após a lavagem, foi preparado o “sanduíche” com o gel de gelatina (7,2 ml de água; 4,7 ml de solução B; 2,5 ml de solução A; 1,9 ml de gelatina 1%; 70 µl de persulfato de amônio 100 mg/ml; 11,2 µl de TEMED e 200 µl de SDS 10,0%). O gel de acrilamida foi colocado sobre o gel de gelatina numa cuba com algodão umedecido com tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8,5 e mantido a 30 °C por duas horas, conforme descrito por Jordão et al. (1996). Transcorrido esse tempo, o gel de gelatina foi transferido para uma solução de coloração 0,1% Comassie Blue R-250 em água-metanol-ácido acético (5:5:2, v/v/v), previamente filtrada em papel de filtro, por um período de seis horas. Em seguida, o gel foi descolorido em uma solução de água-metanol-ácido acético (30:7:63, v/v/v). Foram realizadas várias lavagens até a visualização das bandas.

3.6.2 Inibidores de proteinase (IPs) de soja puros

Foram realizados ensaios bioquímicos/enzimáticos preliminares com as enzimas dos tubos digestivos retirados de lagartas de *D. saccharalis*, que se alimentaram com as dietas acrescidas de 0,5% (p/p) dos inibidores de soja dos tipos Kunitz e Bowman-Birk puros (Sigma), parcialmente purificados e controle (sem inibidor). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Insetos/USP.

Para a determinação da atividade triptica foram utilizados os substratos fluorescentes BAMCA (N α -Benzoyl-L-arginine 7-amido-4-methylcoumarin) e ZAMCA (N α -Carbobenzoxy-L-arginine 7-amido-4-methylcoumarin). A atividade quimotriptica foi determinada usando-se o substrato fluorescente SAAPMCA (N α -Succinyl-L-alanina-alanina-fenilalanina 7-amido-4-methylcoumarin).

Todos os ensaios foram mantidos à 30°C em pH 8,0 e as reações interrompidas com 200 µl de ácido acético 30,0%. Foi feita uma curva de 4 tempos (20, 40, 60 e 80 minutos). A produção de MCA (substratos fluorescentes) foi medida usando-se comprimento de onda de 380 nm para excitação e 460 nm para emissão (em fluorímetro) (Alves et al., 1996).

4 RESULTADOS

4.1 Identificação e caracterização das principais enzimas proteolíticas de *D. saccharalis*

Observou-se a existência de mais de uma enzima do tipo tripsina a partir da presença de dois picos de pH ótimo. Uma atividade triptica predominante foi observada a pH 9,0, enquanto que uma atividade secundária foi encontrada em pH 8,0 (Figura 1).

Figura 1. Curva de pH ótimo para a atividade proteolítica da enzima do tipo tripsina presente em homogeneizado intestinal de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas em dieta artificial. Substrato usado: BAPA.

Ao contrário do observado com a tripsina, a quimotripsina apresentou apenas um pico de pH ótimo (9,0), sendo que neste pH ocorreu a máxima hidrólise do substrato

(maior atividade enzimática). A atividade apresentada por esta enzima foi de aproximadamente 100 nmoles de p-nitroanilina/min./mg proteína (Figura 2) menor, portanto, do que a apresentada pela tripsina, que atingiu no máximo, 250 nmoles de p-nitroanilina/min./mg proteína (Figura 1).

Figura 2. Curva de pH ótimo para a atividade proteolítica da enzima do tipo quimotripsina presente no homogeneizado intestinal de *D. saccharalis* alimentadas em dieta artificial. Substrato usado: S(Ala)2ProPhe pNA.

4.2 Efeito *in vitro* de diferentes inibidores

Os ensaios de inibição mostraram que cada inibidor de proteinase age diferentemente sobre a atividade proteolítica da enzima do tipo tripsina de *D. saccharalis*. Os inibidores mais efetivos contra as proteinases intestinais de *D. saccharalis* foram os do tipo Kunitz (Figura 3).

Figura 3. Inibição da atividade proteolítica da enzima do tipo tripsina, presente em homogeneizado intestinal de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas em dieta artificial por diferentes inibidores em 4 concentrações distintas. Substrato usado: BAPA.

Os inibidores de proteinase extraídos de sementes de soja mostraram-se bastante efetivos contra as enzimas digestivas (tripsina e quimotripsina) de *D. saccharalis* quando testados *in vitro*. O IP do tipo Kunitz inibiu uma maior porcentagem da atividade da enzima do tipo tripsina quando comparado com o IP proteinase do tipo Bowman-Birk. Devido à grande semelhança entre os percentuais de inibição, entre o IP do tipo Kunitz (Sigma) e os IPs parcialmente purificados de soja, o ensaio sugere que o maior percentual de IPs presente no inibidor parcialmente purificado de soja seja do tipo Kunitz (Figura 4). Outra observação importante, foi que os IPs do tipo Kunitz e Bowman-Birk juntos apresentaram maior porcentagem de inibição do que quando isoladamente (Figura 4).

Figura 4. Efeito da concentração de diferentes inibidores de proteinase de soja sobre a atividade de enzimas do tipo tripsina, presentes no homogeneizado intestinal de lagartas de *D. saccharalis* alimentadas em dieta artificial. Substrato usado: BAPA.

4.3 Efeito *in vivo* dos inibidores de proteinase (IPs) de soja

4.3.1. Ensaio preliminar

Lagartas alimentadas com dietas contendo 0,25% (p/p) ou 0,5% (p/p) de inibidores apresentaram viabilidade inicial significativamente menor do que aquelas alimentadas com dietas sem inibidores. A duração do período larval sofreu um atraso significativo nas lagartas que tiveram sua dieta acrescida do inibidor, principalmente na concentração de 0,5% (p/p) (Tabela 3).

Tabela 3. Mortalidade larval inicial (3º, 7º e 15º dias) e duração da fase larval de *D. saccharalis* em dieta artificial. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR $60 \pm 10,0\%$; fotofase: 14 horas.

Parâmetros	sem IPs	0,25% (p/p) IPs	0,5% (p/p) IPs
Viabilidade larval (3º dia)	$94,46 \pm 2,11$ a	$98,75 \pm 1,25$ a	$90,17 \pm 4,50$ a
Viabilidade larval (7º dia)	$98,21 \pm 1,78$ a	$92,5 \pm 1,44$ a	$89,46 \pm 4,39$ b
Viabilidade larval (15º dia)	$95,00 \pm 2,88$ a	$82,5 \pm 4,33$ ab	$67,32 \pm 4,36$ b
Duração do estágio larval dias)	$38,17 \pm 0,41$ a	$38,62 \pm 0,42$ a	$43,17 \pm 0,48$ b

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade

4.3.2 Efeito dos inibidores de proteinase (IPs) em duas gerações

a) primeira geração

Ao contrário do observado no ensaio preliminar, não ocorreu mortalidade inicial em ambos os tratamentos (sem inibidor e 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados de soja). No entanto, a duração do período larval e pupal foi significativamente afetada (Tabela 4).

A viabilidade larval, o peso de pupas (macho e fêmea) e a deformação de pupas não foram significativamente afetados, embora numericamente a presença do inibidor tenha afetado tais parâmetros.

As pupas que originaram fêmeas, sempre foram mais pesadas que aquelas que originam machos, fato também observado por Mélo & Parra (1988). Não houve diferença significativa no peso das pupas (para ambos os sexos) alimentadas nas dietas com e sem inibidor. Por outro lado, observou-se que tanto os machos como as fêmeas apresentaram menor peso quando mantidas em dieta contendo 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados de soja, demonstrando desta forma que o inibidor afeta o desenvolvimento do inseto. A razão sexual não foi alterada, ou seja, ambos os sexos foram igualmente afetados pelo inibidor.

Adultos originários de dieta com inibidor apresentaram-se em maior número de deformações (Tabela 4). As deformações observadas concentraram-se nas asas, impossibilitando o voo e em alguns casos, levaram o adulto à morte.

Tabela 4. Parâmetros biológicos da primeira geração de *D. saccharalis* criada em dieta artificial. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10,0\%$; fotofase: 14 horas.

FASE LARVAL			
Parâmetros		sem IPs	0,5% (p/p) IPs
Mortalidade inicial (%)		0	0
Duração (dias)		$24,80 \pm 0,035$ a	$28,710 \pm 0,645$ b
Viabilidade (%)		$97,5 \pm 2,50$ a	$95,00 \pm 3,273$ a
FASE PUPAL			
Parâmetros		sem IPs	0,5% (p/p) IPs
Duração (dias)		$9,175 \pm 0,328$ a	$10,060 \pm 0,679$ b
Peso (mg)	Machos	$140,505 \pm 4,573$ a	$133,590 \pm 5,183$ a
	Fêmeas	$240,983 \pm 9,210$ a	$223,441 \pm 9,039$ a
Deformação (%)		0 ± 0 a	0 ± 0 a
Viabilidade (%)		$90,0 \pm 5,34$ a	$92,50 \pm 5,261$ a
Razão sexual (rs)*		0,473 a	0,459 a
FASE ADULTA			
Parâmetros		sem inibidor IPs	0,5% (p/p) IPs
Deformação (%)		0 ± 0 a	$11,4 \pm 5,947$ b
Nº médio de ovos/fêmea		$563 \pm 113,0$ a	$618,75 \pm 71,604$ a

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade;

Dados comparados pelo teste não paramétrico de X^2 .

b) segunda geração

A segunda geração de lagartas, alimentadas em dieta artificial contendo 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados, não apresentou diferenças significativas nos parâmetros biológicos avaliados (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros biológicos da segunda geração de *D. saccharalis* criada em dieta artificial. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10,0\%$; fotofase: 14 horas.

FASE LARVAL			
Parâmetros		sem IPs	0,5% (p/p) IPs
Mortalidade inicial (%)		0	0
Duração (dias)		$28,57 \pm 0,347$ a	$28,58 \pm 0,353$ a
Viabilidade (%)		$88,00 \pm 2,49$ a	$89,00 \pm 2,33$ a
FASE PUPAL			
Parâmetros		sem IPs	0,5% (p/p) IPs
Duração (dias)		$9,280 \pm 0,106$ a	$9,4 \pm 0,1096$ a
Peso (mg)	Machos	$138,70 \pm 4,72$ a	$126,33 \pm 4,79$ a
	Fêmeas	$203,24 \pm 8,43$ a	$191,86 \pm 6,18$ a
Deformação (%)		$1,11 \pm 1,11$ a	$1,11 \pm 1,11$ a
Viabilidade (%)		$93,34 \pm 2,357$ a	$91,12 \pm 2,605$ a
Razão sexual (rs)*		0,48 a	0,42 a
FASE ADULTA			
Parâmetros		sem IPs	0,5% (p/p) IPs
Deformação (%)		$6,50 \pm 1,636$ a	$6,25 \pm 2,630$
Nº médio de ovos/fêmea		$622,41 \pm 234,14$ a	$750,27 \pm 205,64$ a

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade;

* Dados comparados pelo teste não paramétrico de X^2 .

4.3.3 Efeito da composição da dieta na resposta ao inibidor

Os resultados analíticos da análise bromatológica das duas dietas utilizadas neste ensaio biológico, expressos em 100% de matéria seca, mostram que a dieta à base de farelo-de-soja e germe-de-trigo (considerada mais rica em nutrientes) possui proteína bruta superior à dieta à base de germe-de-trigo, farinha-de-milho e levedura-de-cerveja. (Tabela 6).

Tabela 6. Resultado da Análise Bromatológica das dietas à base de farelo-de-soja e germe-de-trigo (King & Hartley, 1985) (Dieta A) e à base de germe-de-trigo, farinha-de-milho e levedura-de-cerveja (Parra & Mihsfeldt, 1992) (Dieta B).

COMPONENTES	Dieta A	Dieta B
	%	%
Matéria Seca	13,82	17,49
Proteína Bruta	19,96	16,84
Fibra Bruta	2,29	2,17
Extrato Etéreo	1,41	1,73
Matéria Mineral	9,71	4,56
Extrato não Nitrogenado	66,63	74,7
pH	5,90	4,23

Em ambas as dietas, a presença dos IPs parcialmente purificados foi responsável por um aumento significativo na duração do período larval, sendo que a dieta considerada menos favorável (Dieta B) levou a um alongamento ainda maior (cerca de 30%), em relação ao período na dieta mais rica em nutrientes (Dieta A) (cerca de 10%) (Tabela 7).

Um outro aspecto importante observado refere-se à viabilidade larval (%). Ficou evidente que o inibidor afetou mais o inseto alimentado na dieta mais pobre em nutrientes. Na dieta B, a diferença entre viabilidades foi de 27,5%, enquanto que na dieta mais rica tal diferença foi de apenas 9% (Tabela 7).

O mesmo raciocínio se aplica à viabilidade pupal e às deformações de adultos.

Tabela 7. Parâmetros biológicos de *D. saccharalis* avaliados nas dietas artificiais à base de farelo-de-soja e germe-de-trigo (King & Hartley, 1985) (Dieta A) e à base de germe-de-trigo, farinha-de-milho e levedura-de-cerveja (Parra & Mihsfeldt, 1992) (Dieta B). Temperatura: 25 ± 2 °C; UR: 60 ± 10,0%; fotofase: 14 horas.

FASE LARVAL				
		DIETA A		DIETA B
Parâmetros		sem IPs	0,5% (p/p) IPs	sem IPs
Duração (dias)		25,627 ± 0,262 a	28,265 ± 0,326 b	31,39 ± 0,536 a
Viabilidade (%)		93,75 ± 1,829 a	85,00 ± 1,889 b	92,50 ± 2,500 a
FASE PUPAL				
		DIETA A		DIETA B
Parâmetros		sem IPs	0,5% (p/p) IPs	sem IPs
Duração (dias)	Machos	8,10 ± 0,146 a	8,88 ± 0,110 b	9,20 ± 0,504 a
	Fêmeas	0,143 ± 0,004 a	0,1391 ± 0,004 a	123,889 ± 3,485 a
Peso (mg)		0,2370 ± 0,005 a	0,2242 ± 0,008 a	203,374 ± 5,996 a
Deformação (%)		2,667 ± 1,817 a	4,286 ± 2,276 a	0,0 ± 0,0 a
Viabilidade (%)		92,857 ± 1,84 a	85,714 ± 2,02 b	94,285 ± 2,2 02 a
FASE ADULTA				
		DIETA A		DIETA B
Parâmetros		sem IPs	0,5% (p/p) IPs	sem IPs
Deformação (%)		7,14 ± 2,857 a	6,67 ± 3,33 a	9,23 ± 2,878 a
0,5% (p/p) IPs				22,08 ± 7,04 a

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade; * Dados comparados pelo teste não paramétrico de X².

4.3.4. Tabela de vida de fertilidade

Como observado anteriormente, a duração dos períodos larval e pupal de *D. saccharalis* foi significativamente alongada nas dietas contendo 0,5% (p/p) de inibidores de soja parcialmente purificados (Tabela 8).

O período de pré-oviposição não diferiu estatisticamente nos dois tratamentos, indicando que o inibidor não exerceu nenhuma influência sobre este parâmetro biológico (Tabela 8).

Tabela 8. Parâmetros biológicos avaliados de *D. saccharalis* alimentadas em dietas artificiais sem inibidor e com 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10,0\%$; fotofase: 14 horas.

FASE DE OVO*			
Parâmetros		sem IPs	0,5% (p/p) IPs
Período de incubação		$6,7 \pm 0,10$	$6,7 \pm 0,10$
Viabilidade (%)		$84,9 \pm 4,3$	$84,9 \pm 4,3$
FASE LARVAL			
Duração (dias)		$20,80 \pm 2,89$ a	$25,694 \pm 0,308$ b
Viabilidade (%)		$93,23 \pm 3,03$ a	$89,15 \pm 3,688$ a
FASE PUPAL			
Parâmetros		sem IPs	0,5% (p/p) IPs
Duração (dias)		$9,08 \pm 0,058$ a	$10,08 \pm 0,065$ b
Peso (mg)	Machos	$141,0130 \pm 2,386$ a	$127,615 \pm 2,285$ a
	Fêmeas	$222,578 \pm 3,140$ a	$213,129 \pm 3,390$ b
Deformação (%)		$6,190 \pm 4,737$ a	$4,166 \pm 4,16$ a
Viabilidade (%)		$98,00 \pm 0,816$ a	$95,625 \pm 1,132$ a
Razão sexual (rs)**		0,47 a	0,40 a
Período de pré-oviposição		$2,03 \pm 0,034$ a	$2,17 \pm 0,111$ a
FASE ADULTA			
Parâmetros		sem IPs	0,5% (p/p) IPs
Deformação (%)		$5,00 \pm 1,49$ a	$5,13 \pm 1,69$ a
Longevidade (dias)	Machos	$11,517 \pm 0,930$ a	$13,534 \pm 3,062$ a
	Fêmeas	$10,758 \pm 0,959$ a	$7,667 \pm 0,667$ b
Número médio de ovos/fêmea		$947,867 \pm 57,109$ a	$891,833 \pm 50,497$ a

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade;

* Avaliação feita separadamente e consideradas iguais.

** Dados comparados pelo teste não paramétrico de X^2 .

Os parâmetros associados à tabela de vida de fertilidade foram todos altamente significativos, mostrando que os efeitos negativos observados nos ensaios biológicos são devido a presença dos IPs incorporados na dieta artificial (Tabela 9).

A taxa líquida de reprodução (R_0) foi aproximadamente 350 e 262 para as dietas sem inibidor e com 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados, respectivamente. Isto indica que a população tem potencial de aumentar 88 vezes menos a cada geração, com o acréscimo do inibidor.

A maior frequência de postura ocorreu nos primeiros dias, e também a fecundidade média das fêmeas diminuiu com a longevidade para ambos os tratamentos. No entanto, para a dieta contendo o inibidor, o período de postura se concentrou num espaço de tempo menor e iniciou-se mais tardiamente (Figura 5).

A

B

Figura 5. Idade de fêmeas em oviposição (dias), originárias das lagartas alimentadas em dieta sem inibidor (A) e com 0,5% (p/p) (B) de IPs parcialmente purificados.

Tabela 9: Parâmetros estimados para os dados de *Diatraea saccharalis*: estimativas jackknife (média A, média B) para cada tratamento comparado (A= sem inibidor e B=0,5% (p/p) de IP), respectivos erros padrão e valores de p (P) obtidos pelo teste-t.

Parâmetros	Média A	Média B	P
Taxa líquida de reprodução – Ro (fêmea/fêmea/geração) ^a	350.496 ± 20.9823	261.904 ± 15.1849	<0,00062
Capacidade inata de aumentar em número – r_m (fêmea/fêmea/dia) ^a	0.170 ± 0.0018	0.134 ± 0.0014	<0.00001
Razão finita de aumento - λ (fêmeas/fêmeas/dia) ^a	1.185 ± 0.0021	1.143 ± 0.0016	<0.00001
Duração média de uma geração – T (dia) ^b	34.548 ± 0.2513	41.564 ± 0.2514	<0,00001
Tempo para a população duplicar – Dt (dia) ^b	4.085 ± 0.0421	5.172 ± 0.0548	<0.00001

^a Comparado por teste t unilateral à direita

^b Comparado por teste t unilateral à esquerda

O número de ovos/fêmea variou bastante em ambas as dietas (sem inibidor e 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados) resultando em diferença não significativa em relação a este parâmetro. Há uma alta concentração de ovos na dieta contendo sem inibidor de IPs nos primeiros dias de vida das fêmeas. Poucas fêmeas oriundas da dieta sem inibidor deixaram de ovipositar nos primeiros dias, ao contrário do observado com fêmeas oriundas de dieta contendo o inibidor (Figura 6).

Figura 6. Ritmo diário de postura de *D. saccharalis* e % de fêmeas ovipositando durante o período de vida em dietas sem inibidor (A) e com 0,5% (p/p) de IPs (B) de soja parcialmente purificados. As setas indicam 75% de postura. Temp.: 25 ± 10 ; UR: $60 \pm 10,0\%$; fotofase: 14 horas.

A longevidade de adultos machos foi superior à longevidade das fêmeas em ambos os tratamentos. Porém, fêmeas originárias da dieta contendo o inibidor viveram menos (Tabela 8 e Figura 7).

Figura 7. Sobrevivência de machos e fêmeas de *D. saccharalis*, segundo a distribuição de Weibull, provenientes de lagartas alimentadas em dietas sem inibidor e com 0,5% (p/p) de IPs de soja parcialmente purificados. Temp.: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10,0\%$; fotofase: 14 h. A = machos (sem inibidor de IPs); B = fêmeas (sem inibidor de IPs); C = machos (0,5% (p/p) de IPs); D = fêmeas (0,5% (p/p) de IPs).

4.3.5 Efeito dos IPs de soja sobre a duração e desenvolvimento do período larval

4.3.5.1 Peso e tamanho de lagartas

O tamanho das lagartas alimentadas com dieta contendo 0,5% (p/p) de IPs de soja parcialmente purificados, em todos os ensaios biológicos, foi visualmente menor (Figura 8). Além disso, o peso médio de lagartas de *D. saccharalis* com 20 dias de idade, alimentadas em dietas artificiais contendo inibidores de soja foi significativamente inferior ao controle (Figura 9).

Figura 8. Lagartas de *D. saccharalis*, com 20 dias de idade, em dieta artificial sem inibidor (A) e com 0,5% (p/p) (B) de IPs de soja parcialmente purificados. Temp.: $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60 \pm 10,0\%$; fotofase: 14 horas.

Figura 9. Peso médio de lagartas (mg) de *D. saccharalis* com 20 dias de idade, alimentadas em dieta artificial sem inibidor e com 0,5% (p/p) de IPs de soja parcialmente purificados. Letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5%. Temp.: $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60 \pm 10,0\%$; fotofase: 14 horas.

4.3.5.2 Número de ínstar

Em relação aos parâmetros já avaliados anteriormente (duração e viabilidade larval, duração do período pupal, peso de pupas (macho e fêmeas), deformação de pupas e razão sexual), os resultados se mantiveram (Tabela 10) e o atraso no período larval (Figura 10) foi significativo em todos os ensaios, demonstrando o efeito *in vivo* dos inibidores de soja no desenvolvimento de lagartas de *D. saccharalis*.

Tabela 10. Parâmetros biológicos avaliados de *D. saccharalis* alimentadas em dietas artificiais sem inibidor e com 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10,0\%$; fotofase: 14 horas.

FASE LARVAL			
Parâmetros		sem IPs	0,5% (p/p) IPs
Duração (dias)		$23,892 \pm 0,231$ a	$28,065 \pm 0,303$ b
Viabilidade (%)		$100,00 \pm 0$ a	$91,20 \pm 2,773$ b
FASE PUPAL			
Parâmetros		sem IPs	0,5% (p/p) IPs
Duração (dias)		$9,08 \pm 0,058$ a	$10,08 \pm 0,065$ b
Peso (mg)	Machos	$131,767 \pm 1,532$ a	$128,734 \pm 5,786$ a
	Fêmeas	$198,258 \pm 4,517$ a	$198,671 \pm 4,824$ a
Deformação (%)		$1,500 \pm 2,366$	0 ± 0 a
Razão sexual (rs)*		$0,523$ a	$0,623$ a

Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade;

* Dados comparados pelo teste não paramétrico de X^2 .

Figura 10. Tubos nos quais as lagartas de *D. saccharalis*, criadas em dieta artificial sem inibidor (A) e com 0,5% (p/p) (B) de IPs de soja parcialmente purificados, ainda não tinham se transformado em pupas no 26º dia. Os tubos com o algodão voltado para o lado de fora da caixa apresentam pupas. Temp.: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10,0\%$; fotofase: 14 horas.

A cada ecdise existe um “salto” nas medidas das cápsulas cefálicas da amostra de lagartas (Figura 11). Cada pico da curva multimodal de frequência representa um ínstar. A curva multimodal de frequências indicou a presença de cinco picos para lagartas alimentadas em dieta sem inibidor de IPs e seis picos para lagartas alimentadas em dieta contendo 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados, sendo os quatro primeiros bem distintos e os dois últimos muito próximos, demonstrando a existência de, no mínimo, cinco e, no máximo, seis ínstares larvais (Figura 12).

Na dieta sem inibidor, todas as lagartas apresentaram cinco ínstares. Por outro lado, na dieta contendo 0,5% (p/p) de IP as lagartas apresentaram cinco e seis ínstares, havendo uma predominância de lagartas de seis ínstares (56%) (Tabelas 11 e 12).

Figura 11. Largura média da cápsula cefálica e duração de cada ínstar de lagartas de *D. saccharalis*, criadas em dieta artificial sem inibidor e com 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados de soja. Temperatura: $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, UR: $60 \pm 10,0\%$, fotofase: 14 horas.

Figura 12. Gráfico multimodal de frequência das larguras das cápsulas cefálicas de *D. saccharalis*, alimentadas em dieta sem inibidor (A) (8 lagartas) e com 0,5% (p/p) (B) de IPs de soja parcialmente purificados (25 lagartas), representando cinco e seis instares larvais respectivamente. Temp.: $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; UR: $60 \pm 10,0\%$; fotofase: 14 horas.

Tabela 11. Largura média da cápsula cefálica, razão de crescimento e duração de cada ínstar de lagartas de *D. saccharalis*, criadas em dieta artificial sem inibidor. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10,0\%$, fotofase: 14 horas.

Ínstar	Largura da cápsula cefálica (mm)		Razão de crescimento	Duração (dias)
	Intervalo de variação	média		
I	0,27 - 0,36	$0,33 \pm 0,009$		$3,250 \pm 0,163$
II	0,48 - 0,53	$0,50 \pm 0,007$	1,51	$3,375 \pm 0,263$
III	0,65 - 0,87	$0,80 \pm 0,016$	1,60	$3,375 \pm 0,182$
IV	1,07 - 1,47	$1,25 \pm 0,021$	1,56	$4,375 \pm 0,263$
V	1,62 - 2,05	$1,83 \pm 0,025$	1,46	$7,25 \pm 0,559$
Média de razão de crescimento			1,53	

Tabela 12. Largura média da cápsula cefálica, razão de crescimento e duração de cada ínstar de lagartas de *D. saccharalis*, criadas em dieta artificial contendo 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados de soja. Temperatura: $25 \pm 2^\circ\text{C}$, UR: $60 \pm 10,0\%$, fotofase: 14 horas.

Ínstar	Largura da cápsula cefálica (mm)		Razão de crescimento	Duração (dias)
	Intervalo de variação	média		
I	0,30 - 0,38	$0,34 \pm 0,009$		$3,44 \pm 0,116$
II	0,44 - 0,56	$0,50 \pm 0,010$	1,47	$3,64 \pm 0,151$
III	0,67 - 0,84	$0,75 \pm 0,012$	1,5	$3,68 \pm 0,160$
IV	0,90 - 1,22	$1,09 \pm 0,017$	1,45	$4,64 \pm 0,190$
V	1,38 - 1,90	$1,65 \pm 0,021$	1,51	$7,20 \pm 0,372$
VI*	1,91 - 2,33	$2,12 \pm 0,022$	1,28	$7,28 \pm 0,384$
Média de razão de crescimento			1,44	

* 56% das lagartas apresentaram seis ínstaes.

As hipóteses de 5 ínstaes para dieta sem inibidor e 5 e 6 ínstaes para a dieta contendo 0,5% (p/p) de IPs de soja parcialmente purificado é assegurada pela taxa de crescimento ($K = 1,54; 1,46$ e $1,58$ respectivamente) e o coeficiente de determinação ($R^2 = 100; 100$ e 99 respectivamente) obtidos pelo modelo da regra de Dyar para determinação real de ínstaes larvais.

4.4 Efeito *in vitro* dos IPs de soja após a incorporação em dieta artificial

4.4.1 Inibidores de proteinase (IPs) de soja parcialmente purificados

A atividade das enzimas digestivas do tipo tripsina de *D. saccharalis*, alimentadas em dieta contendo 0,5% (p/p) de IPs de soja parcialmente purificados foi de 386,14 nmoles p-nitroanilina/min./mg de proteína, ou seja, aproximadamente quatro vezes superior a daquelas lagartas mantidas em dieta sem inibidor (88,8 nmoles p-nitroanilina/min./mg de proteína) (Figura 13).

Figura 13. Atividade das enzima do tipo tripsina presentes no homogeneizado intestinal de lagartas de *D. saccharalis*, alimentadas em dieta artificial sem inibidor e 0,5% (p/p) de IPs de soja parcialmente purificados. Temp.: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10,0\%$; fotofase: 14 horas. Substrato usado: BAPA.

A porcentagem de inibição nos homogeneizados intestinais obtidos de lagartas, alimentadas com dieta contendo 0,5% (p/p) de IPs de soja parcialmente purificados, foi inferior àquelas alimentadas com dieta sem inibidor (Figura 14).

Figura 14. Inibição da atividade proteolítica da enzima do tipo tripsina, presente em homogeneizado intestinal de lagartas de *D. saccharalis*, alimentadas em dieta artificial sem inibidor (linha cheia) e com 0,5% (p/p) (linha pontilhada) pelo IP do tipo Kunitz (Sigma) (▲), e pelos IPs de soja parcialmente purificados (○) em diferentes concentrações. Substrato usado: BAPA.

No gel de atividade também foi possível observar uma maior atividade da enzima do tipo tripsina de lagartas alimentadas em dieta contendo o inibidor (Figura 15).

Figura 15. Gel de atividade. I – homogeneizado intestinal proveniente de lagartas criadas em dieta artificial sem inibidor, diluído 2 vezes; II – homogeneizado intestinal proveniente de lagartas criadas em dieta artificial contendo 0,5% (p/p) de IPs de soja parcialmente purificados, diluído 2 vezes.

4.4.2 Inibidores de proteinase (IPs) de soja puros

Como observado no item 4.4.1, as atividades das enzimas do tipo tripsina utilizando o substrato BAMCA foram superiores no homogeneizado intestinal de lagartas de *D. saccharalis* mantidas em dieta artificial contendo os IPs de soja parcialmente purificados. Isso indica que a atividade da tripsina foi aumentada quando a lagarta se alimentou da dieta artificial contendo os inibidores. Entretanto, a hidrólise do substrato ZAMCA foi similar para todos os homogeneizados intestinais sugerindo a presença de uma outra enzima do tipo tripsina que reconhece diferencialmente substratos distintos (Tabela 13).

Já os valores referentes à atividade da quimotripsina (substrato SAAPMCA) presentes no homogeneizado intestinal das lagartas de *D. saccharalis*, provenientes de dieta artificial contendo IPs de soja parcialmente purificados, foram inferiores ao controle (Tabela 13).

Tabela 13. Atividade enzimática específica (mU/mg de proteína) das enzimas do tipo tripsina e quimotripsina presentes no homogeneizado intestinal de lagartas de *D. saccharalis* criadas em dieta artificial contendo 0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados, 0,5% (p/p) de IP do tipo Kunitz (Sigma), 0,5% (p/p) de IP do tipo Bowman-Birk (Sigma) e controle (sem IPs).
Temp.: $25 \pm 2^\circ\text{C}$; UR: $60 \pm 10,0\%$; fotofase: 14 horas.

Dieta	Atividade enzimática (mU/mg proteína)		
	Substrato BAMCA	Substrato ZAMCA	Substrato SAAPMCA
Sem inibidor	1494800	5657845	2410015
0,5% (p/p) de IPs parcialmente purificados	2531127	5931808	745768,5
0,5% (p/p) de IP do tipo Kunitz (Sigma)	2687913	5335830	1201334
0,5% (p/p) de IP do tipo Bowman-Birk (Sigma)	5682813	4388081	1107109

BAMCA e ZAMCA: substratos específicos para a enzima do tipo tripsina;
SAAPMCA: substrato específico para a enzima do tipo quimotripsina.

5 DISCUSSÃO

5.1 Identificação e caracterização das principais enzimas proteolíticas de *D. saccharalis* e efeito *in vitro* dos IPs de soja antes da incorporação em dieta artificial.

Para o desenvolvimento de métodos de controle de insetos fitófagos, através de plantas transgênicas expressando inibidores de proteinase, é essencial o entendimento das funções do sistema digestivo dos insetos (Terra & Ferreira, 1994).

A atividade proteolítica em Lepidoptera é freqüentemente atribuída à tripsina a qual tem atividade máxima em pH elevados (Applebaum, 1985). As proteases presentes no tubo digestivo de insetos têm sido caracterizadas em várias Ordens de insetos e em espécies de Lepidoptera, sendo que as serina-proteinases são as principais proteases digestivas. O pH do conteúdo intestinal é uma das mais importantes propriedades do meio interno que afeta as enzimas digestivas. Insetos da ordem Lepidoptera possuem o conteúdo intestinal bastante alcalino (Terra & Ferreira, 1994).

Os resultados obtidos pela caracterização, utilizando substratos sintéticos, sugerem a presença de três atividades proteolíticas principais: duas semelhantes às tripsinas e uma atividade quimotriptica. De acordo com Ferreira et al. (1994) as tripsinas e quimotripsinas são as principais enzimas de lepidópteros. *Ostrinia nubilalis* (Hübner), também contém duas tripsinas diferentes e uma quimotripsina (Houseman et al., 1989).

Em comparação com a tripsina, a quimotripsina apresenta uma atividade menor. Enquanto a tripsina possui um valor máximo de aproximadamente 250 nmoles de p-nitroanilina/min./mg de proteína, a quimotripsina atinge aproximadamente 100 nmoles de p-nitroanilina/min./mg de proteína. Isto pode indicar que a tripsina seja a principal enzima de *D. saccharalis*. A presença de uma atividade quimotriptica inferior às

atividades trípticas é normalmente encontrada em insetos da ordem Lepidoptera (Christeller et al., 1992).

Os resultados da presente pesquisa indicam que lagartas de *D. saccharalis* dependem de enzimas do tipo tripsina em uma maior extensão do que enzimas do tipo quimotripsina, ou seja, estes dados sugerem que inibidores de tripsina podem ser mais efetivos do que inibidores de quimotripsina nesta espécie.

Os ensaios de inibição das proteinases digestivas *in vitro* são importantes pois permitem avaliar, ainda que com algumas restrições, o potencial dos diferentes inibidores sobre as atividades proteolíticas das enzimas presentes no tubo digestivo dos insetos. Entre os diferentes IPs testados, o Kunitz (Sigma) foi o mais eficiente na inibição da atividade das enzimas do tipo tripsina. Como observado em *Spodoptera frugiperda* (Smith) os IPs de soja foram capazes de inibir praticamente toda ação das tripsinas (Ferreira et al., 1994, Paulillo et al., 2000).

Os resultados deste trabalho mostraram que o IP do tipo Kunitz foi mais eficiente contra a atividade proteolítica das tripsinas das lagartas em relação ao IP do tipo Bowman-Birk. Estes resultados também foram obtidos para *Helicoverpa armigera* (Hardwick) (Johnston et al., 1991), *Spodoptera frugiperda* (Paulillo et al., 2000) e *H. virescens* (Johnson et al., 1993; Johnston et al., 1995). Os ensaios de inibição realizados neste trabalho, com os IPs parcialmente purificados, mostraram que a maior parte dos IPs encontrados nas sementes é do tipo Kunitz.

Outra observação interessante do presente trabalho foi que os IPs do tipo Kunitz e Bowman-Birk (ambos da Sigma) juntos apresentaram maior porcentagem de inibição que quando presentes isoladamente. Ortego et al. (1998) observaram que a maior taxa de mortalidade de *Aubeonymus mariaefranciscæ* (Roudier) (aproximadamente 90,0%) ocorreu com larvas alimentadas em dieta contendo uma combinação de dois ou três inibidores. A ação complementar destes inibidores pode explicar seu efeito sinérgico quando adicionados juntos, na dieta. Burgess et al. (1994) observaram um efeito sinérgico da combinação de IPs na sobrevivência e crescimento de *Teleogryllus commodus* (Walker).

5.2 Efeito *in vivo* dos inibidores de proteinase (IPs) de soja

A partir da caracterização das principais proteinases das lagartas de *D. saccharalis* e dos ensaios com os inibidores *in vitro*, foi possível acumular resultados importantes para os ensaios *in vivo*.

Os experimentos para testar a eficácia dos IPs contra insetos, via incorporação em dietas artificiais, têm sido realizados numa ampla faixa de concentração de inibidores (0,02 – 20% (p/p), o que equivale à uma concentração de 0,01-13 mM (Jongsma & Bolter, 1997). No presente trabalho, a concentração utilizada foi de 0,5% (p/p), o que equivale à cerca de 0,25 mM de inibidor na dieta. Normalmente, a concentração de IPs nas plantas varia significativamente. Em folhas, a concentração de IPs é extremamente baixa, mas devido ao ataque de pragas ou danos mecânicos, os níveis de IPs são altamente induzidos (Green & Ryan, 1972). Por outro lado, em plantas adultas os níveis de IPs são inferiores aos obtidos em plantas jovens, mesmo após um estímulo (Wolfson & Murdock, 1990). Entretanto, os níveis de IPs mais elevados em plantas são encontrados nas sementes e órgãos de armazenamento, podendo chegar a 5-15% de proteína total em cereais, leguminosas, batata e tomate (Jongsma & Bolter, 1997).

Num ensaio preliminar foi observado uma significativa mortalidade inicial das lagartas de *D. saccharalis*. No entanto, as lagartas provenientes da Copersucar desenvolveram-se em uma dieta à base, principalmente de cana, menos rica em nutrientes e provavelmente mais próxima às condições encontradas pela lagarta no campo. Já no segundo ensaio biológico, as lagartas foram provenientes do Laboratório de Biologia de Insetos (Departamento de Entomologia/ESALQ/USP) que possui uma dieta mais rica em nutrientes. Muito provavelmente isto pode ter afetado a resposta da lagarta ao inibidor. As lagartas provenientes de uma dieta deficiente em nutrientes, supostamente sentiriam maior efeito do inibidor do que uma lagarta proveniente de uma dieta rica. Vários estudos têm mostrado que a concentração protéica da dieta e sua qualidade em termos de digestibilidade por proteases (Broadway & Duffey, 1986) e sua composição de aminoácidos (Mollema & Cole, 1995) determinam a intensidade das deficiências.

Os novos ensaios biológicos foram realizados com o propósito de verificar esse possível efeito de diferentes dietas sobre o desenvolvimento das lagartas de *D. saccharalis*.

As exigências dos insetos com relação à aminoácidos são extremamente variáveis. De uma maneira geral, para crescimento e desenvolvimento, os insetos necessitam de pelo menos 10 aminoácidos essenciais (arginina, histidina isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina).

O germe-de-trigo, presente principalmente na dieta considerada mais rica, contém todos os nutrientes, à exceção do ácido ascórbico, apresenta 18 aminoácidos, açúcares, triglicerídeos, fosfolípidios (colina e inositol), vitaminas do complexo B, tocoferol, caroteno, 21 elementos minerais e mais 50 enzimas. Além disso, o germe-de-trigo contém substâncias fago-estimulantes que são compostos que induzem os insetos a se alimentarem. Ao lado disso, não apresenta toxinas (Parra, 1979).

Foi observado ainda, que o óleo de germe-de-trigo é mais estimulante à alimentação de gafanhotos que oliveira, mostarda, milho, semente de algodão e óleo de coco (Parra, 1979). Por outro lado, a dieta à base de germe-de-trigo, farinha-de-milho e levedura-de-cerveja (Parra & Mihsfeldt, 1992) apresenta uma deficiência de um ou mais aminoácidos importantes (lisina e triptofano, por exemplo) e menor estímulo à alimentação.

Os resultados obtidos neste trabalho, com o ensaio utilizando duas dietas distintas sugerem que as dietas mais ricas em nutrientes tendem a atenuar os efeitos antimetabólicos causados pela presença dos IPs de soja. A dieta menos rica em nutrientes acrescida dos IPs de soja parcialmente purificados (0,5% (p/p)) proporcionou um maior atraso no período larval, assim como uma menor viabilidade pupal e larval. Estas observações são extremamente relevantes, pois sugerem que concentrações sub-ótimas de componentes das dietas artificiais devam ser empregadas a fim de maximizar o efeito dos IPs nas dietas. Deve-se ressaltar também que a situação encontrada pelo inseto na natureza, mais particularmente quando é hospedeiro da cana-de-açúcar, é muito diferente daquela encontrada nas dietas artificiais ricas.

Em uma dieta não é a quantidade, mas a qualidade (por exemplo, presença de metionina) da proteína da dieta que determina a eficiência dos inibidores de proteinase (Broadway & Duffey, 1986). A análise bromatológica para ambas dietas utilizadas neste trabalho não permitiu uma avaliação mais detalhada das concentrações dos aminoácidos, sais minerais, etc., que são fatores determinantes da qualidade da dieta.

A longevidade dos adultos varia de 1 a 12 dias, com fêmeas vivendo mais que os machos, segundo observações realizadas em condições de laboratório. Já o número de ovos postos por fêmea pode variar de 100 a 800 (Sgrillo, 1973). Isso demonstra a alta capacidade de postura dessa praga.

A longevidade das fêmeas para a dieta contendo IPs foi menor, sugerindo um menor tempo para oviposição. Uma maior porcentagem de postura, de modo geral foi obtida nos quatro primeiros dias, para adultos provenientes da dieta sem inibidor havendo um decréscimo, com o aumento da idade. Este resultados são coincidentes com as observações de Walker & Figueroa (1964) que obtiveram 76,58% de ovos de *D. saccharalis* do primeiro ao quarto dia de postura.

O número total de ovos, obtidos neste trabalho, por fêmea foi bastante variável (47 a 1419 e 167 a 1310 para dietas sem e com 0,5% (p/p) de IPs respectivamente). Esta alta variação, também foi observada por Moreti (1980), em dieta artificial (14 a 1034 ovos), e por Correia (1984), em dieta natural (13 a 1184) em adultos de *Heliothis virescens* (Fabricius).

Em relação aos efeitos dos IPs nas diferentes fases de desenvolvimento de *D. saccharalis*, alimentadas em dieta artificial, observa-se uma concordância com os estudos baseados nos ensaios de inibição *in vitro*. Isto mostra que os ensaios *in vitro* podem ser úteis para a seleção de inibidores com potencial para aumentar a resistência de culturas. Além de uma efetiva inibição das atividades proteolíticas *in vitro*, foi observado um efeito significativo *in vivo* dos IPs sobre as lagartas e adultos de *D. saccharalis*. Foram observadas diferenças significativas na duração do período larval e na viabilidade pupal de insetos, alimentados com dieta contendo inibidor de proteinase de soja. Assim, os resultados sugerem que os inibidores de proteinase de soja interferem no desenvolvimento e metabolismo do inseto.

O peso médio de lagartas alimentadas em dieta contendo IPs foi significativamente inferior ao das lagartas mantidas em dieta sem os IPs, concordando com os resultados observados por McManus & Burgess (1995) em *Spodoptera litura*.

Diversos autores têm demonstrado que a ingestão de IPs em dietas naturais e artificiais podem retardar o crescimento e o desenvolvimento de diversas espécies de insetos pragas, sugerindo que estes inibidores podem servir com um meio efetivo de controle de insetos (revisto por Jongsma & Bolter, 1997).

A relativa eficiência do Kunitz e Bowman-Birk *in vitro* e *in vivo* indica que estes inibidores interferiram na proteólise normal, resultando em uma deficiência de proteína ou, mais provavelmente, aminoácidos essenciais. Broadway & Duffey (1986) observaram que suplementando as dietas artificiais contendo inibidor com metionina, os efeitos adversos do IP do tipo Kunitz no crescimento de lagartas de *Heliothis zea* (Boddie) e *Spodoptera exigua* (Hübner) foram diminuídos, sugerindo que o crescimento larval era limitado pelo baixo nível de aminoácidos essenciais na dieta.

O atraso do período larval e a redução no tamanho e peso observado nas lagartas alimentadas em dieta contendo IPs, conseqüentemente provocaram o aumento do número e duração dos ínstaes. O número de ínstaes não é constante, variando na maioria de Lepidoptera entre 4 a 6. Dentro de uma mesma espécie, o número de ínstaes pode ser constante entre os indivíduos ou variável em condições desfavoráveis como, por exemplo, alimento inadequado. Em algumas espécies as fêmeas podem exibir um ínstar adicional (Slansky Jr. & Scriber, 1985). Segundo estes autores, um maior número de ínstaes apresentado por um inseto é sinônimo de inadequação nutricional. Em condições desfavoráveis o inseto tende a apresentar um maior número de ínstaes (Roe et al., 1982).

A hipótese formulada do número de ínstaes foi avaliada através do coeficiente de determinação (R^2) e pelo valor da constante de Dyar (K). Valores de R^2 acima de 80% e K no intervalo de 1,1, a 1,9 (Parra & Haddad, 1989) comprovaram a hipótese de 5 ínstaes para a dieta sem inibidor e 5 e 6 ínstaes para a dieta contendo 0,5% (p/p) de IPs, com probabilidade de erro de 5%.

Os seres vivos, em geral, são um reflexo daquilo que consomem e este fato evidencia a importância do alimento para os organismos. No caso dos insetos, muitos aspectos da sua biologia, incluindo o comportamento, a fisiologia e a ecologia, estão de uma ou outra maneira, inseridos dentro de um contexto nutricional. Além da quantidade, a qualidade e proporção de nutrientes presentes no alimento e a presença de compostos secundários ou não-nutricionais causam um impacto variável na biologia dos insetos, determinando a sua capacidade de contribuição reprodutiva para a geração seguinte (Parra, 1991).

O potencial de crescimento de populações de insetos é uma informação de interesse em muitos estudos sobre dinâmica populacional, manejo de pragas e avaliação de risco de agentes de controle biológico. Na avaliação de risco, por exemplo, é importante avaliar os possíveis efeitos de biopesticidas sobre o potencial de crescimento de populações de insetos não alvo.

Vários tipos de análises de tabela de vida têm sido utilizados para avaliar os efeitos de fatores abióticos e bióticos no crescimento da população na natureza (Gutierrez, 1996). Os dados da tabela de vida obtidos neste trabalho, mostraram que *D. saccharalis* provenientes de dieta artificial contendo IPs apresentaram uma capacidade de aumento populacional (R_0) a cada geração de 88,6 vezes menor, com a duração média de uma geração (T) de aproximadamente 7 dias a mais quando comparada com a dieta sem inibidor.

5.3 Efeitos *in vitro* após incorporação dos IPs de soja em dieta artificial

Os ensaios de atividade, bem como o gel de atividade das proteinase, revelaram um aumento de aproximadamente quatro vezes da atividade triptica, nas lagartas alimentadas em dieta acrescida dos IPs parcialmente purificados. Além disso, a porcentagem de inibição *in vitro* pelos IPs foi inferior nos homogeneizados intestinais provenientes de lagartas mantidas em dieta contendo inibidores, mostrando uma certa adaptação das lagartas aos IPs de soja.

Broadway & Duffey (1986) observaram que IPs incorporados em dieta de *H. zea* e *S. exigua* estimularam a atividade tríptica nos tubo digestivos de lagartas de ambas as espécies. Isto sugere que uma hiperprodução da tripsina contribui para os efeitos adversos dos inibidores, provavelmente carreando aminoácidos essenciais para a síntese de proteinases em detrimento de outras proteínas.

Larocque & Houseman (1990) também observaram que a atividade tríptica era aumentada quando IPs e outros inibidores foram adicionados em dieta artificial de *O. nubilalis*. Os inibidores de soja, que são capazes de inibir a tripsina e a quimotripsina de *O. nubilalis*, causaram decréscimo da atividade quimotríptica, aumento da atividade tríptica, um correspondente aumento no conteúdo de proteína no tubo digestivo e decréscimo no peso larval. Possivelmente, a redução na proteólise do alimento ingerido resulta em aumento do conteúdo de proteína no tubo digestivo e um subsequente decréscimo no peso larval como consequência da redução da conversão ou disponibilidade de nutrientes. Por outro lado, um número crescente de trabalhos têm demonstrado que os insetos são capazes de se adaptarem a presença de IPs em suas dietas (Jongsma & Bolter 1997; Broadway, 1997, Paulillo et al., 2000).

Um aspecto interessante observado, foi que lagartas oriundas de adultos que tiveram suas dietas com os inibidores, tiveram respostas semelhantes àquelas que foram alimentadas com dieta artificial simples, ou seja, na segunda geração praticamente não houve diferença entre as lagartas alimentadas com ou sem inibidor. Desta forma, pode-se supor um possível mecanismo adaptativo do inseto ao longo das gerações, quando criado em dietas contendo IPs. Este aspecto torna-se relevante quando é considerada a possibilidade de introdução de genes que codificam os inibidores de proteinase da soja na cana. Neste caso, devem ser implementadas técnicas adequadas de manejo (plantio de material não transformado juntamente com as plantas transgênicas) para que a pressão de seleção não seja muito intensa, favorecendo o aparecimento de populações adaptadas.

A adaptação dos insetos aos inibidores de proteinase pode influenciar drasticamente a sua eficácia *in vivo* (Jongsma & Bolter, 1997). Além disso, alguns inibidores de proteinase são sensíveis à proteólise por enzimas digestivas nos insetos (Michaud et al., 1995). Embora os resultados indiquem que a seleção *in vitro* pode ser útil

para a escolha de IPs efetivos para um inseto particular, a validação em dietas artificiais antes de transformar a cultura de interesse é extremamente necessária (Ortego et al., 1998).

Ambos resultados, *in vitro* e *in vivo* indicam que IP do tipo Kunitz são bons candidatos para a introdução, como um mecanismo de proteção, em plantas susceptíveis ao ataque da broca. Assim, os resultados são muito relevantes na utilização dos genes que codificam os IPs de soja em plantas transgênicas de cana-de-açúcar como uma estratégia no controle da broca.

6 CONCLUSÕES

- Os inibidores de proteinase (IPs) de soja influenciam no desenvolvimento e conseqüentemente refletem na redução do crescimento da população da broca-da-cana;
- Os IPs de soja, quando incorporados em dietas artificiais, alongam os períodos larval e pupal, refletindo, conseqüentemente na redução do peso larval e no aumento do número e duração dos ínstaes e nos valores de tabela de vida de fertilidade, pois são obtidas menores taxas líquidas de reprodução (Ro), capacidade inata de aumentar em número (Rm) e razão finita de aumento (λ) para adultos provenientes de lagartas alimentadas com dietas artificiais contendo IPs;
- A segunda geração de lagartas alimentadas em dieta artificial não é influenciada pela presença dos IPs;
- A qualidade da dieta influencia na resposta ao inibidor;
- Há aumento da atividade das enzimas do tipo tripsina e redução da porcentagem de inibição das mesmas pelos IPs de soja, nos homogeneizados intestinais de lagartas que se alimentam de dietas contendo IPs de soja.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin – molecular cloning and expression studies. **European Journal of Biochemistry**, v.209, p.933-937, 1992.
- ALMEIDA, L.C. de; ARRIGONI, E.D.B.; RODRIGUES FILHO, J.P. Modelo de análise econômica para avaliação do controle biológico da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*. VII Seminário Copersucar de Tecnologia Agronômica, v.6, p.95-104. 1997.
- ALVES, L.C.; ALMEIDA, P.C.; FRANZONI, L.; JULIANO, M.A. Synthesis of N α -protected aminoacyl 7-amido 4-methyl-coumarin amide by phosphorous oxychloride and preparation of specific fluorogenic substrates for papain. **Peptide Research**, v.9, p.92-96, 1996.
- APPLEBAUM, S.W. Biochemistry of digestion. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I., (EDs) **Comparative Physiology, Biochemistry and Pharmacology of Insects**. New York: Pergamon Press, 1985. v.4, cap.7, p.279-312.
- ARAÚJO, J.R. de. **Guia prático para criação da broca da cana-de-açúcar e de seus parasitóides em laboratório**. Piracicaba: Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-Açúcar, 1987. 36p.

- ARENCIBIA, A.; VAZQUEZ, R.I.; PRIETO, D.; TELLES, P.; CARMONA, E.R.; COEGO, A.; HERNANDEZ, L.; DELARIVA, G.A.; SELMANHOUSEIN, G. Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. **Molecular Breeding**, v.3, n.4, p.247-255, 1997.
- ARENCIBIA, A.D., CARMONA, E.R.; CORNIDE, M.T.; CASTIGLIONE, S.; O'RELLY, J. CHINEA, A.; ORAMA, P.; SALA, F. Somaclonal variation in insect-resistant transgenic sugarcane (*Saccharum hybrid*) plants produced by cell electroporation. **Transgenic Research**, v.8, n.5, p.349-360, 1999.
- ATKINSON, A.H.; HEALTH, R.L.; SIMPSON, R.J.; CLARKE, A.E.; ANDERSON, M.A. Proteinase inhibitors in *Nicotiana glauca* stigmas are derived from a precursor protein which is processed into 5 homologous inhibitors. **Plant Cell**, v.5, p.203-213, 1993.
- BALANDIN, T.; DOES, C.V.; ALBERT, J.M.B.; BOL, J.F. LINTHORST, H.J.M. Structure and induction pattern of a novel proteinase inhibitor class II gene of Tobacco. **Plant Molecular Biology**, v.27, p.1197-1204, 1995.
- BASTOS, E. **Cana-de-açúcar – o verde mar de energia**. Coleção Brasil Agrícola. São Paulo: Ícone, 1987. 130p.
- BELZUNCES, L.P.; LENFANT, C.; DIPASQUALE, S.; COLIN, M.E. In vivo and in vitro effects of Wheat-Germ-Agglutinin and Bowman-Birk soybean trypsin-inhibitor, 2 potential transgene products, on midgut esterase and protease activities from *Apis mellifera*. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**, v.109, n.1, p.63-69, 1994.
- BERGAMIN, J. A broca da cana-de-açúcar. **Brasil Açúcareiro**, v.32, n.5, p72-79, 1948a.

- BERGAMIN, J. A broca da cana-de-açúcar. **Brasil Açúcareiro**, v.32, n.6, p105-110, 1948b.
- BIRCH, R.G. New gene technologies and their potential value for sugarcane. **Outlook on Agriculture**, v.25, n.4, p.219-226. 1996.
- BOTELHO, P.S.M.; PARRA, J.R.P.; CHAGAS NETO, J.F. das; OLIVEIRA, C.P.B. Associação do parasitóide de ovos *Trichogramma galloi* Zucchi (Hymenoptera: Trichogrammatidae) e do parasitóide larval *Cotesia flavipes* (Cam.) (Hymenoptera: Braconidae) no controle de *Diatraea saccharalis*, (Fabr.) (Lepidoptera: Crambidae) em cana-de-açúcar. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v.28, n.3, p.491-496, 1999.
- BRADFORD, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- BROADWAY, R. Are insects resistant to plant proteinase inhibitor? **Journal of Insect Physiology**, v. 41, p. 107-116, 1995.
- BROADWAY, R.; DUFFEY, S. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effects on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, v 32, p. 827-833, 1986.
- BROADWAY, R.M. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** v.32, n.1, p.39-53, 1996.
- BROADWAY, R.M. Dietary regulation of serine that are resistant to serine proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v.43, p.855-874, 1997.

- BROADWAY, R.M.; VILLANI, M.G. Does host-range influence susceptibility of herbivorous insects to nonhost plant proteinase-inhibitors? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.76, n.3, p.303-312, 1995.
- BURGESS, E.P.J.; MAIN, C.A.; STEVENS, P.S.; CHRISTELLER, J.T.; GATEHOUSE, A.M.R.; LAING, W.A. Effects of protease inhibitor concentration and combinations on the survival, growth and gut enzyme activities of the black field cricket *Teleogryllus commodus*. **Journal of Insect Physiology**, v.40, p.803-811, 1994.
- BUTT, B.A.; CANTU, E. **Sex determination of lepidopterous pupae**. Washington: USDA, 7p, 1962.
- CÂMARA, G.M. de S.; OLIVEIRA, E.A.M. de. **Produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: FEALQ, 1993. 242p.
- CASTILHO, H.J. Introdução de *Apanteles flavipes* (Cam., 1891) (Hymenoptera, Braconidae) para o controle biológico da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera, Pyralidae), na região de Santa Bárbara D'Oeste, SP . Piracicaba, 1982. 79p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- CHRISTELLER, J.T.; LAING, W.A.; MARKWICK, N.P.; BURGESS, E.P.J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.22, p.735-746, 1992.
- CHRISTELLER, J.T.; SHAW, B.D. The interaction of a range of serine proteinase inhibitor with bovine trypsin and *Costelytra zealandica* trypsin. **Insect Biochemistry**, v.19, n.3, p.233-241, 1989.

- CORREIA, J.S. Influência de cultivares de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.) na biologia de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) (Lepidoptera – Noctuidae). Piracicaba, 1984. 72p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- DEGASPARI, N.; MACEDO, N.; BOTELHO, P.S.M.; ARAÚJO, J.R.; ALMEIDA, L.C. Predação e parasitismo de ovos da *Diatraea saccharalis* em cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.22, p.785-792, 1987.
- DUAN, X.; LI, X.; XUE, Q.; ABO-EL-SAAD, M.; XU, D. & WU, R. Transgenic rice plants harboring and introduced potato proteinase inhibitors II gene are insect resistant. **Nature Biotechnology**, v.14, p. 494-498, 1996.
- FERNANDES, V. Secapi é aberta com discussão política. **Jornal de Piracicaba. Suplemento especial**, Piracicaba, 27 jul. 1999. p.D-1.
- FERREIRA, C.; CAPELLA, A.N.; SITNIK, R.; TERRA, W.R. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.107A, p.631-641, 1994.
- FNP CONSULTORIA & COMÉRCIO, 2000. **Agrianual: Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo, 2000. p.249-269.
- GALLO, D. Controle biológico da broca da cana-de-açúcar. **Acta toxicológica**, Pelotas, v.8-9, p43-47, 1985/86.
- GALLO, D. **Pragas da cana-de-açúcar**. Ribeirão Preto: Copereste, 1968. 23p.

- GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Identifying proteins with insecticidal activity: Use of encoding genes to produce insect resistant transgenic crops. **Pesticide Science**, v. 52, p.165-175, 1998.
- GATEHOUSE, A.M.R.; NORTON, E.; DAVISON, G.M.; BABBÉ, S.M.; NEWELL, C.; GATEHOUSE, J.A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. **Journal of Insect Physiology**, v. 45, p.545-558, 1998.
- GATEHOUSE, A.M.R.; NORTON, E.; DAVISON, G.M.; BARBÉ, S.M.; NEWELL, C.A.; GATEHOUSE, J.A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. **Journal Insect Physiology**, v.45, p.545-558, 1999.
- GREEN, T.R.; RYAN, C.A. Wound-induced proteinase inhibitors in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, v.175, p. 776-777, 1972.
- GUEVARA, L.A.C. Aspectos da biologia em condições naturais e frequência de acasalamento da *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera – Crambidae) a broca da cana-de-açúcar. Piracicaba, 1976. 70p. Dissertação (mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- GUTIERREZ, A.P. **Applied Population Ecology. A supply-demand approach**. New York: John Wiley & Sons, 1996. cap. 4, p.42-63: Life Tables.
- HAYWARD, K.J. A broca da cana-de-açúcar. **Brasil Açucareiro**, v.22, n.11, p.69-74, 1943.

- HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E., GARKER, R.F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v.330, p.161-163, 1987.
- HOUSEMAN, J.G.; DOWNE, A.E.R.; PHILOGÈNE, B.J.R. Partial characterization of proteinase activity in the larval midgut of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). **Canadian Journal of Zoology**, v.67, p.864-868, 1989.
- HOUSEMAN, J.G.; PHILOGÈNE, J.R. Partial characterization of proteinase activity in the larval midgut of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae). **Canadian Journal of Zoology**, v.67, p.864-868, 1988.
- JOHNSON, K.A.; GATEHOUSE, J.A.; ANSTEE, H. Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Physiology**, v.39, p.657-664, 1993.
- JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; AN, G. & RYAN, C. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 86, p.9871-9875, 1989.
- JOHNSTON, K.A.; LEE, M.J.; BROUGH, C.; HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A. Protease activities in the larval midgut of *Heliothis virescens*. Evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.25, p.375-383, 1995.
- JOHNSTON, K.A.; LEE, M.J.; GATEHOUSE, J.A.; ANSTEE, J.H. The partial purification and characterization of serine protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry**, v.21, p.389-397, 1991.

- JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W.J.
Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of proteinase activity insensitive of inhibition. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.92, p.8041-8045, 1995.
- JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v.43, n.10, p.885-895, 1997.
- JORDÃO, B.J.T.; TERRA, W.R.; RIBEIRO, A.F.; LEHANE, M.J.; FERREIRA, C.
Trypsin secretion in *Musca domestica* larval midguts: a biochemical and immunocytochemical study. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.26, p.337-346, 1996.
- JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M.
Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, v.131, p.1-11, 1998.
- KING, E.G.; HARTLEY, G.G. *Diatraea saccharalis*. In: SINGH, P.; MOORE, R.F. (Ed.). **Handbook of Insect Rearing**. New York: Elsevier, 1985, p.265-270.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227 p.680-685, 1970.
- LAROCQUE, A.M.; HOUSEMAN, J.G. Effect of ingested soybean, ovomucoid and corn protease inhibitors on digestive processes of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Insect Physiology**, v.36, p.691-697, 1990.
- LEE, J.M. & ANSTEE, J.H. Endoproteases from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.25, p. 49-61, 1995.

- LEE, S.I.; LEE, S.H.; KOO, J.C.; CHUN, H.J.; LIM, C.O.; MUN, J.H.; SONG, Y.H.; CHO, M.J. Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) in transgenic rice. **Molecular Breeding**, v.5, n.1, p.1-9, 1999.
- LIENER, I. Implications of antinutritional components in soybean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.34, p.31-67, 1994.
- MAIA, A. de H.N.; LUIZ, A.J.B.; CAMPANHOLA, C. Statistical Inference on Associated Fertility Life Table Parameters Using Jackknife Technique: Computational Aspects. **Journal of Economic Entomology**, abril. 2000. /No prelo/
- MASOUD, S.A.; JOHNSON, L.B.; WHITE, F.F.; REECK, G.R. Expression of a cysteine proteinase inhibitor (oryzacystatin-I) in transgenic plants. **Plant Molecular Biology**, v.21, p.655-663, 1993.
- MATTOS, A.O. Contribuição ao estudo do controle integrado da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis* (Fabr. 1794) (Lepidoptera, Pyralidae). Piracicaba, 1982. 64p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- MAUGH, T.H. II. Exploring plant resistance to insects. **Science**, v.216, p.722-723, 1982.
- McMANUS, M.T.; BURGESS, E.P.J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**, v.41, p.731-738, 1995.

- MÉLO, A.B.P.; PARRA, J.R.P. Exigências térmicas e estimativa do número de gerações anuais de broca-da-cana-de-açúcar em quatro localidades canavieiras de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.23, n.7, p.691-696, 1988.
- MEYER, J.S.; INGERSOLL, C.G.; McDONALD, L.L.; BOYCE, M.S. Estimating uncertainty in population growth rates: Jackknife vs. Bootstrap techniques. **Ecology**, v.67, n.5, p.1156-1166, 1986.
- MICHAUD, D. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. **Trends in Biotechnology**, v.15, p.4-6, 1997.
- MICHAUD, D.; BERNIER-VADNAIS, N.; OVERNEY, S.; YELLE, S. Constitutive expression of digestive cysteine proteinase forms during development of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.25, p.1041-1048, 1995.
- MOCHIZUKI, A.; NISHIZAWA, Y.; ONODERA, H.; Tabei, Y.; TOKI, S.; HABU, Y.; UGAKI, M.; OHASHI, Y. Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice stem borers, *Chilo suppressalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.93, n.2, p.173-178, 1999.
- MOLLEMA, C.; COLE, R.A. Low aromatic amino acid concentrations determine resistance to *Frankliniella occidentalis* in four vegetable crops. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.78, p.325-333, 1995.

- MORETI, A.C.C. Biologia comparada e controle de qualidade de *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) (Lepidoptera – Noctuidae), em dietas natural e artificial, 1980. 98p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- OROZCO-CARDENAS, M.; MCGURL, B.; RYAN, C.A. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward *Manduca Sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v.90, p.8273-8276, 1993.
- ORTEGO, F.; FARINOS, G.P.; RUIZ, M.; MARCO, V.; CASTANERA, P. Characterization of digestive proteases in the weevil *Aubeonymus mariaefranciscae* and effects of proteinase inhibitors on larval development and survival. **Entomologia Experimentalis Et Applicata**, v.88, n.3, p.265-274, 1998.
- PARANHOS, S.B. **Cana-de-açúcar: cultivo e utilização**. Campinas: Fundação Cargil, 1987. 856p.
- PARRA, J.R.P. **Biologia dos insetos**. Piracicaba: ESALQ/USP, Departamento de Entomologia, 1979. 383p.
- PARRA, J.R.P. Consumo e utilização de alimentos por insetos. In: PANIZZZI, A.R.; PARRA, J.R.P. (EDs). **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 1991. cap.2, p.9-65.
- PARRA, J.R.P. Potencial de uso de *Trichogramma* em culturas no Brasil. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO, 6, Rio de Janeiro, 1998. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1998. p.118.

- PARRA, J.R.P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. Piracicaba: ESALQ/FEALQ, 1999. 137p.
- PARRA, J.R.P.; HADDAD, M.L. **Determinação do número de instares de inseto**. Piracicaba: FEALQ, 1989. 49p.
- PARRA, J.R.P.; MIHSFELDT, L.H. Comparison of artificial diets for rearing the sugarcane borer. In: ANDERSON, T.E. & LEPLA, N.C.(EDs). **Advances in Insect Rearing for Research & Pest Management**. Westview Press, 1992. p.195-209.
- PAULILLO, L.C.M.; LOPES, A.R.; CRISTOFOLETTI, P.T.; PARRA, J.R., TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, v.93, n.2, 2000./No prelo/
- PINTO, A. de S. Comparação de técnicas de liberação e parasitismo de *Trichogramma galloi* Zucchi, 1998, em infestações de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794), prejudiciais à cana-de-açúcar. Piracicaba, 1999. 83p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- RAIZER, A.J. Interações genótipos x ambientes e estabilidade fenotípica em cana-de-açúcar no estado de São Paulo. Piracicaba, 1998. 103p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In **Methods in Plant Biochemistry**, v.5, p.259-306, 1991.

- ROE, R.M.; HAMMOND, A.M.; SPARKS, T.C. Growth of larval *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) on an artificial diet and synchronization of the last larval stadium. **Annals of the Entomological Society of America**, v.75, n.4, p.421-429, 1982.
- RYAN, C.A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 425-449, 1990.
- SGRILLO, R.B. A distribuição de Weibull como modelo de sobrevivência de insetos. **Ecossistema**, v.7, p.9-13, 1982.
- SGRILLO, R.B. Criação em laboratório da broca da cana-de-açúcar (*Diatraea saccharalis* (Fabricius, 1794)) visando o seu controle. Piracicaba, 1973. 98p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SGRILLO, R.B. Desenvolvimento de modelo matemático para população da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea sacharalis* (Fabr., 1794) e simulação da técnica do indivíduo estéril. Piracicaba, 1979. 189p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- SHIELDS, R. Towards insect-resistant plants. **Nature**, v.328, p.12-13, 1987.
- SHUKLE, R.H.; MURDOCK, L.L. Lipxygenase, trypsin inhibitor and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). **Environmental Entomology**, v.12, p.787-791, 1983.

- SLANSKY JUNIOR, F.; SCRIBER, J.M. Food consumption and utilization. In: KERKUT, G.A.; GILBERT, L.I. **Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology**. New York: Pergamon Press, 1985, v.4. cap.3, p.87-164.
- SOUZA, E.M.T.; MIZUTA, K.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **Phytochemistry**, v.39, p.521-525, 1995.
- STEFFENS, R.; FOX, F.R.; KASSELL, B. Effect of trypsin inhibitors on growth and metamorphosis of corn borer larvae *Ostrinia nubilalis* (Hübner). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.26, p.170-174, 1978.
- TERRA, W. Digestão do alimento e suas implicações na biologia dos insetos. In: **Ecologia nutricional de insetos e suas implicações no manejo de pragas**. São Paulo: Manole, 360p. 1991.
- TERRA, W.; FERREIRA, C. A digestão dos insetos. **Ciência Hoje**. v.12, n.1, p.28-38, 1991.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.109B, p.1-62, 1994.
- VALSECHI, O.; OLIVEIRA, E.R. de; BARBIN, D.; NOVAES, F.V. Estudos sobre alguns efeitos da broca (*Diatraea saccharalis*) na cana-de-açúcar e seus reflexos na indústria açúcareira. Piracicaba, 1976. 142p. Tese (Livre-Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

- VENDRAMIM, J.D. Técnicas para avaliação da infestação de *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794) (Lepidoptera-Pyralidae) em cultivares de cana-de-açúcar, com base no complexo broca-podridões. Piracicaba, 1987. 156p. Tese (Livre-Docência) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- WALKER, D.W.; FIGUEROA, M. Biology of the sugarcane borer, *D. saccharalis* (F.) III. Oviposition rate. **Annals of the Entomological Society of America**, v.57, n.4, p.515-516, 1964.
- WOLFSON, J.L.; MURDOCK, L.L. Growth of *Manduca sexta* on wounded tomato plants: role of induced proteinase inhibitors. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.54, p.257-264, 1990.
- WOLFSON, J.L.; MURDOCK, L.L. Suppression of larval Colorado beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.44, p.235-240, 1987.
- XAVIER-FILHO, J. The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.4, p.1-6, 1992.
- YEH, K.M.; LIN, M.I.; TUAN, S.J. CHEN, C.Y; KAO, S.S. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. **Plant Cell Reports**, v.16, p. 696-699, 1997.