

# RESPOSTA BIOQUÍMICA DE *THYRINTEINA LEUCOCERAEA* A INIBIDOR DE PROTEASES EM PLANTAS DE GOIABA \*

## BIOCHEMICAL RESPONSE OF *THYRINTEINA LEUCOCERAEA* TO PROTEASES INHIBITOR IN GUAVA PLANTS

Jeanne Scardini Marinho<sup>1</sup>; Maria Goreti de Almeida Oliveira<sup>2</sup>;  
Raul Narciso de Carvalho Guedes<sup>3</sup>; Angelo Pallini<sup>3</sup>; Joel Antônio de Oliveira<sup>4</sup>

### RESUMO

As plantas têm um tipo de defesa que interfere no sistema digestivo dos insetos através da expressão de diferentes inibidores de proteases (IPs). Os IPs agem inibindo enzimas proteolíticas no intestino dos insetos, podendo até levá-los à morte. Por isso, estudos têm sido realizados visando à utilização desses compostos como método alternativo no controle de insetos fitófagos. As lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* causam muitos danos em eucaliptais, mas não conseguem se desenvolver bem em folhas de goiabeira, portanto é interessante que a defesa desta planta seja investigada. Sendo assim, este trabalho estudou a resposta enzimática da lagarta *T. leucoceraea* ao aumento da concentração do IP benzamidina (IP sintético de serino-proteases) aplicado sobre as folhas de goiabeira, a fim de estudar a ação do inibidor sintético em conjunto com o inibidor natural produzido por essas plantas. Para tal investigação, foram utilizadas três diferentes concentrações de benzamidina: 0,12, 0,25 e 0,5%. Verificou-se que as goiabeiras produzem IPs como resposta de defesa e que a benzamidina aplicada nas plantas de goiaba interferiu na atividade das serino-proteases no intestino de lagartas de *T. leucoceraea*, entretanto, pode-se observar também que as lagartas apresentaram adaptação à ingestão dos IPs através do aumento da atividade de cisteíno-proteases em quase todos os tratamentos.

**Palavras-chave:** Digestão de insetos; Serino-proteases; inibidores de proteases; Lepidoptera; Geometridae.

### ABSTRACT

Plants have a type of defense that interferes with the digestive system of insects through the expression of different protease inhibitors (PIs). PIs act by inhibiting proteolytic enzymes in the gut of insects, and may even lead them to death. Therefore, studies have been conducted in order to use these compounds as an alternative method in control of phytophagous insects. The *Thyrinteina leucoceraea* is prague on eucalypts, but does not cause severe damage in leaves of guava, so it is interesting that the defense of this plant is investigated. Thus, this work studied the enzymatic response of the caterpillar *T. leucoceraea* further concentration of benzamidine PI (PI synthetic of serine proteases) applied to the leaves of guava in order to evaluate the effects of synthetic inhibitor in conjunction with the natural inhibitor produced by these plants. For this investigation, we used three different concentrations of benzamidine, 0.12, 0.25 and 0.5%. It was found that the guava produce IPs in response to defense and that the benzamidine applied on leaves of guava interfere in the activity of serine proteases in the gut of larvae of *T. leucoceraea*. However, it can also be observed that the caterpillars were adapted to the ingestion of PIs by increasing the activity of cysteine proteases in almost all treatments.

**Key words:** Digestion of insects, serine proteases, protease inhibitors; Lepidoptera, Geometridae.

\* Parte da tese de mestrado de Marinho, J.S. que contou com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Conhecimento Científico e Tecnológico (CNPq) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Entomologia da Universidade Federal de Viçosa (UFV)-MG, Brasil.

E-mail: jescardini@gmail.com

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-UFV, Brasil. E-mail: malmeida@ufv.br

<sup>3</sup> Departamento de Biologia Animal-UFV, Brasil. E-mail: guedes@ufv.br e pallini@ufv.br

<sup>4</sup> Departamento de Química-UFV, Brasil. E-mail: joel@ufv.br

## INTRODUÇÃO

Os insetos herbívoros têm uma grande necessidade de aminoácidos livres e nitrogênio durante seu desenvolvimento e esses são obtidos, normalmente, através da degradação de proteínas ingeridas na dieta, realizada por enzimas extracelulares, as proteases (Bazok *et al.*, 2005). As plantas podem expressar diferentes inibidores de proteases (IPs) como resposta a um dano por herbivoria (Green & Ryan, 1972). Em insetos herbívoros, os IPs agem inibindo enzimas proteolíticas no intestino de larvas e adultos, resultando na deficiência de aminoácidos necessários aos processos fisiológicos do inseto o que pode levar a sério retardo no desenvolvimento dos mesmos, redução da fecundidade e até à morte (Oliveira *et al.*, 2005).

Estudos têm sido realizados visando à utilização dos IPs como método alternativo no controle de insetos fitófagos, explorando-os de duas diferentes formas (Oliveira *et al.*, 2005; Xavier, *et al.*, 2005; Pilon *et al.*, 2006): através da introdução de genes que codificam inibidores de proteases em plantas, como forma de conferir resistência a insetos (Delledonne *et al.*, 2001), ou pela utilização desses inibidores diretamente na alimentação dos insetos (Pilon *et al.*, 2006). Benzamidina é um exemplo de inibidor de proteases sintético (Mares-Guia *et al.*, 1981) e pode ser usado tanto para testar seu potencial inseticida, quanto para estudar a resposta do inseto ao inibidor na dieta.

As lagartas do gênero *Thyriniteina*: *T. arnobia* e *T. leucoceraea*, são severas desfolhadoras das plantas de eucalipto, uma mirtácea nativa da Austrália (Anjos *et al.*, 1996). Entretanto, esses insetos costumam se alimentar de mirtáceas nativas brasileiras, como as goiabeiras, sem, aparentemente, causar dano algum (Holtz *et al.*, 2006). Holtz *et al.* (2003) verificaram que tanto as lagartas quanto os adultos de *T. arnobia* conseguem desenvolver e manter suas populações em plantas de eucalipto, entretanto apresentam dificuldade de se desenvolver e de estabelecerem suas populações em plantas de goiabeira. As goiabeiras, portanto, aparentemente apresentam uma defesa que prejudica o estabelecimento e o desenvolvimento desses insetos.

O aparente sucesso das goiabeiras em relação às lagartas do gênero *Thyriniteina*, torna ambos adequados para estudos que visam elucidar a relação entre os insetos e a defesa das plantas; bem como avaliar o potencial dos IPs sobre o herbívoro, não só

os IPs presentes na planta, mas também inibidores de tripsina sintéticos, como a benzamidina. Sendo assim, este trabalho estuda a resposta da lagarta *T. leucoceraea* ao aumento da concentração de benzamidina aplicada sobre as folhas de goiabeira, a fim de estudar a ação do inibidor sintético em conjunto com o inibidor natural produzido pelas plantas. Estes estudos visam auxiliar no esclarecimento do processo envolvido no mecanismo de interação bioquímica inseto-planta.

## MATERIAL E MÉTODOS

As lagartas de *T. leucoceraea* foram obtidas da criação mantida no Departamento de Biologia Animal (DBA) da Universidade Federal de Viçosa, formada a partir de adultos provenientes de coleta em campo em plantios de goiabeira do Estado de Minas Gerais. As lagartas, provenientes da mesma postura, foram criadas em copos individuais de 500 mL tampados com tecido tipo organza e mantidas em uma sala de criação. Dentro dos copos foi colocado substrato tipo vermiculita, onde eram fincadas duas folhas de goiabeira para a alimentação das lagartas. As folhas eram trocadas quando necessário. Quando atingiram o 5º instar, as lagartas foram retiradas dos copos e utilizadas para montagem do experimento.

As mudas de plantas de *Psidium guajava* (goiabeira) foram padronizadas com aproximadamente 50 cm de altura e com histórico livre de aplicação de qualquer produto via foliar ou infestação de insetos.

Foram realizados quatro tratamentos, sendo que em cada tratamento foram testados dois períodos de tempo: 6 e 48 horas. As plantas do tratamento controle foram pulverizadas com uma solução aquosa de Triton X-100 0,01% (v/v); as plantas dos demais tratamentos foram pulverizadas com uma solução aquosa contendo Triton X-100 0,01% (v/v) acrescida do inibidor de proteases benzamidina nas concentrações de 0,12, 0,25 e 0,5%. A solução de Triton X-100 0,01% (v/v) teve por objetivo somente aumentar a aderência da solução à folha. Para os testes foram utilizadas gaiolas (1,0 × 0,75 × 0,70m) com estrutura em madeira, forradas com organza.

Para cada tratamento foram utilizadas 6 plantas. Em cada planta foram colocadas 3 lagartas de 5º instar (estágio em que a lagarta se alimenta mais vorazmente), totalizando 18 lagartas por tratamento, e realizada a pulverização com a solução, conforme

o tratamento. De cada tratamento foram retiradas 3 mudas e 9 lagartas em cada tempo: 6 e 48 horas após realizada a pulverização. Das folhas das mudas foi obtido o extrato foliar e das lagartas foi obtido o extrato enzimático.

Os extratos enzimáticos das lagartas foram obtidos seguindo método de Oliveira *et al.* (2005), extraíndo o intestino médio de *T. leucoceraea* após dissecação das larvas em presença de ácido clorídrico  $10^{-3}$  M a 4 °C e submetendo-o a nove ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37 °C para o rompimento celular. Após os ciclos, frações de 1,0 mL do extrato foram centrifugadas em tubos plásticos de 1,5 mL com tampas a 10.000g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante contendo o material solúvel foi retirado e mantido a -18 °C para análises posteriores.

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

A concentração de proteína foi obtida pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando como padrão uma solução 0,2 mg/mL de soroalbumina bovina (BSA). A análise foi realizada no extrato enzimático da lagarta e no extrato foliar.

A atividade amidásica foi realizada pelo método descrito por Erlanger *et al.* (1961), utilizando-se o substrato cromogênico N-benzoil-L-arginil-p-nitroanilida (L-BApNA) na concentração final de 0,5 mM a 25 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo cloreto de cálcio 20 mM. As velocidades foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, através da medida da absorbância a 410 nm em função do tempo (2,5 minutos), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de  $8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

A determinação da atividade de cisteíno-proteases foi realizada adaptando-se o método de Erlanger *et al.* (1961). Foram misturados 0,59 mL de tampão Tris-HCl 0,1 M contendo dietiltiotriol (agente redutor de ligações de enxofre), pH 8,0;

10 µL do extrato enzimático do intestino médio da lagarta e 0,1 mL de benzamidina 10 mM (inibidor de serino-proteases). Essa mistura foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. A seguir, foi adicionado 0,5 mL do substrato L-BApNA 1,2 mM. As velocidades foram determinadas através absorbância a 410 nm em função do tempo (2,5 minutos), utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar de  $8800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  para o produto. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

A atividade proteásica foi determinada utilizando-se azocaseína como substrato na concentração final de 2% (p/v). A atividade foi monitorada em espectrofotômetro a 440 nm utilizando-se o método descrito por Tomarelli *et al.* (1949). A reação foi realizada em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0 a 37 °C. O tempo de reação foi de 30 minutos, o qual foi interrompido por adição de ácido tricloroacético 10% (v/v). Após a interrupção, as amostras foram centrifugadas. O experimento foi realizado em uma série de três repetições.

A presença de IP no extrato foliar de goiaba foi determinada utilizando-se tripsina bovina segundo metodologia de Kakade *et al.*, 1974. A atividade trípica, na presença de inibidores, consistiu no seguinte procedimento analítico: para a análise do teste utilizou-se 50 µL do extrato; 500 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio, e 50µL da solução de tripsina  $4,7 \times 10^{-5}$  M foram adicionados a um tubo de ensaio. Para o controle da enzima foram adicionados, a outro tubo de ensaio, 550 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 50 µL da solução de tripsina  $4,7 \times 10^{-5}$  M. A mistura contida em ambos os tubos (teste e controle da enzima, respectivamente) foi incubada por cinco minutos, a 25 °C. Após o tempo de incubação, 500 µL da mistura de incubação, do teste e do respectivo controle, foram retirados e adicionados a outro tubo com 500 µL de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, contendo 20 mM de cloreto de cálcio e 500 µL da solução de L-BApNA 1,2 mM. A absorbância de cada solução foi determinada a 410nm durante 2,5 minutos de reação. As análises foram feitas numa série de três repetições. Os resultados obtidos foram convertidos em mg de tripsina inibida por grama de proteína, de acordo com a seguinte equação: mg de tripsina

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

Em que: A = absorvância a 410 nm do controle -absorvância a 410 nm da amostra; B = diluição da amostra; P = concentração, em g/mL, de proteína dos extratos; e C = 0,019 (fator de tripsina, ou seja, o produto da atuação de 1 µg de tripsina ativa sobre o substrato D,L-BApNA resulta uma leitura de absorvância em 410 nm de 0,019).

As análises de variância com medidas repetidas no tempo, observadas nas figuras, foram realizadas utilizando o procedimento PROC ANOVA do SAS com a especificação PROFILE (SAS Institute 1989). Os pressupostos da análise de variância foram testados usando o procedimento PROC UNIVARIATE do SAS (SAS Institute 1989) e todos os dados tiveram que ser transformados para  $\log_{10}(X + 1)$ .

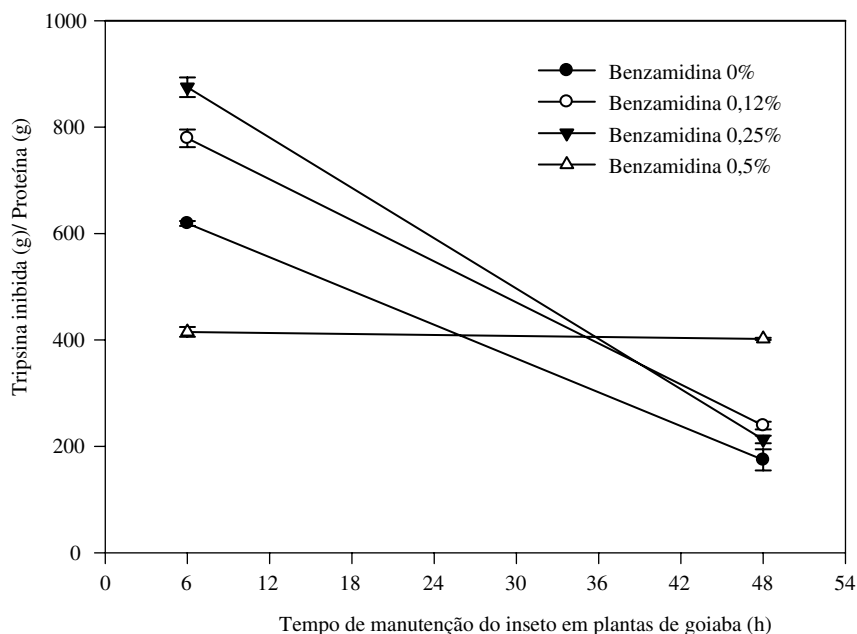
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As serino-proteases têm sido identificadas em extratos de tratos digestivos de muitas famílias de insetos, particularmente de lepidópteros (Applebaum, 1986; Oliveira *et al.*, 2005, Xavier *et al.*, 2005). Além disso, os inibidores de serino-proteases têm comprovado efeitos anti-nutricionais contra muitas espécies da ordem Lepidoptera (Shulke & Murdock, 1983; Pilon *et al.*, 2006) quando incorporados na dieta ou através de plantas geneticamente modificadas (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002). No presente trabalho foi utilizado o inibidor sintético de serino-proteases benzamidina em aplicação foliar sobre goiabeiras para analisar sua interação bioquímica com as enzimas no intestino de lagartas de *Thyrintina leucoceraea*, bem como a produção de inibidores de proteases pela própria planta. Verificou-se que as goiabeiras produzem IP e que a benzamidina aplicada nas plantas de goiaba interferiu na atividade das serino-proteases no intestino de lagartas de *T. leucoceraea*. Entretanto, pode-se observar também que as lagartas apresentaram adaptação à ingestão dos IPs, inclusive através do aumento da atividade de cisteíno-proteases.

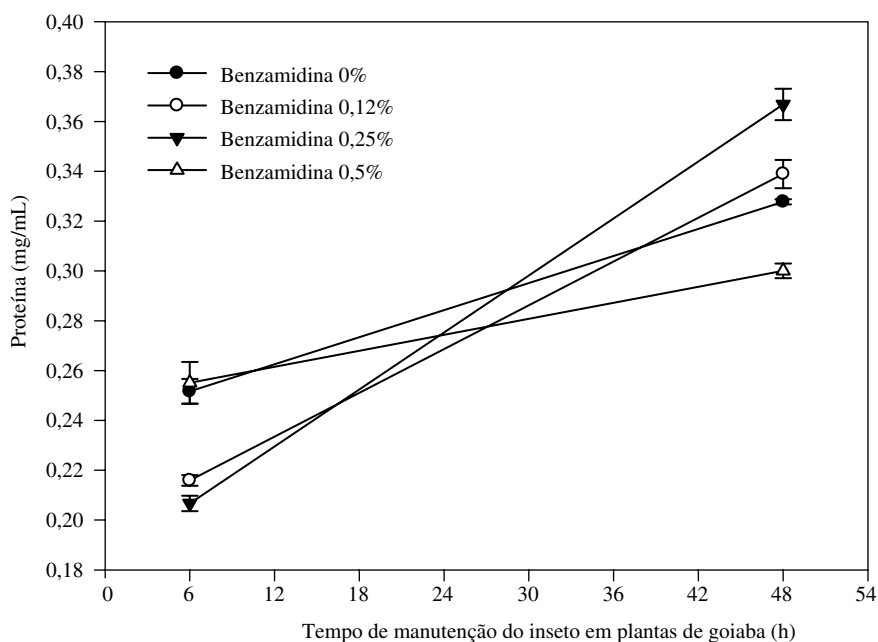
Os IPs exercem uma importante função de defesa das plantas. Foi observado por Ryan (1990) que danos causados em folhas de tomateiro por insetos mastigadores ou por outros meios mecânicos resultaram em uma rápida ativação da transcrição de genes que codificam inibidores de proteases. Em plantas de soja também já foi observado aumento de inibidores de proteases em plantas atacadas por *A. gemmatalis* (Fortunato *et al.*, 2007).

No presente trabalho, as goiabeiras mostraram também produzir IP, entretanto, a produção não aumentou com o tempo de infestação (Figura 1). Mesmo com a redução na quantidade de IPs produzidos pelas plantas ao longo do tempo, pode-se observar que houve aumento da concentração total de proteínas nas folhas após 48 horas de infestação da planta pelas lagartas (Figura 2). Esse aumento da concentração de proteínas nas folhas de goiabeira aliado à redução da concentração de IPs nas mesmas pode indicar que as plantas estejam produzindo outros tipos de proteínas de defesa em resposta ao ataque das lagartas de *T. leucoceraea*. Além dos IPs, outras proteínas de plantas bastante conhecidas e supostamente envolvidas no mecanismo de defesa são as lectinas, as inativadoras de ribossomos dos tipos 1 e 2, e as glicohidrolases (Ryan, 1990; Carlini & Grossi-de-Sá, 2002). Além destas, ainda há as arcelinas, as quitinases, as canatoxinas e formas modificadas de proteínas de reserva (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002). Portanto, é possível que as plantas de goiaba utilizem-se de outras moléculas protéicas para a defesa contra o ataque das lagartas, além dos IPs.

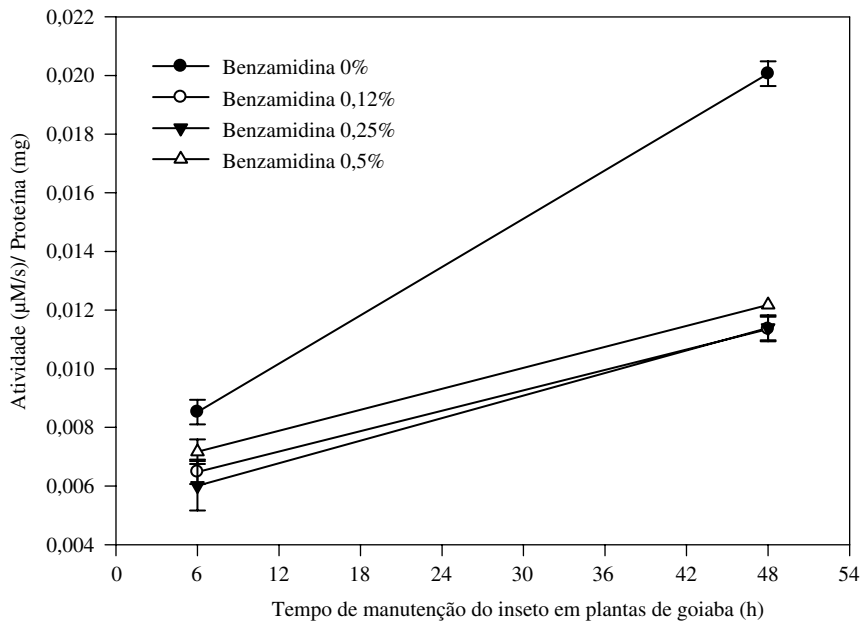
Todos os tratamentos apresentaram aumento na atividade das tripsina-*like* sobre substrato L-BApNA, se comparados no intervalo de tempo de 6 a 48 horas após iniciado o experimento (Figura 3). A elevação da atividade em todos os tratamentos é prevista em decorrência do aumento da concentração de substrato no intestino do inseto. Entretanto, todas as dosagens de benzamidina testadas apresentaram menor aumento da atividade trípica que o controle, representando inibição da atividade das tripsina-*like*. Todavia, o sucesso das dosagens de benzamidina sobre as proteases dos insetos não é garantida devido à capacidade dos mesmos de se adaptarem ao IP ingerido. Alguns insetos conseguem se adaptar a determinados compostos de defesa produzidos pelas plantas. Lagartas de *Spodoptera frugiperda*, por exemplo, são capazes de suplantar os efeitos deletérios de inibidores de proteases de plantas de soja em dieta artificial possivelmente através de uma habilidade de produção de novas enzimas tripsina-*like* ou cisteíno-proteases menos sensíveis aos inibidores produzidos pelas plantas e ingeridos pelos insetos e através da síntese de outras classes de enzimas (Paulillo *et al.*, 2000), o mesmo foi descrito para *Anticarsia gemmatalis* (Oliveira *et al.*, 2005; Xavier *et al.*, 2005; Pilon *et al.*, 2006).



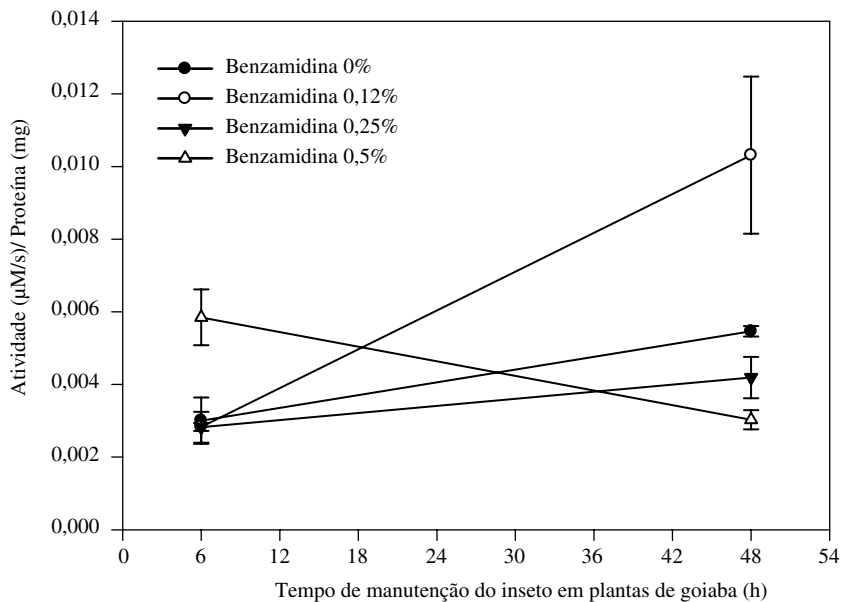
**Figura 1** - Inibição de serino-proteases presentes no extrato foliar de plantas de goiaba, quando atacadas por *Thyrntina leucoceraea* e submetidas à aplicação de benzamida nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias de 3 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo\*hospedeiro\* benzamida (Wilks' Lambda = 0,000089; F = 171,63;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ; P < 0,0001).



**Figura 2** - Concentração de proteína em folhas de plantas de goiaba quando atacadas por *Thyrntina leucoceraea* e submetidas à aplicação de benzamida nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias de 3 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo\*hospedeiro\* benzamida (Wilks' Lambda = 0,012219; F = 19,43;  $df_{\text{numerador}} = 9$ ;  $df_{\text{denominador}} = 34,223$ ; P < 0,0001).



**Figura 3** - Atividade específica de hidrólise do substrato L-ApNA pelas enzimas tripsina-like no intestino médio de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* alimentadas com folhas de goiaba, submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias de 3 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo\*hospedeiro\* benzamidina (Wilks' Lambda = 0,004155; F = 32,38; df<sub>numerador</sub> = 9; df<sub>denominador</sub> = 34,223; P < 0,0001).



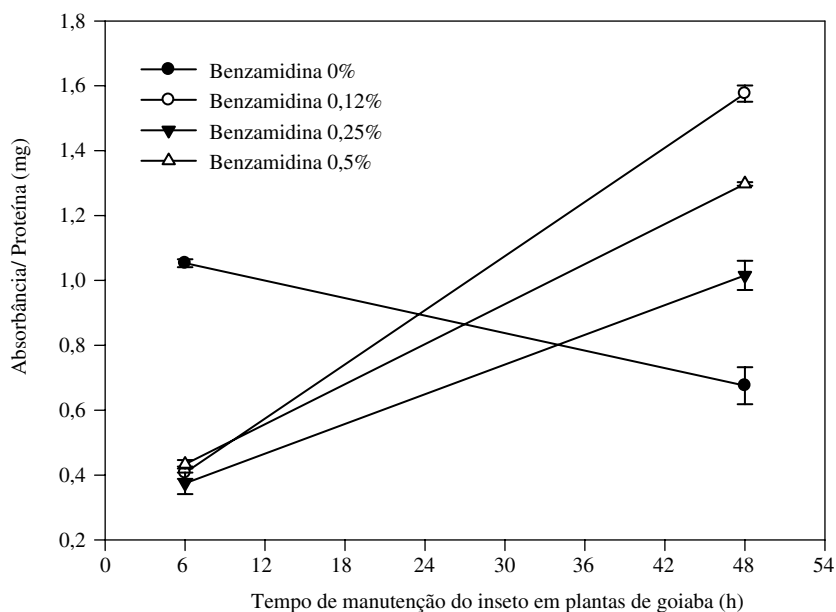
**Figura 4** - Atividade específica de cisteíno-proteases no intestino de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* alimentadas com folhas de goiaba submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias de 3 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo\*hospedeiro\* benzamidina (Wilks' Lambda = 0,065491; F = 7,85; df<sub>numerador</sub> = 9; df<sub>denominador</sub> = 34,223; P < 0,0001).

Uma das formas de adaptação dos insetos ao IP pode ser a expressão de proteases insensíveis ao inibidor (Jongsma & Bolter, 1997), sendo que estas podem ser da mesma classe ou de classes diferentes da protease alvo do inibidor. A atividade de cisteíno-proteases em lagartas de *T. leucoceraea* aumentou para quase todos os tratamentos no período de 6 a 48 horas de manutenção do inseto na planta (Figura 4), indicando a importância também dessa classe de enzimas na digestão proteolítica da lagarta. A exceção ocorreu em lagartas sobre as folhas com solução de 0,5% de benzamidina, para essas houve redução da atividade de cisteíno-proteases. As lagartas que se alimentaram com plantas de goiaba tratadas com 0,12% de benzamidina apresentaram maior aumento de atividade de cisteíno-proteases, dentre todos os tratamentos, 48 horas após iniciado o experimento. Esses resultados sugerem que as lagartas de *T. leucoceraea* também utilizam as cisteíno-proteases na digestão proteolítica e que a produção das mesmas em resposta à ingestão do inibidor de serino-proteases benzamidina varia de acordo com a concentração do inibidor ingerida. Mesmo havendo aumento de atividade de cisteíno-proteases no intestino de *T. leucoceraea*, essa foi inferior à atividade apresentada pelas serino-proteases

nessa mesma lagarta, sugerindo que esse inseto conta principalmente com as serino-proteases para a digestão proteica no intestino, como já relatado para a ordem Lepidoptera em geral (Applebaum, 1986; Oliveira *et al.*, 2005, Pilon *et al.*, 2006).

A atividade proteásica total aumentou para todos os tratamentos com a benzamidina e reduziu apenas para o tratamento controle, sem benzamidina (Figura 5). Lagartas que ingeriram folhas de goiabeira tratadas com benzamidina na concentração de 0,12% apresentaram maior acréscimo na atividade total de protease 48 horas após iniciado o experimento, provavelmente devido ao aumento na atividade de cisteíno-proteases. Para as lagartas que ingeriram as folhas com 0,5% de benzamidina houve o segundo maior acréscimo, para essas houve redução na atividade de cisteíno-proteases, é possível, portanto, que esses insetos utilizem da produção de outras enzimas insensíveis ao inibidor ingerido como forma de adaptação à benzamidina.

O aumento da atividade proteásica total novamente indica que os insetos podem superar os efeitos dos inibidores de proteases possivelmente pela hiperprodução de proteases (Broadway, 1995) ou através da produção de novas proteases insensíveis ao inibidor (Jongsma & Bolter, 1997). Lagartas do



**Figura 5** - Perfil da atividade proteásica no intestino médio de lagartas de *Thyrntina leucoceraea* alimentadas com folhas de goiaba submetidas à aplicação de benzamidina nas concentrações de 0,0, 0,12, 0,25 e 0,5%. Símbolos representam médias de 3 repetições e as barras verticais indicam o erro padrão das médias. Baseados em análise de variância com medidas repetidas, verificamos que houve efeito significativo da interação tempo\*hospedeiro\* benzamidina (Wilks' Lambda = 0,081418; F = 6,85; df<sub>numerator</sub> = 9; df<sub>denominator</sub> = 34,223; P < 0,0001).

tratamento controle tiveram redução da atividade proteásica total, esse resultado indica que o IP produzido pela planta se mostrou capaz de reduzir a atividade proteásica total, provavelmente devido à adaptação da planta ao inseto. No processo de coevolução entre plantas e insetos, as plantas podem desenvolver mecanismos de defesa que diminuem o ataque dos herbívoros, são as defesas diretas das plantas. Essa coexistência entre as goiabeiras e as lagartas de *T. leucoceraea* pode estar favorecendo a defesa da planta através da produção de IPs que sejam mais eficientes contra o ataque desses herbívoros. Outros estudos devem ser realizados a fim de investigar a ação, a composição e a eficiência dos IPs produzidos pelas goiabeiras, pois um melhor conhecimento desses compostos pode auxiliar no controle das lagartas de *T. leucoceraea* em outras plantas, tais como o eucalipto.

As goiabeiras possivelmente produzem outros compostos de defesa que podem servir como defesa dessas plantas contra os insetos, além dos IPs, que indicaram ser eficientes em reduzir a atividade de protease total no intestino das lagartas de *T. leucoceraea*. A benzamidina interferiu na atividade enzimática de proteases nos intestinos das lagartas e apresentou a melhor redução da digestão protéica das lagartas na concentração de 0,25%.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Conhecimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro.

## LITERATURA CITADA

- ANJOS, N.; SANTOS, G.P.; ZANUNCIO, J.C. 1996. Pragas do eucalipto e seu controle. Informe Agropecuário, 12: 50-8.
- APPLEBAUM, S.W. 1986. Biochemistry of digestion. In: G.A. Kerkut, L.L., Gilbert (Eds.). Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology. New York: Pergamon Press, 4: 279-311.
- BATISTA, R.B.; OLIVEIRA, M.G.A.; PIRES, C.V.; PIOVESSAN, N.D.; REZENDE, S.T.; MOREIRA, M.A. 2002. Caracterização Bioquímica e Cinética de lipoxigenases de Plantas de Soja Submetidas à Aplicação de Ácidos Graxos Poliinsaturados. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 37 (11): 1517-1524.
- BAZOK, R.; BARCIC, J.I.; EDWARDS, C.R. 2005. Effects of proteinase inhibitors on western corn life parameters. Journal of Applied Entomology, 192 (4): 185-190.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248.
- BROADWAY, R.M. 1995. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? Journal of Insect Physiology, 41(2): 107-116.
- CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. 2002. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. Toxicon, 40: 1515-1539.
- DELLEDONNE, M.; ALLEGRO, G.; BELENGHI, B.; BALESTRAZZI, A.; PICCO, F.; LEVINE, A.; ZELASCO, S.; CALLIGARI, P.; CONFALONIERI, M. 2001. Transformation of poplar (*Populus alba* L.) with a *Arabidopsis thaliana* cysteine proteinase inhibitor and analysis of insect pest resistance. Molecular Breeding, 7: 35-42.
- ERLANGER, B.F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. Archives of Biochemistry and Biophysics, 95: 271-278.
- FORTUNATO, F.S.; OLIVEIRA, M.G.A.; BRUMANO, M.H.N.; SILVA, C.H.O.; GUEDES, R.N.C.; MOREIRA, M.A. 2007. Lipoxigenase-induced defense of soybean varieties to the attack of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). Journal of Pest Science, 80: 241-247.
- GREEN, T.R.; RYAN, C.A. 1972. Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A possible defense mechanism against insects. Science, 175: 776-777.
- HOLTZ, A.M.; OLIVEIRA, H.G.; PALLINI, A.; VENZON, M.; ZANUNCIO, J.C.; OLIVEIRA, C.L.; MARINHO, J.S.; ROSADO, M.C. 2003. Desempenho de *Thyrinteina arnobia* Stoll (Lepidoptera: Geometridae) em eucalipto e goiaba: o hospedeiro nativo não é um bom hospedeiro? Neotropical Entomology, 32 (3): 427-431.
- HOLTZ, A.M.; OLIVEIRA ZANUNCIO, J.C.; MARINHO, J.S.; PRATISSOLI, D.; PALLINI, A.; PEREIRA, C.J. 2006. Características biológicas de adultos de *Podisus nigripinus* e *Supputius cincticeps* (Hemiptera: Pentatomidae) alimentados com *Thyrinteina arnobia* (Lepidoptera: Geometridae). Idesia, 24 (2): 41-48.
- JONGSMA, M.A.; BOLTER, C. 1997. The adaptation of insect to plant protease inhibitors. Journal of Insect Physiology, 43: 885-896.
- KAKADE, M.L.; RACKIS, J.J.; MCGHEE, J.E.; PUSKI, G. 1974. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. Cereal Chemistry, 51: 376-382.
- MARES-GUIA, M.; ROGANA, E.; AMORIN, A.F.; MAGALHÃES-ROCHA, N.M. 1981. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. The Journal of Biological Chemistry, 256: 1661-1668.
- OHTA, H.; IDA, S.; MIKAMI, B.; MORITA, Y. 1986. Changes in lipoxigenase components of rice seedling during germination. Plant Cell Physiology, 22 (5): 911-918.



- OLIVEIRA, M.G.A.; SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P.; GUEDES, R.N.C. 2005.** Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140 (B): 369-380.
- PAULILLO, L.C.M.S.; LOPES, A.R.; CRISTOFOLETTI, P.T.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M. 2000.** Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. *Journal of Economic Entomology*, 93 (3): 892-896.
- PILON, A.M.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C. 2006.** Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 86 (1): 23-29.
- RYAN, C.A. 1990.** Genes for improving defences against insects and pathogens. *Annuals Reviews Phytopathology*, 28: 425-449.
- SHULKE, R.H. & MURDOCK, L.L. 1983.** Lipoxygenase trypsin inhibitor and lectin from soybeans: effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Environmental Entomology*, 12: 787-791.
- TOMARELLI, R.M.; CHARNEY, J.; HARDING, M.L. 1949.** *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 34: 428.
- XAVIER, L.P.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R. N.C.; SANTOS, A.V.; SIMONE, S.G. 2005.** Membrane-bound trypsin-like activity of midgut proteases from *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae). *European Journal of Entomology (Ceske Budejovice)*, 102 (2): 147-153.

