

**DETECÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA EM GENÓTIPOS DE
GERGELIM VISANDO CONTROLE DE *Plodia interpunctella***

GÉSSICA LAIZE BERTO GOMES

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

CAMPINA GRANDE-PB

FEVEREIRO DE 2014

**DETECÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA EM GENÓTIPOS DE
GERGELIM VISANDO CONTROLE DE *Plodia interpunctella***

GÉSSICA LAIZE BERTO GOMES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Liziane Maria de Lima
Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Roseane Cavalcanti dos Santos

CAMPINA GRANDE-PB

FEVEREIRO DE 2014

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL-UEPB

G633d

Gomes, Géssica Laize Berto.

Detecção de inibidores de proteases de tripsina em genótipos de gergelim visando controle de *Plodia interpunctella* Hub. [manuscrito] / Géssica Laize Berto Gomes. – 2014.

59 f.: il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Centro de Ciências Humanas e Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba, 2014.

“Orientação: Profa. Dra. Liziane Maria de Lima, Departamento da Embrapa Algodão”.

“Coorientação: Profa. Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos, Departamento da Embrapa Algodão”.

1. Inibidor de tripsina. 2. Armazenamento de grãos.
3. *Plodia interpunctella*. I. Título.

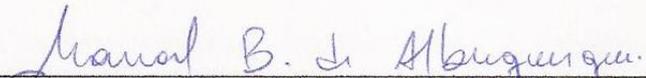
21. ed. CDD 631.568

**DETECÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA EM GENÓTIPOS DE
GERGELIM VISANDO CONTROLE DE *Plodia interpunctella***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia

Aprovada em 28 de fevereiro de 2014

Banca Examinadora:


Prof. Dr. Manoel Bandeira de Albuquerque, UFPB - examinador externo

Prof. Dr. Carlos Henrique Salvino Gadelha Meneses, UEPB - examinador interno

Prof. ^a . Roseane Cavalcanti dos Santos (D. Sc., Biologia Molecular) – Embrapa Algodão Co-orientadora

Prof. ^a . Liziane Maria de Lima (D. Sc., Biologia Molecular) – Embrapa Algodão Orientadora

**Dedico a minha família
pelo amor, incentivo e apoio
em todos os momentos da minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por restaurar a minha fé, iluminar os meus dias e me abençoar com sabedoria, perseverança e capacitando-me para trilhar toda esta caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias (MCA), a Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), pela oportunidade da realização deste curso, e pelos ensinamentos adquiridos que proporcionaram uma grande evolução em minha formação acadêmica, marcados principalmente por momentos importantes do começo ao final deste curso.

A EMBRAPA Algodão, pela oportunidade de estágio e aprendizado.

À Orientadora, Prof^a Dra. Liziane Maria de Lima, por ter me apresentado a área de bioquímica e os seus desafios, inicialmente foi complicado a minha adaptação e a forma de planejamento de trabalho em laboratório, mas com o companheirismo, conversas, ideias e sugestões, nós conseguimos superar os desafios. Agradeço pelo apoio, os inúmeros conselhos que me destes nas fases difíceis do curso, as suas palavras, sua energia e os gestos de cuidado foram importantes para realização e finalização deste trabalho.

À Prof^a Dra. Roseane Cavalcante dos Santos, pela disponibilidade, co-orientação e contribuição com os seus ensinamentos.

À Dra. Ana Heloneide, Dra. Adriana Ferreira Uchoa, Dra. Adelianna Silva de Oliveira, pelo acolhimento, orientações, e pelas sugestões concedidas. Foi muito proveitoso estar com vocês e com a equipe de bioquímica da UFRN.

À Dra. Nair Helena Castro Arriel, pesquisadora da Embrapa Algodão, pelo apoio e por ter cedido materiais do programa de melhoramento genético de gergelim para a realização do trabalho.

Ao Dr, Fábio Aquino, pela orientação no desenvolvimento do bioensaio de *P. interpunctella* e no auxílio com as análises estáticas.

Aos técnicos do Laboratório de Biologia Molecular de Insetos da Embrapa Algodão, Airton Belo e Eduardo Vasconcellos, pelo apoio, incentivo, sugestões e ensinamentos.

Aos técnicos do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, Fábila Suely e Antônio Arroxelas, pela amizade, apoio, incentivo, instruções e por todas as discussões de metodologias e protocolos até o alcance do resultado esperado.

Aos colegas de Laboratório de Biotecnologia Valeska Silva, Patrícia Martins, Eveline Araújo, Milena Porto, Vandrê Guevara, Geise Gonçalves, Morganna Pollynne e Maria Aline pela amizade, incentivo, a constante troca de informações e incontáveis momentos de descontração.

Aos meus colegas de Mestrado, pela convivência e amizade durante todo o curso.

A Alexandre Souza, Allisson Rafael, Talyta Gonçalves e Katia Otila, pela amizade, companheirismo, pelos momentos de estudos e lazer.

Aos meus queridos e sinceros amigos, Larisse Bianca, Jordana Kaline e Gilmar Bezerra, que estiveram comigo em todos os momentos, na alegria, na tristeza, nas loucuras e aventuras da vida.

À Prof^a Dra. Magnólia de Araújo Campos, pela amizade, disponibilidade, apoio, carinho e incentivo em fazer a seleção do mestrado de Ciências Agrárias e de caminhar sempre em busca do melhor.

À Prof^a Dra. Patrícia Coltri, que a conheci recentemente, mas me encantou com toda sua simplicidade, apoio, disponibilidade e paciência em me ajudar.

À minha mãe, meus irmãos e a minha avó que me apoiaram em todos os momentos que acreditaram nos meus sonhos e me deram todo suporte, amor e união, sem eles não disso teria acontecido.

A todos que contribuíram diretamente e indiretamente, colaboraram para construção deste trabalho. Meu muito obrigado

“A vida não é um corredor reto e tranquilo
que nós percorremos livre e sem empecilhos,
mas um labirinto de passagens, pelas quais
nós devemos procurar nosso caminho,
perdidos e confusos, de vez em quando presos
em um beco sem saída.

Porém, se tivermos fé, uma porta
sempre será aberta para nós,
não talvez aquela sobre a qual
nós mesmo nunca pensamos,
mas aquela que definitivamente
se revelará boa para nós.”

(A. J. Cronin)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1. Objetivos.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Aspectos gerais e importância da cultura do gergelim.....	19
2.2. Proteases e inibidores de proteases.....	21
2.2.1. Proteases.....	21
2.2.2 Inibidores de proteases.....	23
2.3. Interação planta-praga.....	25
2.4. <i>Plodia interpunctella</i> – Praga de grãos armazenados.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Material vegetal.....	29
3.2. Criação de insetos.....	30
3.3. Extração de proteínas de sementes de gergelim.....	30
3.4. Fracionamento proteico com sulfato de amônio.....	31
3.5. Homogenato do trato digestivo do inseto.....	32
3.6. Determinação da atividade antitriptica.....	32
3.7. Estabilidade térmica do extrato inibitório.....	33
3.8. Estabilidade hidrogeniônica do extrato inibitório.....	33
3.9. Bioensaios com <i>P. interpunctella</i>	34
3.10. Análises estatísticas.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
4.1. Atividade inibitória em extratos proteicos totais dos genótipos de gergelim com TPB.....	35
4.2. Atividade inibitória dos genótipos de gergelim com homogenato intestinal de <i>P. interpunctella</i>	36
4.3. Atividade inibitória das FI, FII e FIII dos genótipos de gergelim com TPB.....	38

4.4. Estabilidade térmica das FII dos genótipos de gergelim com TPB e HI de <i>P. interpunctella</i>	40
4.5. Estabilidade hidrogeniônico das FII dos genótipos de gergelim com TPB e HI de <i>P. interpunctella</i>	42
4.6. Bioensaios com <i>P. interpunctella</i>	44
5. CONCLUSÕES	47
6. PERSPECTIVAS	48
7. REFERÊNCIAS	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação de Proteases. Modo de ação, representada por círculo preto indicando os peptídeos terminais (N- ou C- terminal) e o branco, aminoácidos da cadeia polipeptídica. Sítio Catalítico, representado pelos resíduos de aminoácidos.....	22
Tabela 2. Genealogia, origem e alguns descritores agrônômicos dos genótipos de gergelim investigados neste estudo.....	29
Tabela 3. Formulação da dieta artificial para criação de <i>P. interpunctella</i>	30
Tabela 4. Atividade inibitória dos genótipos de Gergelim com TPB.....	36
Tabela 5. Síntese da análise de variância para fatorial do genótipo (BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPS G4) e as concentrações dos Extratos proteicos totais.....	44
Tabela 6. Mortalidade média de <i>P. interpunctella</i> submetida em diferentes dosagens de extratos proteicos totais de três cultivares (BRS-SEDA; CNPA G3; CNPA G4).....	44
Tabela 7. Síntese da análise de variância para fatorial do genótipo (FII BRS-SEDA, FII CNPA G3 e FII CNPS G4) e as concentrações das frações F2 dos genótipos.....	45
Tabela 8. Mortalidade média de <i>P. interpunctella</i> submetida a diferentes dosagens de extratos proteicos das frações FII (FII BRS-SEDA; FII CNPA G3; FII CNPA G4).....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfologia de frutos, flores e sementes de gergelim.....	19
Figura 2. As interações entre plantas e insetos-pragas.....	26
Figura 3. <i>Plodia interpunctella</i>	27
Figura 4. Esquema do fracionamento com sulfato de amônio e a diálises, resultando nas frações: FI, FII e FIII.....	31
Figura 5. Bioensaio conduzido com larvas de 2º instar de <i>P. interpunctella</i> , alimentadas com dieta artificial contendo extrato proteico de gergelim, em B.O. D, sob condições controladas.....	34
Figura 6 Ensaio de inibição com extratos proteicos totais dos genótipos de gergelim BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 e homogenato intestinal de <i>P. interpunctella</i> . A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	37
Figura 7. Ensaio de inibição com as frações FI (0-30%), FII (30%-60%) e FIII (60%-90%) dos genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 de gergelim com tripsina pancreática bovina. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).....	38
Figura 8 Ensaio de inibição com frações FI (0-30%), FII (30%-60%) e FIII (60%-90%) dos genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 de gergelim com homogenato	

intestinal de *P. interpunktella*. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 39

Figura 9. Ensaio de estabilidade térmica das frações FII (30%-60%) dos genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 de gergelim em diferentes temperaturas (40 °C, 60 °C, 80 °C e 100 °C). A atividade inibitória foi determinada usando Tripsina Pancreática Bovina e azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) 40

Figura 10. Ensaio de estabilidade térmica das frações FII (30%-60%) dos genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 de gergelim em diferentes temperaturas. A atividade inibitória foi determinada usando homogenato intestinal de *P. interpunktella* e azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 41

Figura 11. Estabilidade hidrogeniônica das frações FII (30%-60%) dos genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 de gergelim em diferentes pHs. A atividade inibitória foi determinada usando Tripsina Pancreática Bovina e azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 43

Figura 12. Estabilidade hidrogeniônica das frações FII (30%-60%) dos genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 de gergelim em diferentes pHs. A atividade inibitória foi determinada usando homogenato intestinal de *P. interpunktella* e azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)..... 43

LISTA DE ABREVIATURAS

Asp – Ácido aspártico

B.O.D. – Demanda Biológica de Oxigênio

BAG - Banco Ativo de Germoplasma

BSA - Albumina Sérica Bovina

Cis – Cisteína

CL - Concentração Letal

CV - Coeficiente de variação

EB - Extrato Bruto

Fc - Teste F;

FV - Fator de variação;

GL - Grau de liberdade;

Gli – Glicina

Gln - Glutamina

Glu – Ácido glutâmico

His – Histidina

IPs- Inibidores de proteases

LD₅₀ – Dose Letal

QM - Quadrado médio;

Ser- Serina

SQ - Soma dos quadrados;

TCA - Ácido Tricloracético

Thr – Treonina

TPB – Tripsina Pancreática Bovina

Tris - Tri (hidroximetil) aminometano

Try - Triptofano

U.R. – Umidade relativa

UI - Unidade de Inibição

WD₅₀ – quantidade de inibidor que reduz m 50% o peso das larvas

RESUMO

GOMES, Géssica Laize Berto. M. Sc. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão; Fevereiro de 2014; Detecção de inibidores de proteases em genótipos de Gergelim visando o controle de *Plodia interpunctella* Hub. Orientadora: Dr^a. Liziane Maria de Lima e Coorientadora: Dr^a. Roseane Cavalcanti dos Santos.

A produção brasileira de grãos tem crescido a cada ano levando o Brasil a um dos principais produtores de cereais e oleaginosas. No entanto, as perdas na pós-colheita são enormes provocando uma redução da produção em função do controle inadequado no armazenamento, especialmente em função da ocorrência de pragas. No caso do gergelim, tem havido uma ocorrência acentuada de *P. interpunctella*, que ataca os grãos armazenados acompanhado de outras pragas, causando danos econômicos à cultura. Com isto, o Programa de Melhoramento Genético de Gergelim da Embrapa Algodão busca alternativas para controlar essas pragas, por meio de genótipos que expressem altos níveis de inibidores proteicos (IPs) com capacidade de inibir enzimas proteolíticas digestivas de insetos. Objetivou-se com este trabalho detectar inibidores de tripsina em genótipos de gergelim (*Sesamum indicum* L.) com potencial uso na aplicação biotecnológica e no programa de melhoramento da espécie, visando seleção de genótipos resistentes a pragas de grãos armazenados. Assim, procedeu-se o estudo de IPs em 10 genótipos de gergelim, pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Algodão. Os extratos proteicos totais dos acessos foram extraídos de sementes de gergelim e testados *in vitro* com tripsina pancreática bovina (TPB) e homogenato intestinal de larvas de *P. interpunctella*. Após seleção dos genótipos mais promissores, procedeu-se um fracionamento proteico com sulfato de amônia. As frações proteicas obtidas foram analisadas quanto a atividade inibitória com TPB e homogenato intestinal de larvas de *P. interpunctella*, e ainda, quanto a estabilidade térmica e hidrogeniônica e em bioensaios com *P. interpunctella*. Os dados foram analisados pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Os resultados obtidos mostraram a presença de inibidores de tripsina nos extratos proteicos totais dos 10 genótipos de gergelim, com variação de 51% a 90% de inibição, dentre os quais, o BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 se destacaram com 87%, 88% e 90% de inibição, respectivamente. Nesses genótipos foram evidenciadas atividade inibitória para o homogenato intestinal de larvas de *P. interpunctella*, com inibição entre 60% e 76%. As frações F2 dos três genótipos foram relativamente estáveis às variações de temperatura e pH. No ensaio biológico, as larvas de *P. interpunctella* mostraram-se suscetíveis aos extratos proteicos dos

três genótipos de gergelim, com mortalidade máxima de 83% das larvas em diferentes dosagens com extratos proteicos totais e 58% nas frações F2, contudo, estatisticamente não observou-se diferença significativa entre os genótipos. Neste aspecto, os genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 possuem inibidores proteicos capazes de impedir o desenvolvimento *P. interpuctella*, o que sugere potentes candidatos com propriedades inseticidas no controle de pragas de grãos armazenados.

PALAVRAS-CHAVE: Serino protease, inibidor de tripsina, *Sesamum indicum* L, pragas de grãos armazenados.

ABSTRACT

The Brazilian production of grains has grown every year, transforming Brazil in one of the main cereals and oilseeds producers. However, the post-harvest losses are huge, causing production loss by the inadequacy of storage, especially in order of pest occurrence. In the case of sesame, there has been a marked occurrence of *P. interpunctella*, which attack stored grains accompanied by other pests causing economic damage to the crop. With this, the Breeding Program Sesame Embrapa Cotton seeks alternatives to control these pests by genotypes that express high levels of protein inhibitors (PIs) with ability to inhibit proteolytic digestive enzymes of insects. The objective of this study was to detect trypsin inhibitors in genotypes of sesame (*S. indicum* L.) with potential use in biotechnological applications and programs to improve the species, aiming selection of genotypes resistant to stored grain pests, so we proceeded to study PIs in 10 sesame genotypes belonging to the Active Germplasm Bank at Embrapa Cotton. The total protein extracts of accessions were extracted and tested in vitro with bovine pancreatic trypsin (BPT) and intestinal homogenate of larvae of *P. interpunctella*. After selection of the most promising genotypes, we proceeded to a protein fractionation with ammonium sulfate. The protein fractions obtained were analyzed for inhibitory activity with BPT and intestinal homogenate of larvae of *P. interpunctella*, and yet, as the thermal stability and hydrogen ion and bioassays with *P. interpunctella*. Data were analyzed by Tukey test at 5% of probability. The results showed the presence of trypsin inhibitors in the total protein extracts of 10 sesame genotypes, ranging from 51% to 90% inhibition, among which, the BRS-SEDA, CNPA G3 and CNPA G4 stood out with 87%, 88% and 90% inhibition, respectively. These genotypes inhibitory activity have been demonstrated for the intestinal homogenate of larvae of *P. interpunctella*, with inhibition between 60% and 76%. The fractions F2 of the three genotypes were relatively stable to changes in temperature and pH. In the bioassay, the larvae of *P. interpunctella*. were susceptible to protein extracts of the three genotypes of sesame, with a maximum of 83% mortality of larvae in different strengths with total protein extracts and 58% in fractions F2, however, did not observe statistically a significant difference between genotypes. In this regard, BRS-SEDA, CNPA G3 and CNPA G4 have protein inhibitors that can prevent the development of *P. interpunctella*, suggesting candidates with potent insecticidal properties to control stored grain pests.

KEYWORDS: Serine proteinase, Trypsin inhibitor, *Sesamum indicum* L, pests of stored grain.

1. INTRODUÇÃO

Considerada umas das oleaginosas mais antigas do mundo, o gergelim (*Sesamum indicum* L.) pertence à família Pedaliaceae, originário do continente Africano, onde se têm relatos da existência de espécies silvestres do gênero *Sesamum*. Contudo, é no continente asiático onde se encontra o maior número de espécies cultivadas (ARRIEL, 2007).

Atualmente, mais de 70 países cultivam *S. indicum* L., com produção mundial de 3,976 milhões de toneladas obtida em 7,5 milhões de hectares (FAO, 2012); isso se deve ao fato de ser uma cultura de fácil manejo, com exigências edafoclimáticas bem definidas, tolerante à seca e com alta qualidade de óleo e proteínas em suas sementes. Os principais produtores de gergelim estão situados em Mianmar, Índia e China, que juntos correspondem a 60% da produção mundial. No Brasil a produção é expressa em 6 mil, toneladas, sendo cultivados em 9 mil hectares com rendimento em torno de 640 kg.ha⁻¹ distribuídas pelos estados de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e São Paulo (ANTONIASSI et al., 2013).

Apesar da grande importância econômica mundial, a cultura do gergelim passa por alguns desafios, como o ataque de patógenos causadores de doenças e de pragas, que comprometem a produção e a biossegurança alimentar, como a lagarta-enroladeira (*Antigastra catalaunalis* Dup.) que ataca o cultivo a partir do 15º dia de emergência das plântulas até o amadurecimento das cápsulas, os pulgões (*Aphis* sp.), que ocorre em cultivo irrigados e *P. interpuctella*, praga que ataca os grãos armazenados de gergelim, estas são consideradas pragas chaves da cultura, as que merecem maior atenção especial, devido a importância econômica nas lavouras de gergelim e nos produtos

armazenados (ARRIEL, 2007; SOUZA, 2013). Neste contexto, o programa de melhoramento genético de gergelim vem explorando os mecanismos de defesas das plantas, como alternativa de controle das principais pragas de danos econômicos da sesamocultura.

Os inibidores proteicos (IPs) presentes em plantas constituem uma classe de proteínas de interesse com grande potencial biotecnológico, pois têm propriedades capazes de inibir a ação catalítica de enzimas proteolíticas presentes em várias classes de insetos praga. As plantas contêm uma variedade de famílias de inibidores proteicos que são classificadas de acordo com sua especificidade de interação com os grupos de aminoácidos que constituem as enzimas proteolíticas: Serino protease, Cisteína protease, Aspártico protease, Metalo protease, Treonina protease e Glutâmico protease (DUARTE, 2008; DUARTE et al., 2010; RAWLINGS et al., 2012).

Há relatos na literatura da presença de inibidores proteicos em sementes de várias classes de plantas, incluindo soja (*Glycine max* (L.) Merr) (KUNITZ, 1947), uva (*Vitis vinifera* L.) (LI e GRAY, 2005), feijão-fava (*Phaseolus lunatus* L.) (TAN e STEVENS, 1971), amendoim (*Arachis hypogoea* L.) (SUZUKI et al., 1987) e gergelim (*S. indicum* L.) (EL-BRAMAWY, 2011). Porém, pouco se tem estudado sobre a presença dessas proteínas de defesa em sementes de gergelim.

1.1. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi detectar inibidores de tripsina em genótipos de gergelim (*S. indicum* L.) com potencial uso na aplicação biotecnológica e no programa de melhoramento da espécie, visando seleção de genótipos resistentes a pragas de grãos armazenados.

Objetivos Específicos

- Identificar acessos de gergelim do Banco de Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Algodão com potencial inibição para tripsina;
- Selecionar os genótipos mais promissores com potencial de inibição e avaliar a estabilidade térmica e hidrogeniônica dos inibidores;
- Avaliar a atividade inibitória nos genótipos selecionados em ensaio entomológico com *P. interpuctella*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ASPECTOS GERAIS E IMPORTÂNCIA DA CULTURA DO GERGELIM

O gergelim (*S. indicum* L.) é uma planta do tipo oleaginosa, herbácea anual ou perene, pertencente à família Pedaliaceae, do gênero *Sesamum* que abriga cerca 60 espécies (AGNE et al., 2003; HWANG, 2005). Cultivada geralmente em regiões tropicais e subtropicais e propagadas por meio de sementes. A planta tem porte de arbusto, podendo medir de 50 cm a 3 m de altura, caule ereto, as folhas são ovuladas e crescem alternadamente ou oposta no caule, as flores apresentam-se em forma de sino, que são completas e axilares, as vagens medem cerca de 2 a 8 cm e se caracteriza por uma cápsula alongada (deiscente ou indeiscente) com sementes pequenas que possuem tons variando do branco ao preto (Figura 1) (ARRIEL et al., 2007; PHAM, 2011; MOMOH et al, 2012).

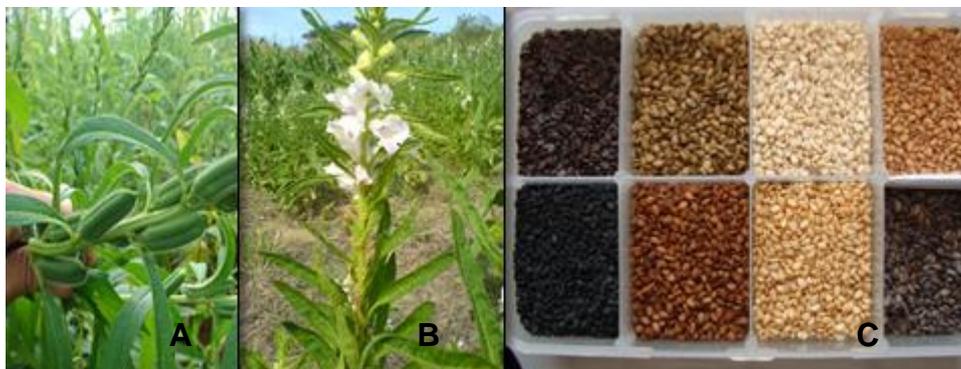


Figura 1. Morfologia de frutos, flores e sementes de gergelim. **A.** Fruto de gergelim em forma de cápsula alongada. **B.** Folhas e floração de gergelim. **C.** Coloração das sementes de gergelim. (Foto: Nair Helena de C. Arriel)

De modo geral, o gergelim é uma oleaginosa que apresenta grande potencial econômico e é cultivada principalmente por pequenos e médios produtores nos países em desenvolvimento. Seus frutos apresentam 30% de proteínas e 50% de óleo; este é rico em ácidos graxos, com maior proporção de ácidos graxos insaturados, compostos antioxidantes naturais (sesamina, semolina e sesamol) que conferem grande eficácia na redução do nível de colesterol no sangue; possui ainda outros componentes químicos, como fibras, cálcio, fósforo, ferro, potássio, sódio, magnésio, enxofre, zinco e selênio (HWANG, 2005; ARRIEL et al., 2007, NETO, 2007; QUEIROGA; GONDIM; QUEIROGA, 2009; SILVA et al., 2011; AKHTAR et al., 2013).

O agronegócio no nordeste brasileiro passa a explorar o gergelim a partir de 1986, a sua produção é incentivada pelo mercado energético, baseado no Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) e exportações de sementes e derivados, devido o alto valor nutritivo e qualidade do óleo (SOUZA; FERREIRA; BELTRÃO, 2013). Atualmente o Mianmar é considerado o maior produtor mundial de sementes de gergelim, com 599.235 toneladas, junto com a Índia e a China, representa 60% da produção mundial (FAO, 2014).

No Brasil, a produção de gergelim varia de 3.000 a 6.000 toneladas anuais com produtividade de 640 kg.ha^{-1} , em uma área de 6 mil a 9 mil hectares, concentradas nos estados de Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais e São Paulo (ANTONIASSI et al., 2013). Na região semiárida do nordeste, o gergelim é predominantemente cultivado pela agricultura familiar, que utiliza tecnologias tradicionais de fácil manejo para cultura, mas resultando em uma cultura pouco expressiva (QUEIROGA et al., 2011). Além disso, doenças e pragas vêm limitando a produção do gergelim e comprometendo a segurança alimentar. Dentre estas estão incluídas, manchas foliares, causada por fungo *Cylindrosporium sesami* Hansf., Mancha bacteriana, por bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *Semami* (Xcc), e pragas como *P. interpuctella*, que infecta os grãos armazenados de gergelim, causando danos econômicos à cultura. (ARRIEL et al., 2007; MICHEREFF FILHO et al., 2013).

2.2. PROTEASES E INIBIDORES DE PROTEASES

2.2.1. PROTEASES

As proteases e inibidores de proteases constituem classes de proteínas amplamente distribuídas entre plantas, animais e microorganismos patogênicos, atuando em reações bioquímicas de resistência e sobrevivência dessas espécies. As proteases correspondem a 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos, em vias metabólicas e em vias de sinalização celular. São enzimas que catalisam a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas de uma determinada proteína alvo. Dessa maneira, as proteases são subdivididas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada, podendo ser exopeptidases ou endopeptidases (TURK, 2006; HABIB e FAZILI, 2007; FERREIRA, 2013; BHARDWAJ et al., 2014).

As exopeptidases tem função de clivar ligações peptídicas nas extremidades das cadeias proteicas. Dependendo da sua atuação na região N- ou C-terminal da cadeia proteica, as exopeptidases podem ser classificadas em: (i) aminopeptidases, que atua nas extremidades na região N-terminal (amino-terminal), liberando resíduo de aminoácido; e (ii) carboxipeptidases, com atuação nas extremidades C-terminal (carboxi-terminal), liberando também resíduo de aminoácido (Tabela 1).

As endopeptidases clivam as ligações peptídicas internas da proteína, e o seu mecanismo de ação e classificação é baseada nas propriedades isoelétricas, massa molecular e especificidade em relação ao substrato, considerando o resíduo de aminoácido envolvido no sítio ativo da catálise proteica (OLIVEIRA, 2007; PAIXÃO, 2010). Dessa maneira as proteinases são divididas em seis classes, de acordo com o seu sítio ativo: serino protease, cisteína protease, aspártico protease, metalo protease, treonina protease e glutâmico protease (Tabela 1) (CARVALHO, 2007; BOM et al., 2008; MELO, 2012; HANDEM, 2013).

Dentre as proteinases classificadas, as serino proteases são as enzimas mais extensivamente estudadas e amplamente distribuídas em grande variedade de organismos, incluindo, animais e microrganismos. As serino proteases tem ação proteolítica ubíqua, pois hidrolisa ligações peptídicas internas de proteínas e peptídeos. O crescente interesse por esta família se deve por ser uma das principais enzimas digestivas encontradas nos insetos causadores de danos econômicos, incluindo as ordens Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Orthoptera, Hymenoptera e Thysanura (TERRA e FERREIRA, 1994; OLIVEIRA et al., 2005; XAVIER et al., 2005; REIS, 2009;

PAIXÃO, 2010).

Nos insetos as enzimas digestivas são encontradas abundantemente na região do intestino médio, constituído geralmente por lipases, carboidrases e proteases, sendo as serino proteases responsáveis, praticamente, por 95% da digestão total (MACEDO et al, 2011). As enzimas proteolíticas podem variar de acordo com as diferenças de hábitos alimentares e a composição dos alimentos, o que muitas vezes se reflete em variações de pH do intestino médio e como consequência na especificidade proteolítica, ou seja, uma determinada espécie de inseto, pode possuir múltiplas proteases digestivas em seu trato intestinal, embora normalmente utilize um tipo principal do grupo mecanístico no seu papel digestivo. Na maioria das espécies de Lepidópteros, o conteúdo do lúmen intestinal apresenta pH alcalino, resultando na predominância da atividade proteolítica das serino proteases (ROSSI et al., 2012). Em *P. interpuctella*, estudos mostraram que a enzima digestiva mais atuante são as serino proteases (ZHU et al., 1997; MOHAN; GUJAR, 2003; KARUMBAlAH et al., 2007). Já em espécies de coleópteros, como por exemplo larvas de *Tenebrio molitor* L., apresenta um pH ácido na região anterior do intestino médio (pH 5,6), o que resulta a dominância de cisteína proteases e a região posterior com pH levemente alcalino (pH 7,9) atuam as serino proteases (MOREIRA, 2008; HOEF, 2011).

Tabela 1. Classificação de Proteases. Modo de ação, representada por circulo preto indicando os peptídeos terminais (N- ou C- terminal) e o branco, aminoácidos da cadeia polipeptídica. Sítio Catalítico, representado pelos resíduos de aminoácidos.

PROTEASES	MODO DE AÇÃO	SÍTIO CATALÍTICO
Exopeptidases		
Aminopeptidases	● ↓ -○-○-○-○----	
Dipeptidil peptidase	●-● ↓ -○-○-○-○----	
Tripeptidil peptidase	●-●-● ↓ -○-○-○-○----	
Carboxipeptidase	-----○-○-○-○ ↓ ●	
Carboxipeptidases Serínicas		Ser – His - Asp
Metalocarboxipeptidases		Zn – Glu – Try/His
Carboxipeptidases Cisteínicas		Cis - His
Peptidil dipeptidase	-----○-○-○-○ ↓ ●-●	
Dipeptidase	-----○-○-○-○ ↓ ●-●	
Endopeptidase		
Serino protease		Ser – His - Asp
Cisteína protease		Cis - His
Aspártico protease		Asp-Thr/Ser-Gli
Metalo protease		Zn – Glu – Try/His
Treonina protease		Thr
Glutâmico protease		Glu - Gln

Fonte: Carvalho (2007); Melo (2012); Handem (2013).

2.2.2. INIBIDORES DE PROTEASES

Como estratégia de combate aos ataques de insetos pragas, as plantas desenvolveram um arsenal de defesas, direcionado ao agente de estresse. Dentre elas, destacam-se os inibidores de proteases (IPs) que são polipeptídeos de baixo peso molecular, com capacidade de inibir enzimas digestivas de insetos, além de participarem da germinação de sementes, desenvolvimento vegetativo e morte celular programada (SOLOMON et al., 1999; SIVAKUMAR et al., 2006; ANTUNES, 2008). Os inibidores são proteínas com massa molecular que variam entre 8 e 25 kDa, estruturas estáveis, resistentes a variações de pHs, temperaturas e proteólise. Essa estabilidade dos inibidores é conferida em função das pontes dissulfeto e outras interações não covalentes (SILVA-FILHO e FALCO, 2000; DATTA et al., 2001; CABRERA-OROZCO et al., 2013).

Os inibidores proteases estão amplamente distribuídos no reino vegetal, pois, são proteínas capazes de inibir as atividades de tripsina, quimiotripsina, amilase, carboxipeptidase, entre outras. Dentre os variados tipos de inibidores, os de serino proteases, obtidos a partir de sementes, são excelentes no controle de pragas de grãos armazenados, pois atuam na inibição das atividades de enzimas proteolíticas que participam do processo digestivo do inseto (PARDE, 2009; CALDERON et al., 2010; AGHAALI et al., 2013). Os efeitos inseticidas de IPs, especialmente de serino e de cisteíno proteases, têm sido estudados por meio da incorporação em dieta artificial ou por estudos de inibição *in vitro*. Muitos autores, obtiveram resultados satisfatórios com a utilização de IPs de plantas contra enzimas intestinais, resultando na interferência no ciclo de vida do inseto, redução de peso, diminuição da taxa da postura e mortalidade (AGHAALI et al., 2013). Esses inibidores tem a capacidade de se ligarem ao sítio ativo de enzimas proteolíticas, inibindo assim a entrada de moléculas de substratos, consequentemente, desestabilizando a atividade de proteólise no intestino do inseto. Portanto, os inibidores podem atuar como pseudo-substrato no sítio ativo da proteinase digestiva do inseto, formando um complexo proteico estável, limitando consequentemente a velocidade da proteólise (TIFFIN e GAUT, 2001).

Em resumo, o controle da atividade proteolítica se dá em função de: (i) controle na biossíntese de enzimas proteolítica de insetos; (ii) regulação de expressão e secreção de enzimas; (iii) inativação da atividade catalítica por meio de IPs, que formam um complexo estequiométrico com a proteinase em questão (LOPES, 2006). Pelo

mecanismo de *feedback*, os IPs se ligam ao sítio ativo da enzima alvo, de forma comparada a ligação específica enzima-substrato, que conseqüentemente resulta na inibição das proteinases digestivas do inseto, interferindo assim na assimilação de aminoácidos essenciais que favorecem o seu crescimento e reprodução (LOPES, 2006; MIGLIOLO, 2008; OLIVEIRA, 2012).

Dentre as famílias de inibidores de serino proteases, as famílias Kunitz e Bowman-Birk tem sido as mais estudadas e diferem principalmente em massa molecular, conteúdo de cisteína e número de sítios reativos (RICHARDSON, 1991).

Os inibidores tipo Bowman-Birk (BBI) são proteínas globulares; em dicotiledôneas tem características de massa molecular relativamente baixa, variando de 8 a 9 kDa e alto conteúdo de resíduos de cisteínas formando 7 pontes de dissulfeto, que permite a formação de uma estrutura assimétrica composta por dois domínios independentes, um capaz de inibir proteinases do tipo tripsina e o outro com a atividade inibitória sobre quimotripsina (LOPES, 2006; SILVA-LOPES, 2009; OLIVEIRA, 2012, CABRERA-OROZCO et al., 2013). Já em monocotiledôneas, o BBI apresenta uma variação de massa molecular de 8 a 20 kDa e 26 resíduos de cisteínas presentes numa mesma molécula (JOSÉ, 2002).

Os inibidores tipo Kunitz (KTI) por sua vez, tem massa molecular de aproximadamente de 21 a 22 kDa, apresenta 4 resíduos de cisteínas, formando duas pontes dissulfeto e tem atividade inibitória sobre as serino proteases, cisteína proteases e aspártico proteases (CARLÍNI, 2002; JOSÉ, 2002; BARIANI, 2008; CABRERA-OROZCO et al., 2013).

Amplamente distribuídos no reino vegetal, os IPs já foram documentados em vários trabalhos científicos. Bariani (2008) e Chevreuil et al. (2009), detectaram inibidores de tripsina em diversas espécies de leguminosas, incluindo *Tachigali plumbea* Ducke, *Caesalpinia ferrea* Mart., *Sesbania exasperata* Kunth, *Cedrelinga catenaeformis* Ducke, *Swartzia polyphylla* DC. e *Peltogyne venosa* (M.Vahl) Benth, os quais apresentaram respectivamente, 96%, 95%, 84%, 69%, 43% e 34% de inibição de tripsina.

Os efeitos dos IPs como inseticidas naturais também já foram investigados. Segundo Mandal et al. (2006), a proteína albumina 2S inativa é considerada um inibidor de tripsina, o qual, quando expresso em tomate e tabaco atuam como defesa ao ataque da lagarta do tabaco (*Spodoptera litura* F.). Silva et al. (2014) avaliaram a atividade do inibidor de tripsina de *Adenanthera pavonina* L. contra as larvas de *Diatraea*

saccharalis Fabr., uma das principais pragas de insetos em cana, o que revelou 87% de atividade anti-tripsina. EL-Bramawy (2011), testou diferentes genótipos de gergelim cultivados em solo infestado por *Fusarium oxysporum* F. e *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich, e registrou uma escala de resistência na proliferação desses microrganismos na ordem de 48%.

Altos teores de IPs em sementes tem despertado interesse como fonte de resistência contra o ataque de pragas e patógenos. Nesta perspectiva, o potencial inseticida dos inibidores de proteases pode ser uma ferramenta para o programa de melhoramento genético de gergelim, visando a geração de cultivares resistentes ou tolerante as pragas.

2.3. INTERAÇÃO PLANTA-PRAGA

As interações entre plantas e insetos são frequentes, complexas e dinâmicas, proporcionando um processo evolutivo dependente, no qual as plantas oferecem alimentação, abrigo e um local para oviposição, fatores essenciais para o desenvolvimento e a propagação de insetos. No entanto, o grau de interação planta x praga, pode influenciar a relação, tornando-a antagônica, causando efeito lesivo para planta, podendo provocar perdas consideráveis na produção ou até perda total da lavoura. Esse mecanismo dinâmico de interação planta-inseto conduziu ao longo do tempo a pressão evolutiva dos organismos, provocando desenvolvimento de um arsenal de mecanismos de defesas e características adaptáveis ao meio (AOYAMA e LABINAS, 2012; PINTO-ZEVALLOS et al., 2013).

As plantas apresentam sistemas de defesas naturais contra diversos tipos de estresses, como: defesa de resistência sistêmica adquirida, caracterizada pelo acúmulo de metabólitos secundários, onde as plantas induzem a expressão de genes de defesas contra determinados fatores antagonistas, podendo ser interespecíficas ou intraespecíficas; e o sistema de resistência basal que funciona como barreiras físicas (cutícula e tricomas) e como barreiras químicas (lectinas, fenóis, alcaloides e proteínas de reservas, incluindo os inibidores enzimáticos) (Figura 2).

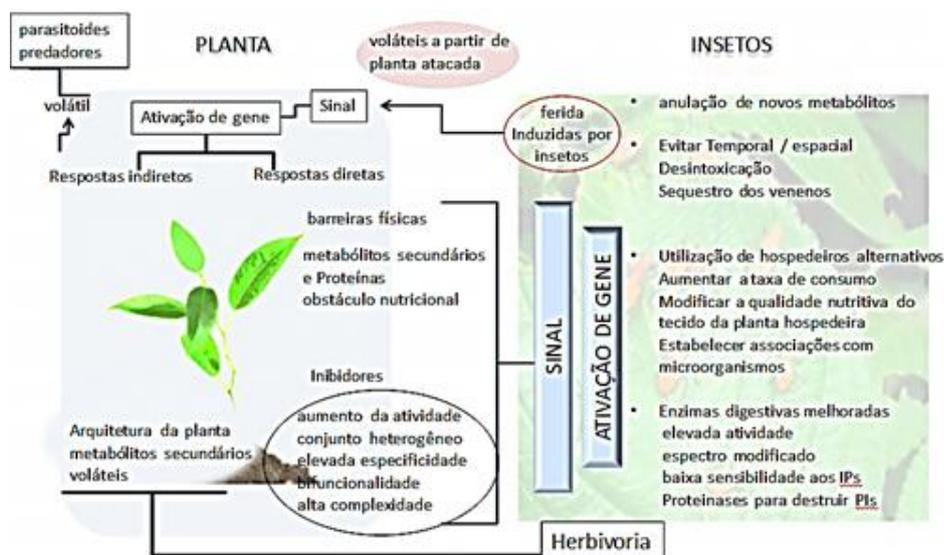


Figura 2. As interações entre plantas e insetos-pragas. Fonte: MELLO e SILVA-FILHO (2002).

A síntese e a acumulação de uma ampla variedade de proteínas de reserva têm mostrado uma estreita relação com mecanismos de defesa da planta, a saber: quitinases, lectinas, defensinas, tioninas, proteínas de transferências de lipídios (LTPs), inibidores de α -amilase, inibidores de proteinases (serínicas e cisteínicas), entre outras. Estas proteínas estão presentes geralmente em sementes e nas partes vegetativas das plantas (FRANCO et al, 2002; PEREIRA, 2005; PAIXÃO, 2010; RAMOS, 2012).

Os níveis de inibidores proteicos (IPs) em folhas são geralmente baixos, entretanto uma vez a planta atacada por insetos ou agentes patogênicos, pode desencadear ativamente altos níveis de produção de IPs direcionado ao combate do estresse presente (RAKWAL et al., 2001; MELLO e SILVA-FILHO, 2002, BHARDWAJ et al., 2014). Os IPs funcionam como pseudo-substratos para as proteases digestivas dos insetos, os quais formam um complexo estável, resultando na redução da proteólise, ocasionando a deficiência de ingestão de aminoácidos essenciais para o desenvolvimento do inseto.

Contudo, as sementes são as fontes mais ricas de IPs e é provável que todas as sementes contenham um ou mais inibidores de protease, capazes de inibir atividade proteolítica de insetos em condições *in vivo* e *in vitro* (RICHARDSON, 1991).

2.4. *Plodia interpunctella* – Praga de grãos armazenados

P. interpunctella é uma espécie de mariposa da ordem Lepidoptera, da família Pyralidea, conhecida como maior praga mundial de grãos armazenados e *commodities* de alimentos processados, é encontrado em todos os continentes, exceto na Antártida (DOUD e PHILLIPS, 2000; REES, 2004; BOUAYAD et al., 2012; WIJAYARATNE e FIELDS, 2013). As suas larvas são consideradas as maiores causadoras de danos nos grãos armazenados, como milho, trigo, amendoim e gergelim, pois elas têm mandíbulas fortes que facilitam a penetração em tegumentos duros. As larvas de *P. interpunctella* tecem teias de seda dentro das sementes e na sua superfície, as quais contêm excretas de larvas e exúvia, resultando em odores desagradáveis ao produto infestado (MOHANDAS et al., 2007), comprometendo a produção e a biossegurança alimentar.

Os adultos são cosmopolitas de hábitos noturnos e tem ciclo de vida curto, cerca 30 dias, podendo variar em função das condições ótimas de temperatura, umidade relativa do ar e, principalmente, o tipo de alimento consumido durante a fase larval pode influenciar no seu tempo de vida (OLSSON e ANDERBRANT, 2005; REES, 2004; AMORIM, 2007; MOHANDAS et al., 2007).

As fêmeas de *P. interpunctella* depositam cerca de 100 a 500 ovos isolados ou em grupos sobre ou próximo aos produtos armazenados (AMORIM, 2007; MOHANDAS et al., 2007, ZAVODSJA et al., 2012); o comportamento de ovoposição é influenciado pelos odores de alimentos e a presença de óleos (NANSEN e PHILLIPS, 2003, CHONG, 2013). Quando desenvolvidas, as larvas medem cerca de 13 mm, o número de instares pode variar de acordo com as condições ótimas exigida pelas mesmas (Figura 3). Geralmente a diapausa ocorre no 5º ou último instar, podendo variar de acordo com os fatores ambientais (MOHANDAS et al., 2007).



Figura 3. *P. interpunctella*. (A) larvas sobre grãos. (B) As larvas e suas teias de sedas. (C) O inseto na fase adulta. (<http://commons.wikimedia.org/>)

A *P. interpuctella* é uma praga de difícil controle, em função da habilidade dos seus ataques e a resistência adquirida a uma variedade de inseticidas químicos, incluindo as classes de organofosfatos e piretroides (ARTHUR e PHILLIPS, 2003), assim como também foi relatada o aumento de 100 vezes de resistência a toxinas de *Bacillus thuringiensis* Berl., do tipo Cry1 Ab e Cry1 Ac (HERRERO et al., 2001; BERNADI et al., 2011). Neste contexto, é necessário uma busca constante de novas toxinas ou produtos de plantas que tenham a capacidade de reduzir os impactos causados por esta praga sobre a produção de grãos armazenados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As atividades foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e no Laboratório de Biologia Molecular de Insetos, ambos da Embrapa algodão, situados em Campina Grande, PB.

3.1. MATERIAL VEGETAL

Foram utilizados dez genótipos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de Gergelim da Embrapa Algodão, os quais possuem descritores discriminatórios quanto aos aspectos morfológicos e agronômicos (Tabela 2).

Tabela 2. Genealogia, origem e alguns descritores agronômicos dos genótipos de gergelim investigados neste estudo.

Genótipo	Genealogia	Origem	HC	Ciclo (dias)	CS
ECGSG01	LAPS	PB, Brasil	Ramificado	110 a 120*	Creme
ECGSG02	LAPS	PB, Brasil	Ramificado	110 a 120*	Creme
ECGSG03	LAPS	PB, Brasil	Ramificado	110 a 120*	Creme
ECGSG04	LAPS	PB, Brasil	Ramificado	110 a 120*	Creme
ECGSG05	LAPS	PB, Brasil	Ramificado	110 a 120*	Creme
ECGSG06	LAPS	PB, Brasil	Ramificado	110 a 120*	Creme

Tabela 2, Cont.

Genótipo	Genealogia	Origem	HC	Ciclo (dias)	CS
ECGSG07	LAPS	PB, Brasil	Ramificado	110 a 120*	Creme
ECGSG08	LAPS	PB, Brasil	Ramificado	110 a 120*	Creme
BRS-SEDA	Cultivar	PB, Brasil	Ramificado	90	Branca
CNPA G3	Cultivar	PB, Brasil	Ramificado	100	Creme
CNPA G4	Cultivar	PB, Brasil	Ramificado	90	Creme

LAPS*: Linhagens avançadas em processo de seleção com ciclo ainda não definido; HC: Hábito de Crescimento; CS: Coloração das sementes

3.2. CRIAÇÃO DE INSETOS

Uma criação de *P. interpuctella* foi especialmente montada para este estudo. Os insetos foram mantidos em B.O.D., com fotoperíodo de 12:12 horas, temperatura ambiente e umidade relativa (U.R) de 60%. As larvas foram alimentadas com dieta artificial (Tabela 3), preparada de acordo com Cruz et al. (2013), e condicionadas em recipientes plásticos cobertos com tecido ‘voil’, lacrado com elásticos de borracha. Após a emergência, as mariposas foram colocados em uma garrafa pet sem dieta, para oviposição; os ovos foram retirados e colocados nos recipientes plásticos com dieta.

Tabela 3. Formulação da dieta artificial para criação de *P. interpuctella*.

INGREDIENTES	QUANTIDADE (g)
Açúcar Mascavo	3 g
Farinha de Trigo	2,3 g
Levedo de Cerveja	2,5 g
Benzoato Granulado de Sódio	0,07 g

Fonte: CRUZ et al. (2013).

3.3. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE SEMENTES DE GERGELIM

A extração de proteínas de sementes de gergelim foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Bland et al. (2000), divididas em duas etapas: delipidação e reserva do sobrenadante da proteína extraída. A delipidação consistiu na obtenção do

extrato bruto: a 0,750 g de sementes trituradas de cada genótipo foram adicionados 5 mL de acetona e 5 mL de hexano PA. As amostras delipidadas (100 mg) foram homogeneizadas em 1 mL de tampão Tris HCl 0,05 M.L⁻¹ pH 8,5 e centrifugado a 12.000 x g por 20 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi recuperado e incubado à 4 °C durante 16 horas. No dia seguinte, procedeu-se uma nova centrifugação (12.000 x g por 20 minutos a 4 °C) das amostras e a coleta do sobrenadante, estocando-o a - 20 °C.

A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976), empregando o Soro Albumina Bovina (BSA) como padrão.

3.4. FRACIONAMENTO PROTEICO COM SULFATO DE AMÔNIO

O extrato bruto proteico foi fracionado com sulfato de amônio em três etapas de saturação: 0-30%, 30-60% e 60-90%, após saturação, por meio de adição de sal em cada etapa, a solução foi centrifugada 12.000 x g, por 20 minutos a 4 °C. Cada precipitado resultante foi ressuspenso em tampão Tris-HCl 0,05 M.L⁻¹ pH 8,5, e em seguida submetidos a diálise em uma membrana com limite de exclusão de 3 kDa (Spectra/por®) por aproximadamente 24 horas contra o mesmo tampão, realizando-se três trocas de tampão. As frações dialisadas foram denominadas de FI (0-30%), FII (30-60%) e FIII (60-90%), de acordo com os seus respectivos graus de saturação, e mantidas a -20°C (Figura 4).

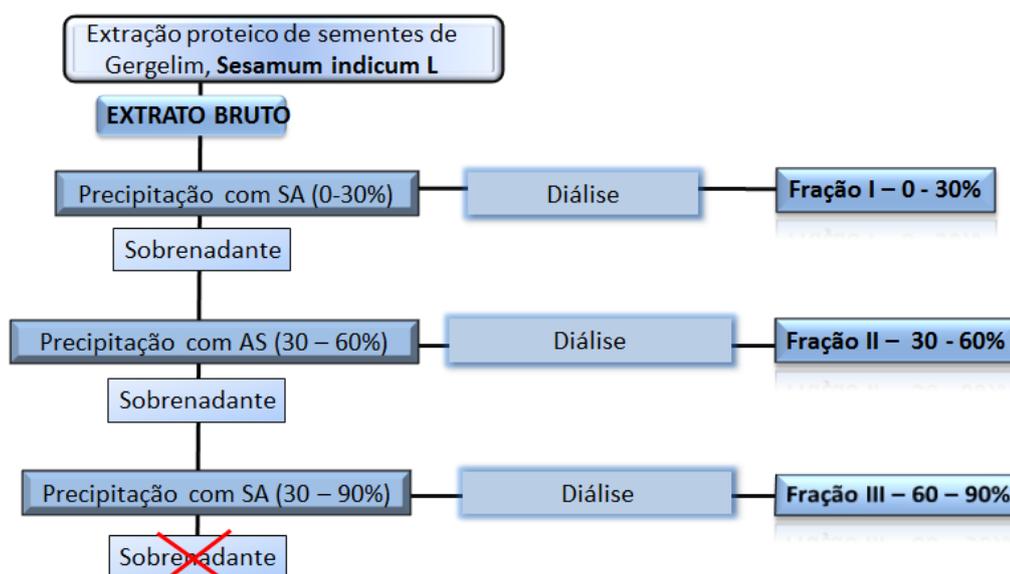


Figura 4. Esquema do fracionamento com sulfato de amônio e a diálises, resultando nas frações: FI, FII e FIII.

3.5. HOMOGENATO DO TRATO DIGESTIVO DO INSETO

As larvas *P.interpuctella* no 5º instar foram dissecadas com auxílio de lupa e pinça, os tratos intestinais seccionados foram transferidos para microtubos contendo 200 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M.L⁻¹ pH 8,5 e mantidos a -20°C.

O homogenato intestinal do inseto foi preparado de acordo com a metodologia estabelecida por Terra et al. (1977), seguindo algumas modificações feitas por Amorim (2007). Os intestinos das larvas foram homogeneizados com o auxílio de pestilo em microtubos de 2 mL sobre o gelo por 10 minutos. Em seguida o homogenato foi centrifugado a 10.000 g x por 15 minutos a 4 °C. Foi coletado o sobrenadante, o qual foi quantificado pelo método de Bradford (1976) em espectrofotômetro (Femto, modelo 700S) na absorvância de 595 nm, diluído a 1 µg/µL e a leitura no ensaio padronizado para cerca de 0,100 de absorvância.

3.6. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITRÍPTICA

A atividade inibitória de tripsina foi realizada de acordo com Kakade et al. (1969). O extrato proteico de gergelim foi diluído para uma concentração de 100 mg.mL⁻¹ com tampão Tris-HCl 0,05 M.L⁻¹ pH 8,5, e para determinar a dose ótima de inibidor, foi feito previamente uma curva de inibição com valores variando de 5 µg a 80 µg para TPB e homogenato intestinal, tendo-se definido 70 µg e 5 µg de inibidor para 20 µg de homogenato intestinal de *P. interpuctella* e 1 µg de tripsina pancreática bovina, respectivamente. Cada ensaio foi incubado por 20 minutos à 37 °C com 100 µL de azocaseína a 1,5 % (m/v) como substrato. A reação enzimática foi interrompida com adição de 150 µL de ácido tricloracético (TCA) a 20%. Em seguida as amostras do ensaio enzimático foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos a 25 °C. Após a centrifugação, os sobrenadantes das amostras foram transferidos para os seus referidos microtubos contendo 250 µL NaOH 2 M. A avaliação da atividade enzimática foi feita por espectrofotômetro na leitura absorvância de 440 nm. Os ensaios foram feitos em triplicata e as provas em branco foram realizadas. A unidade de inibição (UI) foi definida com a quantidade de inibidor que diminui a atividade da enzima em 0,01 de absorvância a 410 nm. A análise estatística dos resultados foi realizado com o software Sisvar (Versão 5.1), seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey (P<0,05).

3.7. ESTABILIDADE TÉRMICA DO EXTRATO INIBITÓRIO

Para medição da estabilidade térmica do inibidor da Fração FII da semente *S. indicum* L. as amostras foram submetidas a um ensaio onde se avaliou a estabilidade da molécula em diferentes temperaturas. Seguiu-se a metodologia descrita por Gomes et al. (2005), na qual 1 mL do inibidor foi incubado por 30 minutos em diferentes temperaturas: 40 °C, 60 °C, 80 °C e 100 °C. Após a incubação as amostras foram resfriadas a 4°C. Os ensaios foram conduzidos conforme descrito no subitem 3.5 usando 5 µg e 70 µg de extrato proteico com tripsina pancreática bovina e homogenato intestinal do inseto, respectivamente. Os ensaios foram feitos em triplicata e as provas em branco foram realizadas. A análise estatística dos resultados foi realizado com o software Sisvar (Versão 5.1), seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey (P<0,05).

3.8. ESTABILIDADE HIDROGENIÔNICA DO EXTRATO INIBITÓRIO

Com a finalidade de analisar as possíveis mudanças na atividade antitriptica que seriam induzidas por possíveis influencias do pH, foi feita avaliação da estabilidade do inibidor em diferentes pHs seguindo a metodologia descrita em Gomes et al. (2005), com pequenas modificações, na qual alíquotas de 1 mL de inibidor foram dialisadas por 16 horas contra seguintes tampões: Fosfato de Sódio 0,05 M.L⁻¹ pH 6,5 – 7,5, Tris HCl 0,05 M.L⁻¹ pH 8,5 – 10,5. Em seguida foi feito 1 hora de incubação a 37 °C nos referidos tampões, e depois as amostras foram novamente dialisadas por 4 horas em tampão Tris HCl 0,05 M.L⁻¹ pH 8,5, no intuito de reajustar ao pH do ensaio. Nos ensaios foram usados 5 µg e 70 µg de extrato proteico. Os ensaios foram feitos em triplicata e as provas em branco foram realizadas. A análise estatística dos resultados foi realizado com o software Sisvar (Versão 5.1), seguido de comparações múltiplas pelo teste de Tukey (P<0,05).

3.9. BIOENSAIOS COM *P. interpuctella*.

Para avaliar a ação dos extratos proteicos de gergelim sobre as larvas de *P. interpuctella* foram usados extratos totais e FII dos genótipos BRS Seda, CNPA G3 e CNPA G4 em bioensaios.

Para o bioensaio foram preparadas dietas artificiais (item 3.2, tabela 3) com concentrações crescentes de extratos proteicos total e FII, contendo inibidores nas concentrações: 0%, 0,1%, 0,3%, 1%, 1,5% e 3%. Os extratos e as frações foram liofilizadas por 24 horas em liofilizador (Liotop, modelo L10L). Foram usadas larvas de 4º dia de vida pós-eclosão (2º instar) e acondicionadas em placas de 24 células, contendo 200 mg de dieta, 1 larva/célula, sendo 12 células por tratamento (Figura 5). As placas foram fechadas com filme plástico P.V.C e incubadas sobre condições controladas, temperatura de 25 °C, 65%-70% de U.R e fotoperíodo de 12:12 horas.



Figura 5. Bioensaio conduzido com larvas de 2º instar de *P. interpuctella*, alimentadas com dieta artificial contendo extrato proteico de gergelim, em B.O.D., sob condições controladas.

3.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O bioensaio foi submetido a um delineamento inteiramente casualizado em esquema bifatorial (3x6), sendo 3 genótipos X 6 concentrações com 4 repetições. Os dados obtidos foram avaliados pela análise de variância e as médias transformadas ($y = \sqrt{x + 0,5}$) comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$). A análise estatística dos resultados foi realizado com o software Sisvar (Versão 5.1).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ATIVIDADE INIBITÓRIA EM EXTRATOS PROTEICOS TOTAIS DOS GENÓTIPOS DE GERGELIM COM TPB

A avaliação dos 10 genótipos em estudo do BAG de Gergelim da Embrapa Algodão levou a identificação da atividade inibitória com TPB em todos os genótipos avaliados, variando de 51% a 90% de inibição (Tabela 4). Dentre os genótipos, destacaram-se BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 com as maiores atividades inibitórias, acima de 87% (Tabela 4).

Os resultados encontrados apontam que a atividade inibitória com TPB de gergelim é do tipo genótipo-dependente. Tal resposta pode estar relacionada à especificidade dos inibidores, que por sua vez depende da composição, conformação do sítio catalítico e estrutura global da molécula do inibidor, fatores essenciais para determinar a eficiência e a estabilidade de uma proteína (BARIANI et al., 2012).

Embora estes inibidores sejam mais bem estudados e melhor caracterizados em leguminosas, os IPs estão amplamente distribuídos em variadas famílias, incluindo Caricaceae, o qual foi purificado inibidor de tripsina do tipo kunitz de 14 kDa provenientes de sementes de *Carica papaya* L. (AZARKAN et al., 2006). Em Euphorbiaceae, foi purificado e caracterizado um inibidor de tripsina de 34 kDa presentes em sementes de *Putranjiva roxburghii* Wall. (CHAUDHARY et al., 2008). Recentemente foi identificado e também caracterizado inibidores de tripsina, na família Chenopodiaceae, em sementes *Chenopodium quinoa* Willd. E em 2011, se teve o

primeiro relato de identificação inibidor de tripsina presentes em sementes de gergelim, no qual foi detectado eficiência contra o crescimento de fungos patogênicos de solo (EL-BRAMAWY, 2011).

Tabela 4. Atividade inibitória dos genótipos de Gergelim com TPB.

Genótipos	Inibição (%)	UI*
T1	79,45d	3,42
T2	77,43c	3,17
T3	80,08b	3,51
T5	76,54c	1,85
T6	64,40b	1,43
T8	51,85a	0,61
T9	66,26b	1,47
BRS-SEDA	87,02e	4,93
CNPA G3	87,57e	4,78
CNPA G4	90,76f	5,18

* UI = Unidade de inibição. E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2. ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS GENÓTIPOS DE GERGELIM COM HOMOGENATO INTESTINAL DE *P. interpunctella*

Com base nos resultados obtidos com os ensaios bioquímicos (Tabela 3), foram selecionados os três genótipos de gergelim com maior taxa de inibição, BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4, os quais foram testados com homogenato intestinal de larvas de *P. interpunctella*. Mediante análise bioquímica, pôde-se observar diferenças na atividade inibitória entre os genótipos em relação aos resultados obtidos com TPB. No entanto, observou-se uma taxa de inibição entre 60% e 76% para os três genótipos (Figura 6).

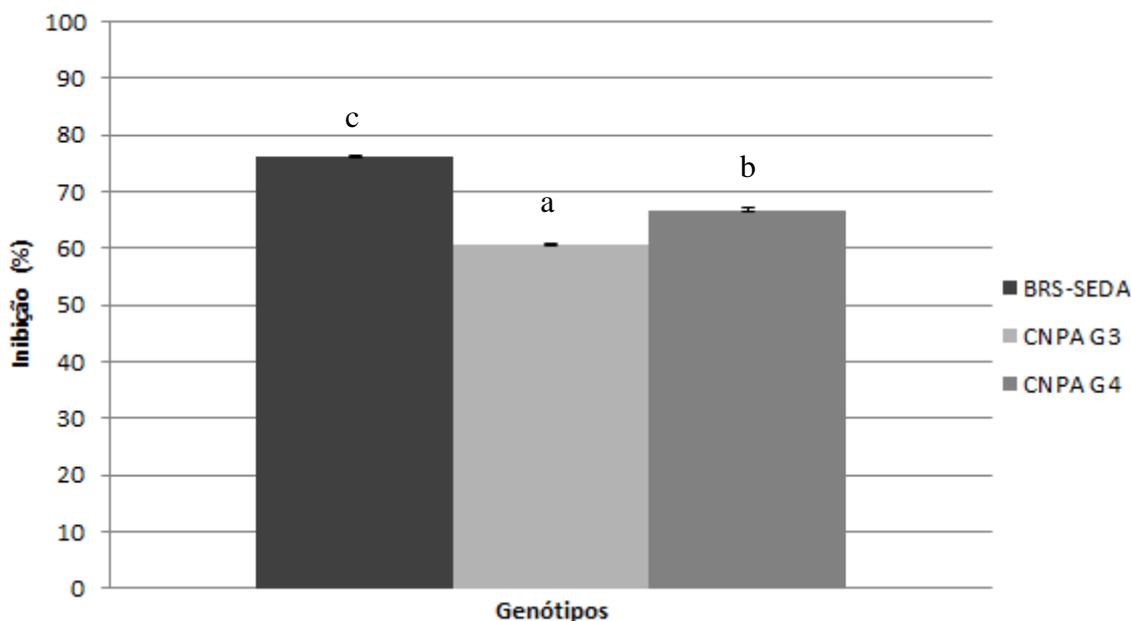


Figura 6. Ensaio de inibição com extratos proteicos totais dos genótipos de gergelim BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 e homogenato intestinal de *P. interpunctella*. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em 2007, Oliveira, purificou cinco inibidores de tripsina provenientes das sementes de jurema branca (*Pithecellobium dumosum* Benth.), os quais foram designados de JUB1, JUB2, JUB3-1, JUB3-2 e JUB4, e testados com homogenato intestinal de *P. interpunctella*, os quais apresentaram 44%, 48%, 49%, 37% e 9% de inibição, respectivamente.

Amorim et al. (2008), em um ensaio biológico, mostrou que *P. interpunctella*, não era suscetível ao inibidor de tripsina de soja, provavelmente, em razão da fraca associação com a enzima digestiva do inseto.

Já em 2013, um novo inibidor denominado de PmTKI, foi purificado a partir das sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth., e testadas com as enzimas digestivas de insetos de diferentes ordens, o qual apresentou atividade inibitória com enzimas digestivas de *Anthonomus grandis* Boh. (90%), *P. interpunctella*, (60%) e *Ceratitidis capitata* Wied. (70%) (CRUZ et al., 2013).

Mediante ensaio *in vitro*, pôde ser observado o efeito significativo dos inibidores sobre o homogenato intestinal, no qual os genótipos de gergelim, BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 se mostraram bastantes efetivos quando testados com as proteinases intestinais das larvas de *P. interpunctella*, com 76%, 60% e 67% de inibição, respectivamente, estas variações de inibição podem ser em função da presença de

múltiplas proteases digestivas no trato intestinal do inseto. No entanto estes resultados demonstram que o genótipo BRS-SEDA, é um potente candidato com propriedades de ação de inseticidas para uso no controle de pragas, pois, demonstrou maior atividade inibitória com as enzimas digestivas do inseto.

4.3. ATIVIDADE INIBITÓRIA DAS FI, FII e FIII DOS GENÓTIPOS DE GERGELIM COM TPB

A partir do extrato bruto dos três genótipos selecionados com maior inibição para TPB (BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4) e precipitado com sulfato de amônio, obteve-se frações em três faixas de concentração: FI (0-30%), FII (30-60%) e FIII (60-90%), as quais foram testadas com TPB e homogenato intestinal de *P. interpuctella*. Dentre elas, a FII exibiu maior atividade inibitória quando testadas com TPB nos três genótipos estudados, com inibição entre 55% e 71% (Figura 7).

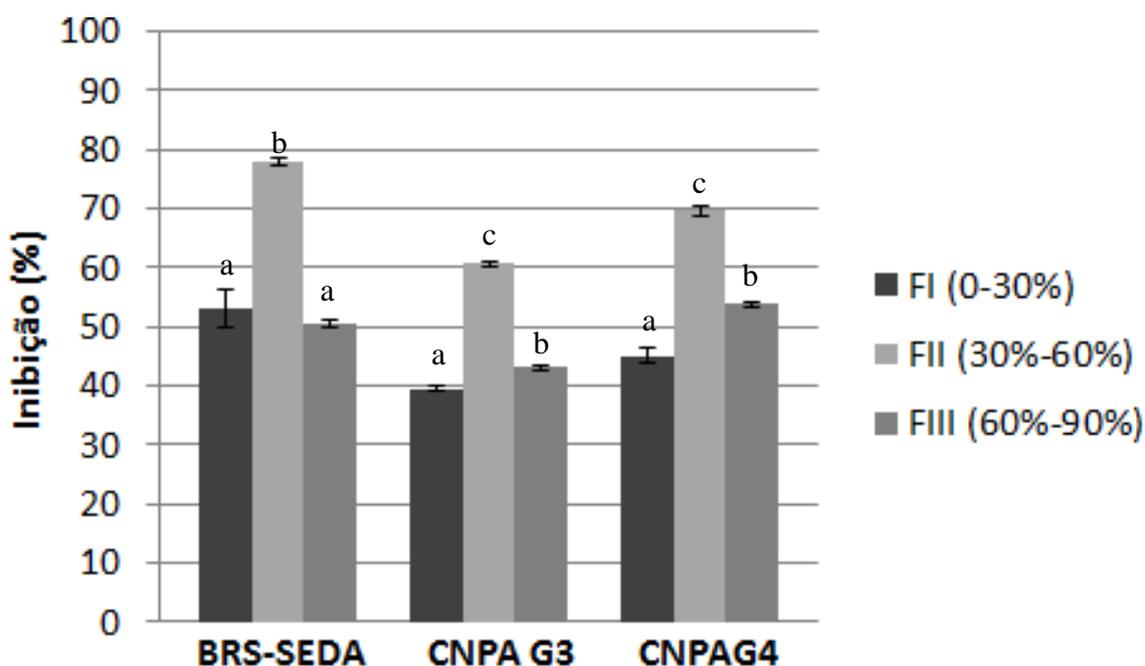


Figura 7. Ensaio de inibição com as frações FI (0-30%), FII (30%-60%) e FIII (60%-90%) dos genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 de gergelim com tripsina pancreática bovina. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Um perfil similar de inibição das frações F1, F2 e F3 observado no ensaio com TPB, foi obtido com homogenato intestinal de *P. interpuctella*, obedecendo ao mesmo padrão de inibição, contudo, com taxas de inibição um pouco inferiores, variando de 58% a 68% (Figura 8).

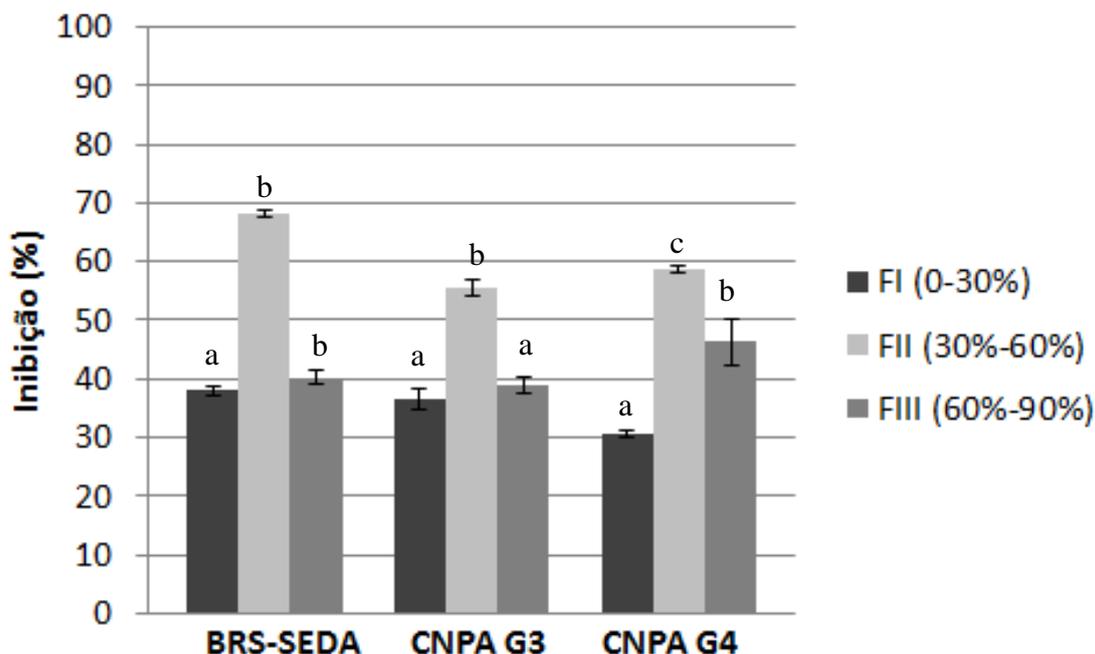


Figura 8. Ensaio de inibição com frações FI (0-30%), FII (30%-60%) e FIII (60%-90%) dos genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 de gergelim com homogenato intestinal de *P. interpuctella*. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A precipitação de proteínas com sulfato de amônio é um dos procedimentos preliminares de purificação mais utilizados. Baseia-se na precipitação de proteínas com soluções de sulfato de amônio em diferentes concentrações, o que pode resultar em aumento da especificidade na atividade (GRIFFITH, 2011).

Muitos dos inibidores conhecidos atualmente foram isolados e purificados a partir da precipitação com sulfato de amônio. Wati et al. (2010) isolaram inibidores de tripsinas de feijão branco (*Phaseolus vulgaris* L.), feijão vermelho (*Phaseolus vulgaris* L.) e feijão azuki, por meio do método de precipitação sob a forma de saturação de 60% a 80% e a fração IV apresentou maior atividade inibitória com 47%. Em outro trabalho, inibidores de tripsinas de sementes de *Vigna unguiculata* L. foram

isolados com 40% a 65% de saturação de sulfato de amônio, o que resultou em uma fração CpTi com 48% de inibição (WANG et al., 2014).

Desse modo o fracionamento com sulfato de amônio é um método eficiente para separar proteínas, já que o mesmo apresenta uma elevada solubilidade que comporta soluções salinas com força iônica elevada, sendo um dos métodos mais empregados também pelo baixo custo e baixa toxicidade (LIMA et al., 2008).

4.4. ESTABILIDADE TÉRMICA DAS FII DOS GENÓTIPOS DE GERGELIM COM TPB E HI DE *P. interpuctella*.

A avaliação da fração FII em diferentes condições de temperaturas mostrou um perfil de estabilidade térmica semelhante entre os genótipos, quando investigado com TPB. Contudo, observou-se que a FII dos três genótipos apresentou maior percentual de inibição após tratamento térmico a 40 °C, variando de 57% a 63% de inibição. Pôde-se observar ainda que o tratamento a 80 °C não provocou uma diminuição drástica da estabilidade dos inibidores como observado a 60 °C e 100 °C (Figura 9).

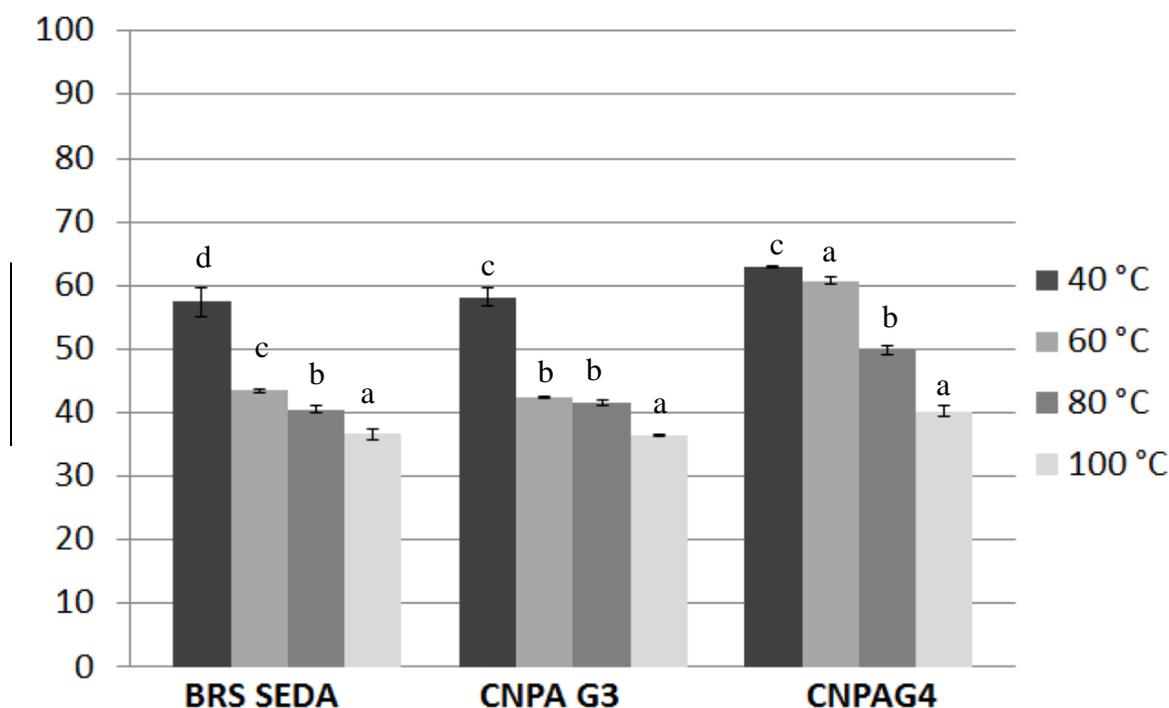


Figura 9. Ensaio de estabilidade térmica das frações FII (30%-60%) dos genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 de gergelim em diferentes temperaturas (40 °C, 60 °C, 80 °C e 100 °C). A atividade inibitória foi determinada usando Tripsina Pancreática Bovina e azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A estabilidade térmica das frações FII também foi investigada com homogenato intestinal de *P. interpuctella*, apresentando um perfil semelhante entre os genótipos, porém diferindo do perfil observado com TPB. Destaque para o tratamento a 40 °C, que mostrou a melhor atividade inibitória em todos os genótipos, com inibição variando entre 43% a 55% e para o genótipo BRS Seda que se mostrou mais estável até 40 °C (Figura 11). Apesar das outras temperaturas terem atenuado a capacidade de inibição tanto com TPB quanto com homogenato intestinal, pode-se observar que esses inibidores presentes em extrato de gergelim se mantêm ativos nas diferentes temperaturas, uma característica marcante dos inibidores de serino proteases.

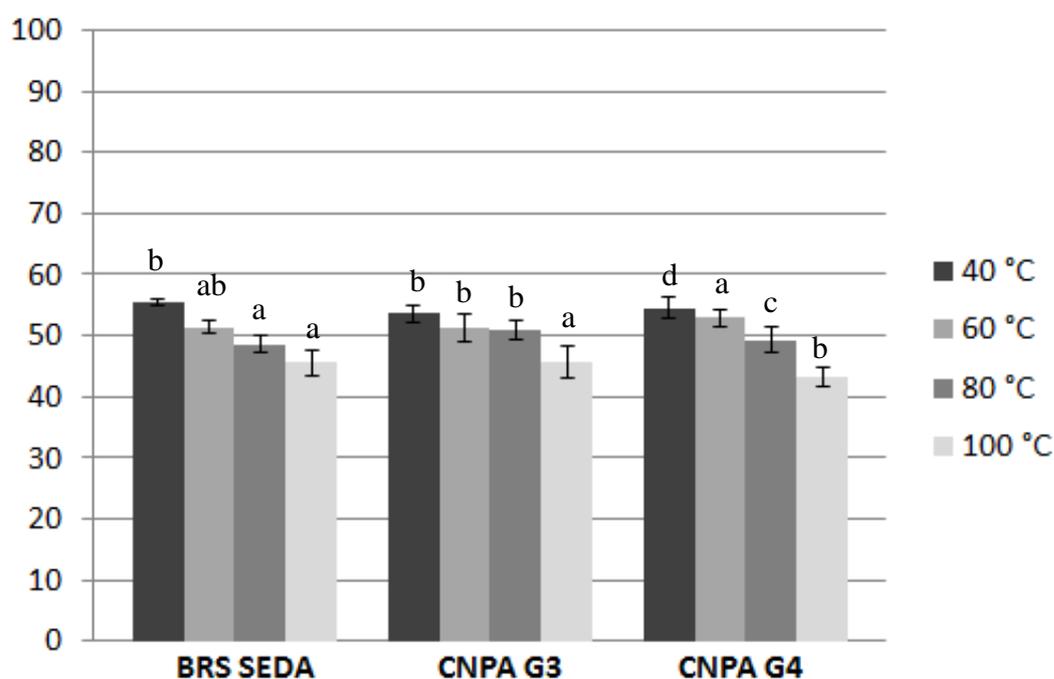


Figura 10. Ensaio de estabilidade térmica das frações FII (30%-60%) dos genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 de gergelim em diferentes temperaturas. A atividade inibitória foi determinada usando homogenato intestinal de *P. interpuctella* e azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A capacidade de inibição de algumas proteínas pode estar diretamente proporcional à temperatura, mas, por outro lado, se for superior a uma temperatura entre 50 °C e 80 °C pode acontecer um decréscimo na atividade, ou até mesmo a inativação, em consequência da desnaturação proteica (OYEKOLA, 2003; CACERES et al., 2008).

Em soja, tem sido sugerido que o tratamento com temperatura elevada, induz o rompimento e os rearranjos de ligações de pontes de dissulfeto e a dissociação de

subunidades, com diminuição da capacidade inibitória (RINGGENBERG, 2011).

Lima (2013) mostrou, em ensaios similares a este, que os inibidores de tripsina presentes nas sementes de amendoim do genótipo CNPA 280 AM apresentaram-se bastante termoestáveis até 100 °C. Ao contrário de Macedo et al. (2013) que mostrou que os inibidores de tripsina de *Peltophorum dubium* Spreng. atenuaram a capacidade inibitória a partir de 80 °C.

Essa variação de resposta de algumas proteínas a tratamentos térmicos pode ser explicada pela estrutura tridimensional de cada proteína, considerando-se a constituição de sequência de aminoácidos e as ligações peptídicas que formam a estrutura e concede a estabilidade funcional (BARIANI et al., 2012).

4.5. ESTABILIDADE HIDROGENIÔNICO DAS FII DOS GENÓTIPOS DE GERGELIM COM TPB E HI DE *P. interpuctella*.

A estabilidade dos inibidores das frações FII foi testada pré-incubando-se os extratos em diferentes pHs (6,5 a 10,5), seguido dos ensaios com TPB e homogenato intestinal de *P. interpuctella*. Verificou-se que todos os extratos apresentaram padrões de inibição semelhantes, no que diz respeito ao pH de melhor atividade (8,5). Observou-se ainda que todas as amostras atenuaram consideravelmente sua capacidade inibitória em pH 10,5 com TPB e em pH 6,5 com homogenato intestinal de *P. interpuctella* (Figuras 11 e 12). Contudo, vale ressaltar que a capacidade de inibição dos extratos foi mantida, mesmo que reduzida em alguns pHs, característica marcante dos inibidores de tripsina, que atuam em meios variando de neutro a alcalino (VARGAS, 2011).

Esses resultados mostram que os inibidores presentes em sementes de gergelim resistem a variações de pH. Esta característica é essencial na defesa das plantas contra o ataque de insetos, considerando-se que os insetos podem apresentar o lúmen intestinal variando de ácido a alcalino (TERRA e FERREIRA, 1994; LOPES et al., 2006). As espécies de coleópteros apresentam pH ácido na região anterior do intestino médio (pH 5,6), o que resulta a dominância de cisteíno proteases e a região posterior com pH levemente alcalino (pH 7,9) onde atuam as serino proteases (MOREIRA, 2008; HOEF, 2011). Já na ordem Lepidoptera, a maior parte do conteúdo do lúmen intestinal (espaço endoperitrófico) apresenta o pH alcalino, ao passo que a porção ectoperitrófico (fora da membrana) apresenta o pH mais próximo da neutralidade (ROSSI et al., 2009; ROSSI et al., 2012; RANJBAR et al., 2014). Sendo assim, explica-se o fato desses extratos de

gergelim apresentarem melhor atividade inibitória em pH 8,5 para as serino proteases presentes no lúmen intestinal *P. interpuctella*.

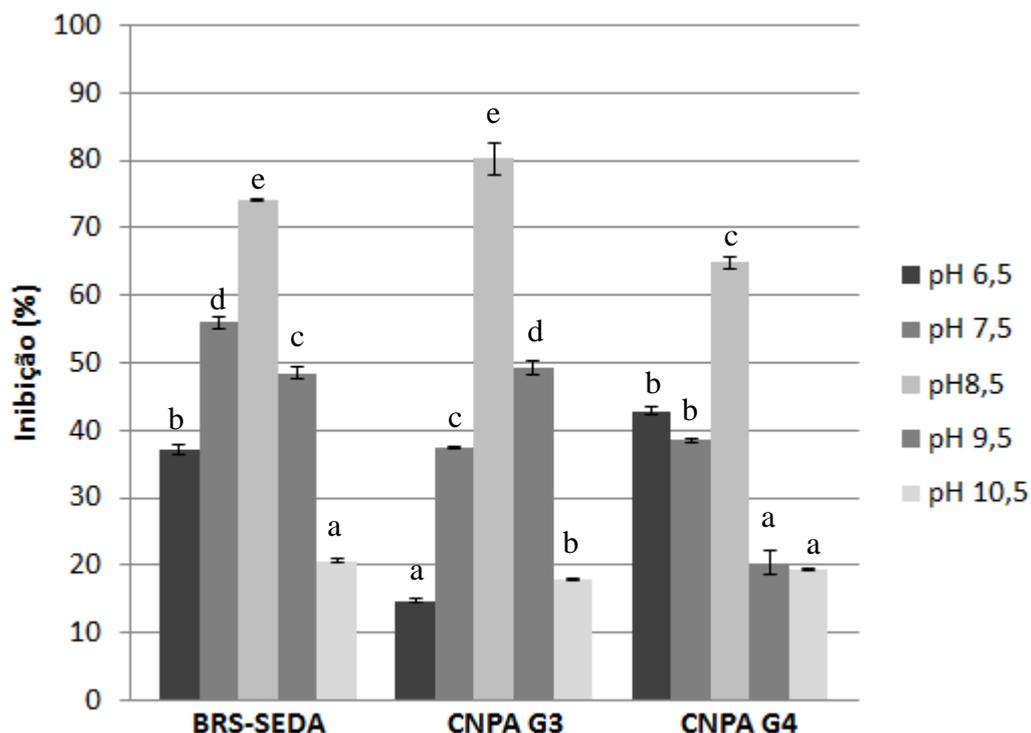


Figura 11. Estabilidade hidrogeniônica das frações FII (30%-60%) dos genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 de gergelim em diferentes pHs. A atividade inibitória foi determinada usando Tripsina Pancreática Bovina e azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

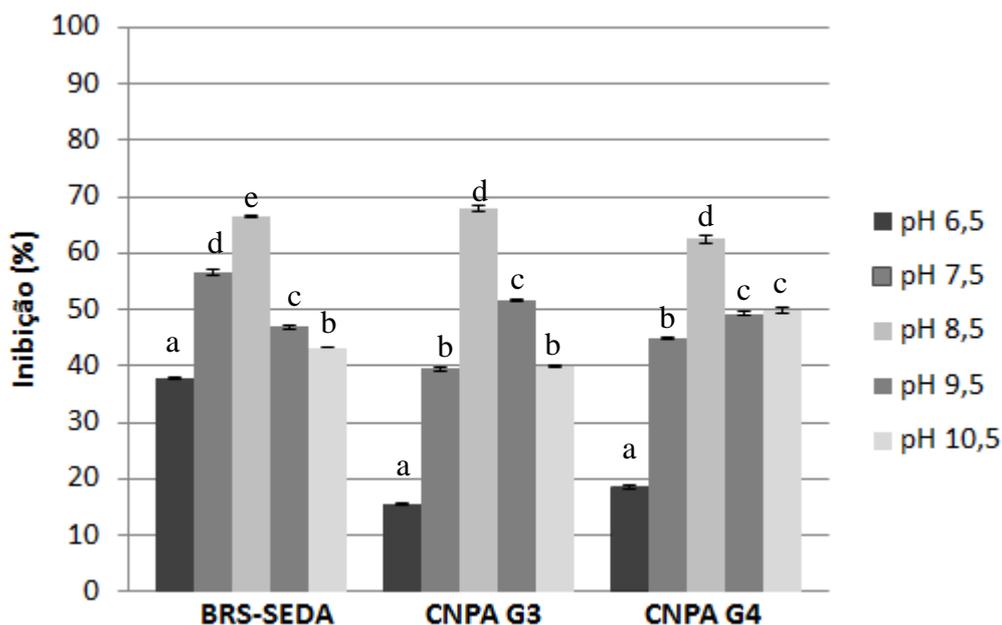


Figura 12. Estabilidade hidrogeniônica das frações FII (30%-60%) dos genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 de gergelim em diferentes pHs. A atividade inibitória foi determinada usando homogenato intestinal de *P. interpuctella* e azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Cada média representa três triplicatas (\pm EP). E as médias seguidas pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

pelas mesmas letras não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.6. BIOENSAIOS COM *P. interpuctella*.

Os efeitos dos inibidores de tripsina presentes em BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 sobre as larvas de *P. interpuctella* foram avaliados em um sistema de bioensaio, com diferentes concentrações de extratos proteicos de gergelim adicionados a dieta, sendo a dieta sem extrato proteico de gergelim como controle negativo.

Os resultados obtidos foram avaliados pela análise fatorial do extrato proteico de gergelim em diferentes concentrações (Tabela 5).

Tabela 5. Síntese da análise de variância para fatorial do genótipo (BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPS G4) e as concentrações dos extratos proteicos totais.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GENÓTIPOS	2	0.026064	0.013032	1.024	0.3659
DOSE	5	1.668694	0.333739	26.23	0.0000
GENÓTIPOS*DOSE	10	0.025447	0.002545	0.200	0.9955
Erro	54	0.687036	0.012723		
Total corrigido	71	2.407240			
CV (%)	10.84				

FV= Fator de variação; GL= Grau de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Teste F; Pr= Probabilidade teste; CV = Coeficiente de Variação.

Com relação a análise de variância sobre as médias de mortalidade das larvas, foram observados perfis semelhantes entre os genótipos, diferenciando apenas nas dosagens do tratamento em relação ao teste controle do bioensaio (Tabela 6).

Tabela 6. Mortalidade média de *P. interpuctella* em diferentes dosagens de extratos proteicos totais de três cultivares de gergelim (BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4).

GENÓTIPOS	DOSES (%)					
	0	0,1	0,3	1	1,5	3
	MORTALIDADE (%)					
BRS-SEDA	0,00a*	67b	83b	83b	83b	83b
CNPA G3	0,00a	58,3b	58,3b	67b	75b	83b
CNPA G4	0,00a	67b	67b	75b	75b	83b

* Médias seguidas da mesma letra na linha e na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

O perfil da análise fatorial das frações FII de gergelim foi similar ao obtido com as frações proteicas totais (Tabela 7).

Tabela 7. Síntese da análise de variância para fatorial do genótipo (FII BRS-SEDA, FII CNPA G3 e FII CNPS G4) e as concentrações das frações FII dos genótipos.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
GENÓTIPOS	2	0.002055	0.001028	0.070	0.9324
DOSE	5	0.831596	0.166319	11.342	0.0000
GENÓTIPOS*DOSE	10	0.008636	0.000864	0.059	1.0000
Erro	54	0.791860	0.014664		
Total corrigido	71	1.634148			
CV (%)	13.01				

FV= Fator de variação; GL= Grau de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Teste F; Pr= Probabilidade teste; CV = Coeficiente de Variação.

Seguindo o mesmo perfil observado com os extratos proteicos totais, não foi possível perceber diferenças estatísticas das frações FII dos genótipos no bioensaio, porém observou-se variação na atividade inibitória em relação ao controle e as dosagens de inibidor no tratamento, com expressão de 0% a 58% de mortalidade das larvas (Tabela 8).

Tabela 8. Mortalidade média de *P. interpunctella* em diferentes dosagens de extratos proteicos das frações FII de três cultivares de gergelim (BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4).

GENÓTIPOS	DOSES (%)					
	0	0,1	0,3	1	1,5	3
	MORTALIDADE (%)					
BRS-SEDA	0,00a*	33b	50b	50b	50b	58,33b
CNPA G3	0,00a	33b	41,67b	41,67b	50b	58,33b
CNPA G4	0,00a	33b	41,67b	50b	50b	58,33b

* Médias seguidas da mesma letra na linha e na coluna não diferem entre si estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0.05$).

Mediante os resultados obtidos no bioensaio, pôde-se observar forte efeito dos extratos proteicos totais e das FII de gergelim em diferentes dosagens sobre as larvas, causando mortalidade a partir da incorporação de 0,1% de extrato, com efeito significativo de 33% e 68% de mortalidade para extratos proteicos totais e FII, respectivamente. Diante desses resultados pode-se inferir que pequenas dosagens de extratos de gergelim adicionadas à dieta terá efeito significativo sobre a sobrevivência das larvas de *P. interpunctella* quando comparado ao controle. Podendo-se considerar esse extrato como um promissor para uso no controle dessa praga.

Contudo, nas análises de variância, em relação a dosagem de extrato contendo

inibidor de tripsina e o número de larvas mortas ($p > 0,05$), percebe-se comportamento muito semelhante entre os extratos proteicos totais e as frações FII dos genótipos de gergelim, o que mostra não ter diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, com tendência de estabilização de dosagem para a mortalidade. Apesar de apresentar pequenas diferenças, pôde-se observar mortalidade das larvas com média variando de 33% a 83%. Amorim et al. (2008) avaliaram o efeito do inibidor SBT (inibidor de tripsina de soja) no desenvolvimento de larvas de *P. interpunctella* e mostrou que não afetou a mortalidade e nem a massa das larvas. Neste mesmo estudo, foi também testado a adição de EvV (*Erythrina velutina* vicilina) na dieta, a qual afetou a mortalidade das larvas com DL_{50} 0,23% e na massa larval ED_{50} de 0,27%.

Os resultados apresentados nesse trabalho são importantes para o programa de melhoramento de gergelim visando seleção de plantas tolerantes a pragas de grãos armazenados. Dos dez genótipos investigados, três são cultivares e os demais linhagens avançadas que foram desenvolvidas via hibridação pela Embrapa. As três cultivares (BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4) apresentaram maior capacidade inibitória e demonstraram serem candidatas promissoras para originar populações segregantes, que consistiriam, possivelmente, de materiais com ampla tolerância a insetos de grãos armazenados. Além disso, a estabilidade térmica e hidrogeniônica também contribuem para justificar a seleção, abrindo uma perspectiva de obtenção de linhagens ricas em IPs.

5. CONCLUSÕES

- Foi detectada a presença de inibidores de tripsina nos extratos proteicos totais dos 10 genótipos de gergelim investigados.
- Os genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 foram os que apresentaram maior atividade inibitória sobre TPB e homogenato intestinal de larvas de *P. interpunctella*.
- Os inibidores presentes nos genótipos de gergelim investigados apresentaram-se relativamente estáveis em diferentes temperaturas e pHs.
- Os extratos proteicos de BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 foram eficientes no controle de larvas de *P. interpunctella*, o que sugere potentes candidatos com propriedades inseticidas para o programa de melhoramento visando o controle de pragas de grãos armazenados.

6. PERSPECTIVAS

- Em análise *in vivo*, pode ser feita uma avaliação de novas dosagens de extrato proteico na dieta, no intuito de definir a DL₅₀.
- Os genótipos BRS-SEDA, CNPA G3 e CNPA G4 são referências de fonte genética para características de resistência a pragas de grãos armazenados e poderão ser utilizados no Programa de Melhoramento da espécie.
- No aspecto Biotecnológico, podem ser isoladas as sequências dos genes que codificam para os inibidores de proteases para posteriores estudos de transformação de plantas.
- Os inibidores proteases podem usados como fonte de resistência em diferentes formulações de compostos para controle de pragas.

7. REFERÊNCIAS

AGHAALI, N.; GHADAMYARI, M.; HOSSEININAVEH, V.; RISEH, N.S. Protease inhibitor from the crude extract of plant seeds affects the digestive proteases in *Hyphantria cunea* (Lep.: Arctiidae). **Journal of Plant Protection Research**, v.53, n.4, p. 338-346, 2013.

AGNE, P.S.E; RANCÉ, F.; BIDAT, E. Allergie au sésame. **Revue française d'allergologie et d'immunologie Clinique**, v. 43, p. 507-516, 2003.

AKHTAR, K.P; SARWAR, G.S.; SARWAR, N.; ELAHI, M.T. Field evaluation of sesame germplasm against sesame phyllody disease. **Pakistan Journal of Botany**, v.45, n.3, p.1085-1090, 2013.

AMORIM, M.L.T; MACEDO, L.L.P.; UCHOA, A.F.; OLIVEIRA, A.S.; PITANGA, J.C.M.; MACEDO, F.P.; ELIZEU, A.S.; SALES, M.P. Proteolytic digestive enzymes and peritrophic membranes during the development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Piralidae): targets for the action of soybean trypsin Inhibitor (SBTI) and chitin-binding vicilin (EvV). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.17, p.7738–7745, 2008.

AMORIM, T.M.L. **Avaliação da ação bioinseticida de SBTI e vicilina de *Erythrina velutina* em enzimas digestivas e membrana peritrófica de larvas de *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae)**. 2007. 81p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande Norte.

ANTONIASSI, R.; ARRIEL, N.H.C; GONÇALVES, E.B.; FREITAS, S..C; ZANOTTO, D.L; BIZZO, H.R. Influência das condições de cultivo na composição da semente e do óleo de gergelim. **Revista Ceres**, v. 60, n.3, p. 301-310, 2013.

ANTUNES, A. F. **Atividade inibitória de extratos vegetais do cerrado sobre α -amilases**. 2008. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.

AOYAMA, E.M.; LABINAS, A.M. Características estruturais das plantas contras a herbívora por insetos. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p.365-386, 2012.

ARRIEL, N.H.C.; FIRMINO, P.T; BELTRÃO, N.E.M.; SOARES, J.J; ARAÚJO, A.E.; SILVA, A.C.; FERREIRA, G.B. **A cultura do gergelim**. Embrapa Informação Tecnológica. Brasília, DF, p.72, 2007.

ARTHUR, F.H.; PHILLIPS, T.W. Stored-product insect pest management and control. In: Hui, Y.H., Bruinsma, B.L., Gorham, J.R., Nip, W.K., Tong, P.S., Ventresca, P. (Eds.), **Food Plant Sanitation**. Marcel Dekker, v.[?], p. 341–358, 2003.

AZARKAN, M., R.; DIBIANI, E.; GOORMAGHTIGH, E.; RAUSSENS, V.; BAEYENS-VOLANT, D. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β -sheet glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1764, n.6, p.1063–1072, 2006.

BARIANI, A. **Propriedades bioquímicas e biológicas de proteínas de sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia**. 2008. 122p. Dissertação (Mestrado Ciências de Florestas Tropicais). Pós-graduação em Ciências de Florestas Tropicais, Universidade Federal de Amazonas.

BARIANI, A.; GONÇALVES, J.F.C.; CHEVREUIL, L.R.; CAVALLAZZI, J.R.P.; SOUZA, L.A.G.; BENTS, J.L.S.; PANDO, S.C. Purificação parcial de inibidores de sementes de *Caesapinia férrea* e *Swartzia polyphylla* e o efeito dos extratos protéicos sobre fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathol**, v.38, n.2, p.131-138, 2012.

BERNARDI, O.; ALBERNAZ, K. C.; VALICENTE, F. H.; OMOTO, C. Resistência de insetos-praga a plantas geneticamente modificadas. In: BORÉM, A.; DIAS, G. (Ed.). **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. Visconde do Rio Branco: Suprema, p.179-204, 2011.

BHARDWAJ, U.; BHARDWAJ, A.; KUMAR, R; LEELAVATHI, S.; REDDY, V.S; MAZUMDAR-LEIGHTON, S. Revisiting rubisco as a protein substrate for insect midgut proteases. **Archives of insect biochemistry and physiology**, v.85, n.1, p.13–35, 2014.

BLAND, J.M.; LAX, A. Isolation and characterization of a peanut maturity-associated protein. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.8, p. 3275-3279, 2000.

BOM, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado**. 1 ed. Rio de Janeiro: Interciência, p.290-300, 2008.

BOUAYAD, N.; RHARRABE, K.; GHAILANI, N.N.; JBILOU, R.; CASTAÑERA, P.; ORTEGO, F. Insecticidal effects of Moroccan plant extracts on development, energy reserves and enzymatic activities of *Plodia interpunctella*. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v.11, n.1, p. 189-198, 2012.

BRADFORD, M.M. A dye binding assay for protein. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CABRERA-OROZCO, A.; JIMÉNEZ-MARTÍNEZ, C.; DÁVILA-ORTIZ, G. Soybean: Non-Nutritional Factors and Their Biological. In: _____. **Soybean - Bio-Active Compounds**. p.387-410, 2013.

CACERES, N.K.; GUIMARÃES, R.C.A.; IDA, E. I.; FAVARO, S.P. Determinação da atividade de inibidores de tripsina fitato em amêndoas de Baru processadas (*Dipteryx alata* Vog. **IX Simpósio Nacional Cerrado e II Simpósio Internacional Savanas Tropicais**. Brasília, DF, 2008.

CALDERON, L.A.; FILHO, H.A.A.; TELES, R.C.L.; MEDRANO, F.J.; JR, C.B.; SANTORO, M.M.; FREITAS, S.M. Purification and structural stability of a trypsin inhibitor from Amazon *Inga cylindrica* [Vell.] Mart. seeds. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 22, p.73-79, 2010.

CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SA, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n.11, p. 1515-1539. 2002.

CARVALHO, H.A.S. **Análise bioquímica e molecular de protease na interação *Theobroma cacao* – *Moniliophthora perniciosa***. 2007.71p. Dissertação (Mestre em Genética e Biologia Molecular). Programa Pós-graduação em genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz.

CHEVREUIL, L.R.; GONÇALVES, J.F.C.; BARIANI, A.; RODRIGUES, J.V.F.C.; PANDO, S.C. Detecção de inibidores de tripsina e atividade hemaglutinante em sementes de leguminosas arbóreas da Amazônia. **Acta Amazonica**, v.39, n.1, p.199-206, 2009.

CHONG, C.H. A long-term survey of indian meal moths in a dry goods warehouse using monitoring traps with pheromone lures. **The army medical department jornal**, p.85-92, 2013.

CRUZ, A.C.B.; MASSENA, F.S.; MIGLIOLO, L.; MACEDO, L.L.P.; MONTEIRO, N.K.V.; OLIVEIRA, A.S.; MACEDO, F.P.; UCHOA, A.F.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; VASCONCELOS, I.M.; MURAD, A.M.; FRANCO, O.L.; SANTOS, E.A. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from Catanduva (*Piptadenia moniliformis*) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.70, p.61-68, 2013.

DATTA, K.; USHA, R.; DUTTA, S.K.; SINGH, M. A comparative study of the winged bean protease inhibitors and their interaction with proteases. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.39, n.11, p. 949-959, 2001.

DOUD, C.W.; PHILLIPS, T.W. Activity of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in and around flour mills. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n.6, p. 1842-1847. 2000.

DUARTE, M.S.L.; PEREIRA, C.A.S.; SOUZA, E.C.G.; CONCEIÇÃO, L.L. Determinação da atividade in vitro de inibidores de tripsina em feijão (*Phaseolus vulgaris* l.) preto, albumina e globulina. **Alimentos e nutrição**, v. 21, n.3, p. 373 – 376, 2010.

DUARTE, S.M. **Produção recombinante e caracterização de uma cisteína protease (tipo catepsina B) de cana-de-açúcar.** 2008. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Programa de Pós-graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos.

EL-BRAMAWY, M.A.EL-H.A.A. Anti-nutritional factors as screening criteria for some diseases resistance in sesame (*Sesamum indicum* L.) genotypes. **Journal of Plant Breeding and Crop Science**, v. 3, n.13, p. 352-366, 2011.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Data.** Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat>>. Acesso em 07 de maio de 2012.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Statistical Data.** Disponível em: <<http://faostat.fao.org/faostat>>. Acesso em 15 de janeiro de 2014.

FERREIRA, S.C. **Atividade anti-angiogênica de inibidores de tripsina em membrana corioalantóica de *Gallus domesticus*.** 2013. 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Program de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto.

FRANCO, O.L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant alpha-amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylase. **European Journal of Biochemistry**, v.269, n.2, p.397-412, 2002.

GOMES, C. E. M.; BARBOSA, A.E.A.D.; MACEDO, L.L.P.; PITANGA, J.C.M.; MOURA, F.T.; OLIVEIRA, A.S.; MOURA, R.M.; QUEIROZ, A.F.S.; MACEDO, F.P.; ANDRADE, L.B.S.; VIDAL, M.S.; SALES, M.P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (Cowpea weevil) and *Ceratitidis capitata* (Fruit fly). **Plant physiology and biochemistry**, v. 43, n.12, p.1095-1102, 2005.

GRIFFITH, O.M. **Large volume precipitation of proteins with ammonium sulfate using thermo scientific fiberlite carbon fiber rotors.** Thermo Scientific: ANCFGAMSULF 0511, 2011. (Technical Note)

HABIB, H., FAZILI, K. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.2, n.3, p.68-85, 2007.

HANDEM, S.A. **Inibidores de Proteinases Aspárticas com Actividade Antimicorbiana.** 2013. 79p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Programa Pós-graduação em Bioquímica, Universidade de Coimbra.

HERRERO, S.; OPPERT, B.; FERRÉ, J. Different mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in the indianmeal moth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n.3, p. 1085-1089, 2001.

HOEF, V. **Distribution and functional characterization of PSTI-like protease inhibitors in insecta.** 2011.Dissertation (Doctoral of Biology). Groep Wetenschap & Technologie, Katholieke Universiteit Leuven. België.

HWANG, L.S. Sesame oil. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, v.7. n.[?], p. 537-576, 2005.

JOSÉ, M.O.M.A. **Inibidores de proteinases do tipo Bowman-Birk: evolução molecular, expressão na superfície de fagos filamentosos e seu papel na interação planta-inseto**. 2002. 108p. Tese (Doutorado em Agronomia). Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade de São Paulo.

KAKADE, M.L.; SIMONS, N.; LIENER, I.E. An evaluation of natural vs. Synthetic substrates for measuring the anti tryptic activity of soybean samples. **Cereal Chemistry**, v.46, p. 518-526, 1969.

KARUMBIAIAH, L.; OPPERT, B.; JURAT-FUENTES, J.; ADANG, J.M. Analysis of midgut proteinases from *Bacillus thuringiensis* – Susceptible and –resistant *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.14B, p.139-146, 2007.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. **Journal of Genetic and Physiology**, v. 30, n.4, p. 291–310, 1947.

LI, Z. T.; GRAY, D. J. Isolation by improved thermal asymmetric interlaced PCR and characterization of a seed-specific 2S albumin gene and its promoter from grape (*Vitis vinifera* L.). **Genome**, v. 48, n.2, p. 312-20, 2005.

LIMA, M. R.; SILVA, V. P. A.; FURTADO, R. F.; ALVES, C. R.; GUEDES, M. I. F.; DUTRA, R. A. F. Purificação de Ricina a partir de saturação com sulfato de amônio. **III Congresso de Mamona, Energia e Riciquímica**. Salvador BA, 2008.

LIMA, P.M. **Detecção de inibidores de tripsina em genótipos de amendoim visando controle de pragas de grãos armazenados**. 2013. 53p. Dissertação (Mestrado Ciências Agrárias). Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão.

LOPES, A.R., JULIANO, M.A.; MARANA, S.R.; JULIANO, L.; TERRA, W.R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.36, n.2, p.130-40, 2006.

LOPES, J.L.S. **Purificação e investigação das propriedades físico-químicas de inibidores de proteases extraídos de sementes de *Acacia plumosa* Lowe**. 2006. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós-graduação em Ciências, Universidade de São Paulo. São Paulo.

MACEDO, L. R.; FREIRE, M.G. M.; CABRINI, E. C.; TOYAMA, M. H. ; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1621, n.2, p.170-182. 2013.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; FRANCO, O.L.; MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, C.F.R. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. **Comparative Biochemistry and Physiology part B, Biochemistry & Molecular Biology**, v.158, n.2, p.164-172, 2011.

MACEDO, M.L.; GARCIA, V.A.; FREIRE, M.G.; RICHARDSON, M. Characterization of Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfite bridge from seeds, of *Inga laurina* (SW.) Wild. **Phytochemistry**, v.68, n.8, p.1104-1111, 2007.

MANDAL, S., KUNDU, P., ROY, B., MANDAL, R. K. Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the Indian mustard *Brassica juncea* is a novel trypsin inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n.40, p. 37161-37168, 2006.

MELLO, M.O.; SILVA-FILHO, M.C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, n.2, p.71-81, 2002.

MELO, D.R. **Estudo bioquímicos de proteases extracelulares e expressão de seus genes de isolados de *Trichoderma* spp. Após crescimento em parede celular de *Rhizoctonia solani***. 2012. 71p. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares). Programa de Pós-graduação em Ciências Moleculares, Universidade Estadual de Goiás.

MICHEREFF FILHO, M., RESENDE, F.V.; VIDAL, M.C.; GUIMARÃES, J.A.; MOURA, A.P.; SILVA, P.S.; REYES, C.P. **Manejo de pragas em hortaliças durante a transição agroecológica**. Brasília: Departamento de produção Embrapa Hortaliças, 2013. 16 p. (Circular Técnica Embrapa 119).

MIGLIOLO, L. **Construção de modelos de interação *in silico* e *in vitro* do inibidor do tipo Kunitz de *Adenantha pavonina* L. para enzimas cisteínicas e serínicas**. 2008. 95p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

MOHAN, M. AND GUJAR, G. T. Characterization and comparison of midgut proteases of *Bacillus thuringiensis* susceptible and resistant diamondback moth (Plutellidae: Lepidoptera). **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 82, n.1, p.1-11, 2003.

MOHANDASS, S.; ARTHUR, F.H.; ZHU, K.Y.; THRONE, J.E. Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products. **Journal of Stored Products Research**, v. 43, n.3, p.302–311, 2007.

MOMOH, A.O.; ADEBOLU, T.T.; OGUNDARE A.O. The effects of different treatments on the phytochemicals, proximate, and mineral contents of beniseeds (*Sesamum indicum* linn). **Global Advanced Research Journal of Biotechnology**, v.1, n.1, p. 8 -11, 2012.

MOREIRA, N.R. **α - manosidases intestinais da larva de *Tenebrio molitor* (Coleoptera)**. 2008. 67p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós Graduação em Ciências, Universidade de São Paulo.

NANSEN, C., PHILLIPS, T.W. Ovipositional responses of the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) to oils. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 99, n.4, p. 253-260, 2003.

NETO, S.M. **Albuminas 2S bactericidas em sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.): uma nova estratégia no controle de infecção hospitalar.** 2007. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). Programa de Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília.

OLIVEIRA, A. S. **Purificação e caracterização de inibidores de tripsina de sementes de *Pithecellobium dumosun* e seus efeitos.** 2007.203p. Tese (Doutorado em Bioquímica). Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará.

OLIVEIRA, M.G.A; SIMONE, S.G; XAVIER, L.P., GUEDES, R.N.C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*. **Comparativ Biochemistry and Physiology**, v.140, n.3, p.369-380, 2005.

OLIVEIRA, S.A. **Síntese e caracterização de sistemas nanoestruturados contendo o inibidor de proteinases BTCl e peptídeos derivados.** 2012. 94p. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular). Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília.

OLSSON, C. AND ANDERBRANT, O. Flight and oviposition behavior of *Ephesia cautella* (Walker, 1863) and *Plodia interpunctella* in response to order of different chocolate products. **Journal of Insect Behavior**, v.18, p.363–371, 2005.

OYEKOLA, O.O. **The enzymology of sludge solubilisation under biosulphidogenic conditions: isolation, characterisation and partial purification of endoglucanases.** 2003. 109p. Thesis (Doctoral Biochemistry, Microbiology and Biotechnology). Department of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology, Universidade de Rhodes.

PAIXÃO, G.P. **Efeito de berenil, um inibidor de protease do tipo Bis-benzamidina, nas respostas bioquímica, fisiológica e comportamental de lagarta da soja *Anticarsia gemmatilis*.** 2010. 128p. Tese (Doutorado em Bioquímica Agrícola). Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.

PARDE, V.D. **Inhibition of *Helicoverpa armigera* gut zymogen activation by plant protease inhibitors.** 2009. 204p. Thesis (Doctoral in Philosophy in Biochemistry). Department of Biochemistry, Babasaheb Ambedkar Marathwada University.

PEREIRA, R.A. **Inibidores proteicos e seu potencia uso no controle de insetos-pragas de importância para a cultura do café e do feijão.** 2005. 148p. Tese (Doutorado em Biologia Molecular). Programa de Pós-graduação em Biologia Molecular, Universidade de Brasília.

PHAM, T. **Analyses of Genetic Diversity and Desirable Traits in Sesame (*Sesamum indicum* L., *Pedaliaceae*): Implication for Breeding and Conservation**. 2011. 52f. Thesis (Doctoral Plant Breeding and Biotechnology). Department Plant Breeding and Biotechnology, Swedish University of Agricultural Sciences.

PINTO-ZEVALLOS, D.M.; MARTINS, C.B.C.; PELLEGRINO, A.C.; ZARBIN, P.H.G. Compostos orgânicos voláteis na defesa induzida das plantas contra insetos herbívoros. **Química Nova**, v.36, n.9, p 1395-1405, 2013.

POMPE U, L.G.; POMPE U, D.G.; OLIVEIRA, A.C.; RAMOS, A.S.; PARREIRA A.G.; GONÇALVES, D.B.; GRANJEIR O, J.M.; SILVA, J.A.; GRANJEIR O, P.A. Extração e caracterização parcial do inibidor de tripsina/quimotripsina de sementes de quinoa (*Chenopodium quinoa*). **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.2, n.2, p.92-95, 2013.

QUEIROGA, V.P; GONDIM, T.M.S.; QUEIROGA,D.A.N. Tecnologia sobre operações de semeadura e colheita para a cultura do gergelim (*Sesamum indicum* L.). **Revista Agro@mbiente On-line**, v.3, n.2, p.106-121, 2009.

QUEIROGA, V.P; GONDIM, T.M.S.; VALE, D.G; GEREON, P.H.G.M.; QUEIROGA, D.A.N. Produção de gergelim orgânico em agricultura familiar no Nordeste brasileiro. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 5, n.2, p.166-172, 2011.

RAKWAL, R.; AGRAWAL, G.K; JWA, N.S. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut,jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. **Gene**, v.263, n.1-2, p. 189- 198, 2001.

RAMOS, V.O. **Isolamento de inibidores de tripsina de sementes de mamona e sua ação sobre o desenvolvimento de *Spodoptera fugiperda* (Smith, 1797)**. 2012. 59p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica). Programa de Pós-graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras.

RANJBAR, M.; ZIBAE, A.; SENDI, J.J. A trypsin-like proteinase in the midgut of *Ectomyelois ceratoniae* zeller (Lepidoptera: Pyralidae): purification, characterization, and host plant inhibitors. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.85, n.1, p.1-12, 2014.

RAWLINGS, N.D., NARRETT, A.J., BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v.40, n.1D, p.D343-D350, 2012.

REES, D. Insects of Stored Products. **Csiro publishing**, p. 192, 2004.

REIS, D.T.C. **Purificação e caracterização de proteases digestivas tripsina-like do intestino da lagarta de soja, envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto**. 2009. 123p. Dissertação (Doutorado em Bioquímica Agrícola). Programa de Pós Graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.

RICHARDSON, M., Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: DEY, P.M., HARBORNE, J.B. (Eds.), In: *Methods in Plant Biochemistry, Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids*. **Academic Press**, v. 5, p. 259–305. 1991.

RINGGENBERG, E. **The Physico-Chemical Characterization of Soymilk Particles and Gelation Properties of Acid-Induced Soymilk Gels, as a Function of Soymilk Protein Concentration**. 2011. 130p. Thesis (Doctoral Food Science). Department of University of Guelph.

ROSSI, G.D.; SANTOS, C.D.; CARVALHO, G.A.; CORRÊA, A.D.; ABREU, C.M.P.; CARVALHO, G.A. Enzimas digestivas do bicho-mineiro do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.1871-1876, 2009.

ROSSI, G.D.; SANTOS, C.D.; CARVALHO, ALVES, D.S.; PEREIRA, L.L.S.; CARVALHO, G.A. Biochemical analysis of a *Castor Bean* Leaf Extract and its insecticidal effects Against *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v.41, n.6, p.503-509, 2012.

SILVA, D.S.; OLIVEIRA, C.F.R.; PARRA, J.R.P.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Short and long-term antinutritional effect of the trypsin inhibitor ApTI for biological control of sugarcane borer. **Journal of Insect Physiology**, v.61, p.1-7, 2014.

SILVA, E.R.; MARTINO, H.S.D.; MOREIRA, A.V.B.; ARRIEL, N.H.C.; SILVA, A.C.; RIBEIRO, S.M.R. Capacidade antioxidante e composição química de grãos integrais de gergelim creme e preto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.46, n.7, p.736-742, 2011.

SILVA-FILHO, M.C.; FALCO, M.C. Interação planta-inseto. **Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento**, v.2, p. 38-42, 2000.

SILVA-LOPEZ, R. E. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Revista Fitos**, v.4, n.1, p. 108-119, 2009.

SIVAKUMAR, N.; LI, N.; TANG, J.W.; PATEL, B.K.; SWAMINATHAN, K. Crystal structure of AmyA lacks acidic surface and provide insights into protein stability at poly-extreme condition. **FEBS Letters**, v. 580, n.11, p. 2646-2652, 2006.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEN, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine protease and protease inhibitors genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**, v.11, n.3, p. 431 -443, 1999.

SOUZA, F.F.J. **Qualidade fisiológica de sementes de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willdenow) armazenadas em diferentes ambientes e embalagens**. 2013. 50p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Programa de Pós-graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Goiás.

SOUZA, W.C.O.; FERREIRA, L.L.; BELTRÃO, N.E.M. Aspectos socioeconômicos associados à cultura do Gergelim. In: BELTRÃO, N.E.M.; FERREIRA, L.L.; QUEIROS, N.L.; TAVARES, M.S.; ROCHA, M.S.; ALNECAR, R.D.; PORTO, V.C.N. **O gergelim e seu cultivo no semiárido brasileiro**. 1.ed. Natal : IFRN, 2013. p.14-20.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A.P.; GUPTA, V.S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cellular and Molecular Biology**, v.11, n.1, p.132-154, 2006.

SUZUKI, A.; TSUNOGAE, Y.; TANAKA, I.; YAMANE, T.; ASHIDA, T.; NORIOKAS, S.; HARA, S.; IKENAKA, T. The structure of Bowman-Birk type protease inhibitor a-II from peanut (*Arachis hypogaea*) at 3.3Å resolution. **Journal of Biochemistry**, v.101, n.1, p. 267-274, 1987.

TAN, C.G.I; STEVENS, F.C. Amino acid sequence of lima bean protease inhibitor component IV. Isolation and sequence determination of the tryptic peptides. **European Journal of Biochemistry**, v.18, n.4, p. 503-514, 1971.

TERRA, W.R.; FERREIRA, C.; BIANCHI, A.G. Action pattern, kinetical properties and electrophoretical studies of an alpha-amylase present in midgut homogenates from *Rhynchosciara Americana* (Diptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.56, p.201-209, 1977.

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

TIFFIN, P.; GAUT, B.S. Molecular evolution of the wound-induced serine proteinase inhibitor wip1 in zea and related genera. **Molecular Biological Evolution**, v.18, p. 2092-2101, 2001.

TURK, B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.5, n.9, p.785-799, 2006.

VALUELA, T.A.; REVINA, T.A.; MOSOLOV, V.V. Potato tuber protein proteinase inhibitors belonging to the Kunitz soybean inhibitor family. **Biochemistry**. v.62, n.12, p. 487-502. 1998.

VARGAS, A.M.P. **Purificação parcial e caracterização cinética da inibição de proteases intestinais tripsina-like de *Anticarsia gemmatilis***. 2011. 75p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola). Programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.

WANG, J.; LI, X.; XIA, X.; LI, H.; LIU, J.; QING LI, X.; XU, J.L.T. Extraction, purification, and characterization of a trypsin inhibitor from cowpea seeds (*Vigna unguiculata*). **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 44, n.1, p.1-15, 2014.

WATI, R.K; THEPPAKORN, T.; BENJAKUL, S.; RAWDKUEN, S. Trypsin inhibitor from 3 legume seeds: fraction and proteolytic inhibitor study. **Journal of Food Science**, v.75, n.3, p.223-228, 2010.

WIJAYARATNE, L.; FIELDS, P.G. Effects of rearing condition, geographical origin, and selection on larval diapause in the indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. **Journal of Insect Science**, v.12, n.119, p.1-19, 2013.

WIJAYARATNE, L.K, CAMPOS, P.G. Effects of rearing conditions, geographical origin, and selection on larval diapause in the Indianmeal moth, *Plodia interpunctella*. **Journal of Insect Science**, v.12, n. 119, p.1-19, 2013.

WIKIMEDIA COMMONS. **The free media repository**. Disponível em: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plodia_interpunctella_lrv_collage.jpg>. Acesso em 08 de Fevereiro de 2014.

XAVIER, L.P.; OLIVEIRA, M.G.A; GUEDES, R.N.C.; SANTOS, A.V.; SIMONE, S.G. Membrane-bound trypsin-like activity of midgut proteases from *Amticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **European Journal of Entomology**, v.102, p.147-153, 2005.

ZÁVODSJA, R. FEXOVÁ, S.; WOWER, G.; HAN, G.B.; DOLEZEL, D. SAUMAN, L. Is the sex communication of two pyralid moths, *Plodia interpunctella* and *Ephestia kuehniella*, under circadian clock regulation? **Journal of biological Rhythms**, v.27, n.3, p. 2006-2016, 2012.

ZHU, Y.C., OPPERT, B., KRAMER, K.J., MCGAUGHEY, W.H., DOWDY, A.K. cDNAs for a chymotrypsinogen-like protein from two strains of *Plodia interpunctella*. **Insect Biochemistry and Molecular**, v.27, n.12, p.1027–1037, 1997.