

**DETECÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA EM GENÓTIPOS DE
AMENDOIM VISANDO CONTROLE DE PRAGAS DE GRÃOS
ARMAZENADOS**

PATRÍCIA DE LIMA MARTINS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

CAMPINA GRANDE-PB

MARÇO DE 2013

**DETECÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA EM GENÓTIPOS DE
AMENDOIM VISANDO CONTROLE DE PRAGAS DE GRÃOS
ARMAZENADOS**

PATRÍCIA DE LIMA MARTINS

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

MARÇO DE 2013

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

M386d

Martins, Patrícia de Lima.

Detecção de inibidores de tripsina em genótipos de amendoim visando controle de pragas de grãos armazenados [manuscrito]. / Patrícia de Lima Martins. – 2013.

56 f. : il. color.

Digitado

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), Centro de Ciências Humanas e Agrárias, Universidade Estadual da Paraíba, 2013.

“Orientação: Profa. Dra. Liziane Maria de Lima, EMBRAPA”

“Coorientador: Profa. Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos, EMBRAPA”

1. Genética vegetal. 2. Inibidor de tripsina. 3. Proteases serínica. I. Título.

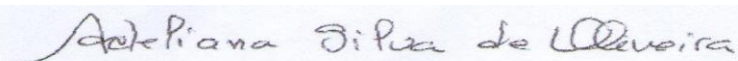
21. ed. CDD 581.3

**DETECÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA EM GENÓTIPOS DE
AMENDOIM VISANDO CONTROLE DE PRAGAS DE GRÃOS
ARMAZENADOS**

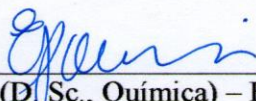
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias / Área de Concentração: Biotecnologia.

Aprovada em 19 de março de 2013

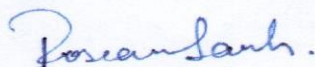
Banca Examinadora:



Prof.^a Adeliana Silva de Oliveira (D. Sc., Bioquímica) – UFRN, Examinadora Externa



Prof. Everaldo Paulo de Medeiros (D. Sc., Química) – Embrapa Algodão, Examinador Interno



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



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

Aos meus pais Edilson e Maria José
Aos meus irmãos Renata e Raphael
A Rodolfo

AGRADECIMENTOS

A **DEUS**, primeiramente, pela dádiva da vida, pelo amor infinito e todas as bênçãos recebidas nesta caminhada.

Aos **meus pais**, meu alicerce, exemplos de dedicação, força e amor. Saibam que vocês são os responsáveis por mais esta vitória em minha vida. Obrigada pela confiança e incentivo.

Aos meus amados irmãos **Renata e Raphael**, pela confiança, amor e incentivo.

Ao meu noivo **Rodolfo** pelo amor, companheirismo, dedicação e compreensão em todos os momentos da minha vida. Você foi fundamental.

Aos meus **familiares** tios (as), primos (as) e amigas (os): Guia F. Guedes, Adinécio Oliveira, Edna Maria, Samara Freire, Socorro Paschoal, Tatiana Rosa, Luiz Gonzaga, Ivone Barbosa, Ivonete Barbosa e Noemia Barbosa que sempre torceram pelo meu sucesso e pela realização dos meus sonhos.

À Universidade Estadual da Paraíba e Embrapa Algodão, pela oportunidade do estágio e conhecimentos adquiridos.

À Dra. **Liziane Maria de Lima**, pela oportunidade, confiança, conselhos, paciência e pela amizade.

À Dra. **Roseane Cavalcanti dos Santos** pela confiança, novos aprendizados e presteza em servir.

Ao querido amigo **Antônio Arroxelas**, pelos ensinamentos, paciência e empenho em transmiti-los. Muito obrigada!

Às todas as minhas queridas e inesquecíveis amigas do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão: **Milena Silva Porto** e **Morganna Pollyne Nóbrega** obrigada pelo companheirismo, momentos especiais de alegria, pelo apoio, conselhos e carinho.

À **Geisenilma Gonçalves** e **Eveline Araújo**, pelo exemplo, motivação e afeto em todos os momentos.

À **Géssica Laize**, **Valeska Lucena** e **Maria Aline** pela alegria que vocês transmitem, determinação e incentivo. Ao amigo Vandrê Guevara, pela grandiosidade em servir e exemplo de serenidade.

À querida amiga **Fábia Suely** pela ajuda nos experimentos, pelas palavras de ânimo, consolo e ensinamentos.

Ao Dr. Raul Almeida e ao estagiário Bruno Adelino pelas instruções de montagem do bioensaio no Laboratório de Entomologia.

Ao Dr. João Luiz pelas análises estatísticas.

Ao Coordenador do Programa de pós-graduação em Ciências Agrárias, prof. **Alberto Soares**.

Aos **professores** do Programa de pós-graduação, pelos conhecimentos transmitidos.

Aos **amigos (as)** da turma de Mestrado: Taíza, Germana, Monaliza, Emanuelle e Gerkson.

Aos funcionários da Embrapa Algodão.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

**Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,
mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo.**

E que posso evitar que ela vá a falência.

**Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver
apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.**

**Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e
se tornar um autor da própria história.**

**É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar
um oásis no recôndito da sua alma.**

É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.

Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.

É saber falar de si mesmo.

É ter coragem para ouvir um 'não'.

É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.

Pedras no caminho?

Guardo todas, um dia vou construir um castelo...

(Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Objetivos	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1. Aspectos gerais e importância da cultura	19
2.2. Proteases e inibidores de proteases	21
2.2.1. Proteases.	21
2.2.2. Inibidores de protease vegetal	21
2.2.3. Inibidores de proteases serínicas	23
2.3. Interação planta-praga	24
2.4. <i>Alphitobius diaperinus</i> (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)	25
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Sementes de Amendoim	27
3.2. Insetos	28
3.3. Preparação do extrato proteico de sementes de amendoim	28
3.4. Determinação de proteínas	30
3.5. Preparação da solução usada como substrato	30
3.6. Determinação da atividade ótima da tripsina bovina e de <i>A. diaperinus</i>	30
3.7. Preparo do homogenato intestinal de insetos	30
3.8. Bioensaio com <i>A. diaperinus</i>	30
3.9. Análises estatísticas	31
3.10. Determinação da atividade antitriptica	31
3.11. Estabilidade térmica do inibidor	31
3.12. Estabilidade do inibidor em diferentes pHs	32
3.13. Eletroforese em Gel de poliacrilamida (SS–PAGE)	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
4.1. Detecção da atividade inibitória para tripsina bovina em extratos proteicos de amendoim	33
4.2. Atividade inibitória dos genótipos de amendoim sobre o homogenato intestinal de <i>A. diaperinus</i>	34
4.3. Bioensaio de alimentação de adultos de <i>A. diaperinus</i> com duas fontes de dieta	35

4.4. Caracterização do inibidor de tripsina do genótipo CNPA 280 AM	38
4.4.1 Atividade antitriptica do extrato e frações protéicas	38
4.4.2. Eletroforese em Gel de poliacrilamida (SDS – PAGE)	40
4.4.3. Estabilidade térmica da F3	41
4.4.4. Estabilidade em diferentes pHs	43
4.4.5 Atividade inibitória da F3 com homogenato intestinal de diferentes insetos	44
5. CONCLUSÕES	47
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos inibidores de proteinases vegetais	23
Tabela 2. Genealogia, origem e alguns descritores agrônômicos dos genótipos de amendoim investigados neste estudo	27
Tabela 3. Atividade inibitória para tripsina em extratos proteicos de Amendoim	33
Tabela 4. Resumo da análise de variância do bioensaio com genótipos de amendoim e insetos <i>A. diaperinus</i>	36
Tabela 5. Teste de média do número de larvas no bioensaio com genótipos de amendoim e insetos <i>A. diaperinus</i>	37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Planta e sementes de amendoim (*Arachis hypogaea* L) 19
- Figura 2.** Adulto de *A. diaperinus* em grãos 28
- Figura 3.** Esquema da precipitação do extrato bruto de amendoim genótipo CNPA 280 AM com sulfato de amônio e concentrações 0-30%, 30-60% e 60-90% 29
- Figura 4.** Ensaio de inibição com os genótipos de amendoim BRS 151 L7, BRS Havana, CNPA 270 AM, CNPA 280 AM e Florruner com homogenato intestinal de *A. diaperinus*. O extrato proteico foi pré-incubado com homogenato intestinal por 20 min., a 37 °C. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína a 1,5% (m/v) como substrato. Resultados expressos em média \pm desvio padrão 34
- Figura 5.** Ensaio de inibição com F1 (0-30%), F2 (30-60%) e F3 (60-90%) de CNPA 280 AM. As frações foram pré-incubadas com homogenato intestinal de *A. diaperinus* ou tripsina bovina por 20 min., a 37 °C. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína a 1,5% (m/v) como substrato. Resultados expressos em média \pm desvio padrão 38
- Figura 6.** Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença de SDS com proteínas de amendoim CNPA 280 AM. M- Marcador de peso molecular; 1- EB; 2- Fração protéica saturada com sulfato de amônio na faixa F3; 3- F2 ; 4- F1 40
- Figura 7.** Estabilidade dos inibidores da F3 e do EB do genótipo CNPA 280 AM em diferentes temperaturas (40 °C; 60 °C; 80 °C; 100 °C), incubados por 30 min. Após o tratamento térmico, o inibidor foi pré-incubado com tripsina por 20 min, a 37 °C. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína a 1,5%(m/v) como substrato. Resultados expressos em média \pm desvio padrão 41
- Figura 8.** Estabilidade dos inibidores da F3 do genótipo CNPA 280 AM em diferentes temperaturas (40 °C; 60 °C; 80 °C; 100 °C), incubados por 30 min. Após o tratamento térmico, o inibidor foi pré-incubado com homogenato intestinal de *A. diaperinus* por 20 42

min, a 37 °C. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína a 1,5% (m/v) como substrato. Resultados expressos em média \pm desvio padrão

Figura 9. Estabilidade da F3 e, diferentes pHs. A F3 foi dialisada em diferentes pHs e em seguida pré-incubado com tripsina ou homogenato intestinal de *A. diaperinus* por 20 min, a 37 °C em pH 8,5. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Resultados expressos em média \pm desvio padrão

43

Figura 10. Atividade inibitória da F3 com homogenato intestinal de *S. Frugiperda*, *T. molitor* e *T. castaneum*. A F3 foi pré-incubado com homogenato intestinal por 20 min, a 37 °C. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Resultados expressos em média \pm desvio padrão

44

LISTA DE ABREVIATURAS

Abs - Absorbância

BSA - Albumina Sérica Bovina

°C - Graus Celsius

cm - centrimetros

EB - Extrato Bruto

G - grama

HCL - Ácido clorídrico

IP - Inibidores de proteases

NaCl - Cloreto de Cálcio

NaOH - Hidróxido de Sódio

kDa - Kilodalton

L - Litro

M - Molar

mL- Mililitros

mg - Miligramas

mM - Milimolar

mm - milímetros

nm - nanômetro

m/v - Relação massa volume

pH - Potencial Hidrogeniônico

SDS-PAGE - Gel de poliacrilamida desnaturante com Dodecil Sulfato de sódio

TCA - Ácido Tricloracético

Tris - Tri (hidroximetil) aminometano

UI - Unidade de Inibição

μg - Micrograma

μL - Microlitro

RESUMO

MARTINS, Patrícia Lima de. M. Sc. Universidade Estadual da Paraíba / Embrapa Algodão; Março de 2013; Detecção de inibidores de proteases em genótipos de Amendoim visando o controle de pragas de grãos armazenados. Orientadora: Dr^a. Liziane Maria de Lima e Coorientadora: Dr^a. Roseane Cavalcanti dos Santos.

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma oleaginosa expressiva no cenário mundial, devido ao valor comercial de seu óleo. No Brasil, é cultivado em todas as regiões, para atender aos mercados *in natura* e de alimentos. Um dos problemas detectado na lavoura é na fase de pós-colheita, que, em condições inapropriadas levam a ocorrência de pragas nos grãos armazenados. Sabe-se, contudo, que algumas leguminosas detêm em suas sementes os inibidores de proteases (IP) que atuam na defesa direta contra pragas de grãos, provocando prejuízos na absorção de nutrientes e até mesmo a sua morte. Objetivou-se com este trabalho detectar a presença de inibidores de tripsina em genótipos de amendoim e estudar o potencial de inibição contra as enzimas digestivas de *Alphitobius diaperinus* e outros insetos de interesse agrônomo. Para tanto, procedeu-se a detecção de IPs em 10 genótipos de amendoim pertencentes ao Programa de Melhoramento da Embrapa Algodão. As proteínas totais de sementes de cada acesso foram extraídas, quantificadas, fracionadas com sulfato de amônio, e submetidas a testes de estabilidade térmica e de pH, para posteriores ensaios *in vitro* e bioensaios. Os resultados obtidos evidenciaram a presença de inibidores de tripsina nos extratos proteicos das sementes de amendoim dos dez genótipos, contudo o BRS 151 L7 apresentou a maior inibição *in vitro* para as enzimas do trato digestivo do *A. diaperinus* e o menor número de larvas no bioensaio. A F3 do genótipo CNPA 280 AM apresentou o maior percentual de inibição tanto nos ensaios com tripsina bovina como no homogenato intestinal de *A. diaperinus*, e foi altamente estável nos ensaios com diferentes pHs e temperaturas. Destacou-se ainda por inibir em 16%, 42% e 82% as tripsinas intestinais de *Spodoptera frugiperda*, *Tenebrio molitor* e *Tribolium castaneum*,

respectivamente. Os resultados obtidos nesta pesquisa são bastante relevantes para contribuir com a redução de perdas de grãos no período de pós-colheita, tendo em vista que os genótipos investigados possuem características interessantes para posterior uso como recurso genético com fonte de resistência a insetos-praga.

PALAVRA-CHAVE: Proteinase serínica, Inibidor de tripsina, amendoim

ABSTRACT

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is an oilseed very expressive worldwide, due to commercial value of its oil. In Brazil, crop is grown in all regions, in order to attend *in natura* and food markets. The post-harvest is serious problem that affect the final output of the crop, which in inappropriate conditions, lead to occurrence of pests in stored grains. Some legumes contain protease inhibitors (PI) in their seeds that act directly in defense against grain pests, causing damage in nutrient absorption and further death. The objective of this study was to detect the presence of trypsin inhibitors in peanut genotypes and to study the potential inhibition against digestive enzymes in *Alphitobius diaperinus* and other agricultural pests. PI detection was carried out in 10 peanut genotypes belonging to Improvement Program at Embrapa Algodão (Campina Grande, PB, Brazil). Total proteins from seeds were extracted in each accession, quantified, fractionated with ammonium sulfate, and submitted thermal stability and pH tests, for further assays. All peanut genotypes showed PI in seed-protein extracts, however the highest inhibition rate for digestive enzymes of *A. diaperinus* was found in L7 BRS 151, which also reduced the number of larvae, in bioassay. The CNPA AM 280 showed the highest inhibition rate in both assays, bovine trypsin and intestinal homogenate of *A. diaperinus*. This genotype was also highly stable in different pH and temperature assays and inhibited the intestinal serine proteases from *Spodoptera frugiperda*, *Tenebrio molitor* and *Tribolium castaneum*, in 16%, 42% and 82% respectively. The results obtained in this study are quite relevant due to contribute with the reduction of grain losses in post-harvest, considering that genotypes investigated here have interesting traits for further use as genetic resources with resistance to pests.

KEYWORD: Serine proteinase, Trypsin inhibitor, Peanut

1. INTRODUÇÃO

O amendoim (*Arachis hipogaea* L.) é considerado uma das principais oleaginosas cultivadas no Brasil e no mundo. Atualmente é a quarta maior cultura de oleaginosa sendo cultivada em mais de 100 países com uma produção de 35,5 milhões de toneladas, (CONAB, 2012). O amendoim é cultivado de forma mais significativa em dez estados brasileiros, sendo São Paulo o maior produtor, com 85% da produção nacional, seguido por Bahia 3,6% e Mato Grosso 2,8%. A estimativa de produção no Brasil para 2013 é de 255,9 mil toneladas (CONAB, 2012).

A importância econômica do amendoim está relacionada ao fato das sementes possuírem sabor agradável, serem ricas em óleo (40% a 50%) e proteína (22% a 30%) (SILVEIRA, 2011). Na região Nordeste, o amendoim é uma excelente alternativa agrícola, em razão da riqueza nutricional de suas sementes e adaptação às condições semiáridas (FREITAS et al., 2005). A cultura tem ciclo curto, é de fácil manejo e apresenta mercado atraente. Cerca de 70% da área cultivável no Nordeste encontra-se em condições semiáridas com ampla variação de microclimas (GODOY, 2005; GOMES et al., 2007).

As pragas e doenças constituem fatores limitantes para a produtividade, pois acometem toda a planta como sementes, raízes e folha, e seu controle químico onera os custos de produção, além de ocasionar riscos ao meio ambiente (ARAÚJO et al., 2004). Desse modo, a busca por formas alternativas de controle de pragas tem se tornando relevante, haja vista ser necessário desenvolver manejos mais econômicos e ecologicamente corretos. Uma dessas alternativas refere-se à utilização direta de derivados das plantas, as quais possuem naturalmente, fatores intrínsecos de defesa que podem ser gerados por metabólitos secundários não proteicos ou primários proteicos como quitinases, lectinas, defensina, tioninas, proteínas de transferências de lipídios (LTPs), inibidores de proteinases (serínicas e cisteínicas), entre outras (PEREIRA, 2005).

Os inibidores de proteases (IPs) são especialmente conhecidos no processo de defesa das plantas em resposta ao ataque dos insetos por sua ação sobre as proteases digestivas dos mesmos. Ao serem ingeridos, os IPs inibem as atividades das enzimas proteolíticas, no intestino médio dos insetos, ocasionando desnutrição e conseqüentemente redução do desenvolvimento larval, podendo até levar a morte dependendo dos níveis de expressão dos inibidores. Com isso, se torna importante investigar seu potencial como ferramenta na obtenção de plantas resistentes a pragas (MOSOLOV e VALUEVA et al., 2008). Os IPs são aqueles que afetam a atividade de serino-proteases, cisteínoproteases, proteases aspárticas e metaloproteases, que são os quatro grupos aos quais pertencem as enzimas proteolíticas (SOUSA, 2006). Os inibidores de tripsina, concentra o maior número de pesquisas no assunto, sendo as famílias Solanaceae e Leguminosae as mais investigadas quanto a esse aspecto (HUMA e FAZILI, 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

O amendoim é uma das espécies que possui níveis variados de IPs em suas sementes, cuja expressão é genótipo-dependente. A justificativa para tamanho interesse na prospecção de genótipos resistentes a pragas de grãos armazenados, nos programas de melhoramento genético é devido ao seu impacto econômico e potencial exploração da variabilidade genética existente nas espécies cultivadas, além da possibilidade dessas características serem herdáveis, podendo serem repassadas, via cruzamento, entre genótipo com altos teores de IPs (SANTOS, 2011).

Neste sentido é evidente a importância de investigar a presença de inibidores de tripsina com enfoque na cultura do amendoim e que seja determinado o potencial de inibição contra as enzimas digestivas de *Alphitobius diaperinus* e outros insetos de interesse agrônômico.

1.1. OBJETIVOS

Geral

Detectar a presença de inibidores de tripsina em genótipos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e estimar o potencial de inibição contra as enzimas digestivas de *A. diaperinus* e outros insetos de interesse agronômico.

Específicos

- ❖ Identificar a presença de inibidores de tripsina em sementes de 11 genótipos de amendoim.
- ❖ Estimar a atividade inibitória *in vitro* sobre enzimas digestivas do *A. diaperinus* e outros insetos de interesse agronômico.
- ❖ Realizar bioensaios entomológicos com os genótipos de maior capacidade inibitória e *A. diaperinus*.
- ❖ Caracterizar o inibidor quanto à estabilidade a agentes desnaturantes (pH e temperatura) com tripsina bovina e tripsina do trato digestivo de *A. diaperinus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos gerais e importância da cultura

O amendoim é uma leguminosa herbácea que apresenta uma peculiaridade intrínseca a seu gênero que é a geocarpia. As espécies possuem uma estrutura reprodutiva, denominada de ginóforo, que conduz o fruto fertilizado ao solo (Figura 1). Após o desenvolvimento, o fruto maduro gerará uma vagem, que conterà entre 2 a 6 sementes, de cores diferentes, de acordo com sua herança (SANTOS et al., 2006) (Figura 1).



Figura 1. Detalhe da geocarpia do amendoim, representada por vagens ligadas a ginóforos (esquerda) e padrão de coloração das sementes comerciais do amendoim (direita). (Foto: Roseane Santos e Sérgio Cobel)

Pertencente a família *Leguminosae*, subfamília *Papilionidae*, gênero *Arachis*, o amendoim é uma dicotiledônea, herbácea com ciclo anual indeterminado (SANTOS et al., 2006).

É originário da América do Sul, do sudeste da Bolívia e noroeste da Argentina com registros de *A. ipaensis* e *A. duranensis* como seus possíveis ancestrais (FÁVERO et al., 2006).

A espécie se subdivide em duas subespécies, *A. hypogaea* L. subespécie *hypogaea* e *A. hypogaea* subespécie *fastigiata* (Graciano, 2009). A subespécie *hypogaea*, originada do sudeste da Bolívia e *A. hypogaea* subespécie *fastigiata*, do Peru. Segundo Valls e Simpson (2005), o Brasil se destaca como um grande centro de diversidade genética desta oleaginosa, dentre as 81 espécies de *Arachis*, 64 ocorre no Brasil e 48 são endêmicas do território brasileiro.

O amendoim é uma planta alotetraplóide, que se reproduz quase exclusivamente por autogamia (SANTOS, 2000), herbácea, ereta ou prostrada, anual, com ciclo entre 90 e 160 dias, atingindo altura da haste principal entre 50 a 60 cm. Desenvolve, logo após a germinação, um ramo principal que se origina da gema apical do epicótilo e dois ramos laterais originados a partir das gemas axilares aos cotilédones. Cerca de 30 dias após a emergência observa-se o início da ramificação alternada ou sequencial (NOGUEIRA e TÁVORA, 2005).

Atualmente, o amendoim é a quarta maior cultura de oleaginosa no mundo sendo cultivada em mais de 100 países com uma produção de 35,5 milhões de toneladas, perdendo apenas para soja, algodão e canola (CONAB, 2012). A cultura está predominante no continente americano, no Brasil, Paraguai, Argentina, Bolívia, Uruguai e principalmente no continente asiático.

A produção nacional de amendoim esperada para safra de 2012, alcançou cerca de 296 mil toneladas, 31% superior ao colhido na safra anterior. O estado de São Paulo assume a liderança, com 85% da produção e o Nordeste com 4,7% (CONAB, 2012; IBGE, 2012). A produção nacional visa atender principalmente o mercado de consumo *in natura* com cultivares de grãos médios e sementes de película vermelha.

O amendoim pode ser consumido de diversas formas, destacando-se os alimentos semiprocessados e processados. Um dos mais presentes na alimentação do brasileiro é o confeito de amendoim tipo japonês (MACHADO, 2006; SERQUIZ, 2012).

Na região Nordeste essa cultura possui condições edafoclimáticas favoráveis para obtenção de vagens de amendoim de boa qualidade, tanto em nível fitossanitário quanto sensorial. O cultivo emprega mão-de-obra familiar ou contratada, para realizar todas as atividades, desde o plantio até a colheita. Praticamente não são utilizados insumos, tanto em cultivo solteiro quanto consorciado com milho ou feijão (SUASSUNA et al., 2006). Cerca de 12% dos agricultores usam sementes de amendoim selecionadas, mas a grande maioria planta tipos locais, adquiridos em feiras livres ou em armazéns, cujos genótipos além de apresentarem

baixo rendimento cultural, são geralmente vulneráveis aos ataques de pragas e/ou doenças (SANTOS et al., 2006).

Os programas de melhoramento de amendoim desenvolvidos pelas instituições de pesquisa brasileiras levam em consideração a exploração da variabilidade existente entre as subespécies, focalizando em caracteres agrônômicos associados a fatores bióticos e abióticos, sendo os mais expressivos a adaptação ambiental e tolerância a pragas e doenças da lavoura (SANTOS et al., 2011).

2. 2. Proteases e inibidores de proteases

2.2.1. Proteases

Protease é a denominação geral para todas as proteínas com atividade proteolítica. As proteases são classificadas em endopeptidases, quando hidrolisam ligações peptídicas interna, e exopeptidases, quando hidrolisam ligações N-terminais ou C-terminais. As endopeptidases são também denominadas proteinases (RYAN et al., 1990).

De acordo com a União Internacional de Bioquímica, as proteinases são classificadas em quatro grandes classes: serínicas, cisteínicas, aspárticas e metalo–proteinases, treonina e proteases de ácido glutâmico (Tabela 1) (RITONJA et al., 1990; BAUDYS et al., 1991).

Em plantas, as proteases participam da proteção de fluidos e tecidos contra degradação pela atividade proteolítica (RYAN, 1990; RICHARDSON, 1991, WALKER et al., 1997), regulação da fotossíntese (ESTELLE, 2001; GOMES, 2004), regulação da expressão gênica (ADAAM, 2000), além da defesa da planta contra pragas e patógenos.

Em insetos, um dos principais mecanismos de ação das proteases está relacionado com o processo digestivo das proteínas adquiridas na dieta animal. Os inibidores de proteases constituem uma das barreiras químicas de defesa da planta e atuam no intestino dos insetos herbívoros inibindo a digestão de proteínas da planta ou em função da super produção de enzimas digestivas, reduzindo a disponibilidade dos aminoácidos essenciais para a produção de outras proteínas (NADALLINE, 2007).

2.2.2. Inibidores de protease vegetal

Inibidores de protease são proteínas ou peptídeos amplamente encontrados em animais,

vegetais e microorganismos capazes de inibir a atividade catalítica de enzimas proteolíticas (LINGARAJU e GOWDA, 2008). Nas plantas, os inibidores vão se concentrar principalmente nos órgãos reprodutivos e de reserva, tais como sementes e tubérculos (RYAN, 1990; CRUZ, 2008); no entanto, já foram encontrados em polpa de frutas, folhas, frutos, raízes e vagens (ARAÚJO et al., 2004) e podem apresentar diferentes funções como: proteínas de reserva, agente regulador de proteases endógenas, que são importantes para proteger fluidos e tecidos da degradação pela atividade proteolítica (RYAN, 1990; RICHARDSON, 1991; WALKER et al., 1997), além da defesa direta ou indireta contra os insetos, constitutiva ou induzida, inibindo as proteases nos intestinos de suas pragas (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002; LAWRENCE e KOUNDAL, 2002).

Nas plantas, sabe-se que as angiospermas e dicotiledôneas englobam o maior número de espécies contendo os inibidores de proteases, merecendo enfoque as famílias Leguminosae, sendo representada pelo feijão, soja, amendoim e ervilha (XAVIER-FILHO, 1996; MACEDO et al., 2000), e a família Solanaceae, representada pela batata, tomate e tabaco (CRUZ, 2008). Em relação as monocotiledôneas os inibidores estão mais amplamente distribuídos na família Poaceae, tendo como representantes arroz, milho, trigo e centeio (OLIVEIRA, 2007).

Os inibidores de proteases de plantas são, primeiramente, classificados de acordo com a classe mecânica das enzimas que eles inibem (Tabela 1). Dessa forma, são estabelecidas classes de inibidores de proteases: Inibidores de proteinases serínicas, cisteínicas, aspárticas, metalo-proteinases e mais recentemente treonina proteases (LUCENA, 2010), sendo os inibidores de proteinases serínicas os mais estudados (SANTOS et al., 2011). Em cada classe foram reconhecidas famílias de inibidores, baseando-se nas características de homologia da estrutura primária, massa molecular, conteúdo de cisteína e pontes de dissulfeto, sendo a classe de inibidores de proteases serínicas subdividida em sete famílias (RYAN, 1990; RICHARDSON, 1997; SERQUIZ, 2012).

Tabela 1. Classificação dos inibidores de proteinases vegetais.

Proteases	Classes de inibidores	Família de inibidores
		Bowman-Birk Kunitz Batata I Batata II Superfamília de Cereais Taumatina Ragi I-2/milho
Serínicas	Inibidores de proteinases serínicas	
Cisteínicas	Inibidores de proteinases cisteínicas	Fitocistatinas
Aspárticas	Inibidores de proteinases aspárticas	Inibidores de proteinases aspárticas
Metallo-proteinases	Inibidores de metalo-proteinases	Inibidores de carboxipeptidases A e B
Treonina	Inibidores de proteinases treonina	Inibidores de proteinases treonina

Fonte: Ryan (1990) e Lucena (2010)

2.2.3. Inibidores de proteases serínicas

Inibidores de proteases serínicas ou serino-proteases são amplamente distribuídos no reino vegetal e já foram descritos em muitas espécies de plantas. Há um grande número de inibidores de serino-proteases conhecidos e parcialmente caracterizados, uma vez que é a classe de inibidores mais amplamente estudada (HAQ et al., 2004; SERQUIZ, 2012).

Dentre todas 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).

O padrão estrutural da maioria dos inibidores da família Kunitz é representado por uma ou duas cadeias polipeptídicas, em geral, com apenas um sítio reativo, e massa molecular entre 18 e 24 kDa, correspondendo a aproximadamente 180 resíduos de aminoácidos, geralmente com quatro resíduos de cisteína que formam duas pontes dissulfeto, que proporcionam estabilidade a estrutura protéica (SVENDNSEN et al., 1984; KIM e LAMBOOY, 1985; RICHARDSON, 1991; CRUZ, 2008).

Inibidores da família Bowman-Birk é mais estável (termoestável), apresenta massa

molecular entre 8 e 10 kDa e capacidade para inibir a tripsina e a quimotripsina em sítios de ligação independentes (SILVA e SILVA, 2000; FRANCIS et al., 2001; CARLINI e GROSSI DE SÁ, 2002; SILVA, 2012) Apresenta conteúdo de cisteína (geralmente 14, formando 7 pontes dissulfeto) e ainda dois sítios reativos (BHATTACHARYYA e BABU, 2009).

Recentemente, a presença de inibidores em outras famílias botânicas, tais como a Cactaceae (Angiospermas), além de relatos da ocorrência destes em famílias de Gimnospermas (Cycadales, Coniferales e Ginkgoales) tem sido registrado (SAWANO et al., 2008; TORRES-CASTILLO et al., 2009; OLIVEIRA, 2011).

Os efeitos do IP sobre o desenvolvimento, a sobrevivência e a fecundidade dos insetos tem sido demonstrado em vários estudos (LAWRENCE e KOUNDAL, 2002; PRADO, 2010). Alguns trabalhos revelaram que a indução de inibidores de protases em folhas de tomate reduz o crescimento de larvas de cartucho da beterraba (*Spodoptera exigua*), quando comparadas com folhas sem inibidor (BRODWAY et al., 1986, CRUZ, 2008). O inibidor de tripsina de soja é efetivo contra enzimas do besouro da farinha, *Tenebrio molitor* (APPLEBAUM et al., 1985). De acordo com Macedo (2000), a presença de inibidores pode retardar o desenvolvimento larval quando esses são incorporados em ensaio *in vivo*, utilizando dietas artificiais.

2.3. Interação planta-praga

As plantas encontram-se frequentemente expostas a diversos estresses abióticos e bióticos que conseqüentemente comprometem o seu crescimento, desenvolvimento e produção. Estes estresses desencadeiam diversas rotas de defesas naturais, em uma delas, a sistêmica adquirida, as plantas induzem a expressão de genes de defesas contra a invasão de um determinado patógeno ou praga (RESENDE et al., 2007). Neste contexto, várias proteínas já foram identificadas quanto as suas atuações no mecanismo de defesa de plantas (ALVES, 2002), destacando-se: os inibidores proteicos (α -amilases e proteinases), quitinase, proteínas inativadoras de ribossomo (RIPs), arcelinas, vicilinas, leguminas, lectinas, defensinas, tioninas, proteínas de transferências de lipídeos (LTPs), sendo os inibidores de proteinases serínicas e cisteínicas os que apresentam melhor caracterização (BODE e HUBER, 2000; FRANCO et al., 2000; SALES et al., 2000; SANTANU et al., 2001; WIJAYA et al., 2000).

Ao serem ingeridos, os IPs inibem as atividades das enzimas proteolíticas, no intestino médio dos insetos, podendo induzir a hiperprodução das enzimas digestivas, o que resulta em comprometimento do desenvolvimento do inseto, pois grande parte dos aminoácidos essenciais

deixa de ser utilizado na síntese protéica para ser gasto na produção de enzimas digestivas (OLIVEIRA et al., 2009). Além disso, o resultado da inativação das proteases intestinais tem efeito direto na eficiência digestiva bem como sobre a disponibilidade e a absorção de nutrientes, podendo os insetos tornarem-se fracos, com crescimento e desenvolvimento reduzidos (redução de fecundidade, decréscimo de massa corporal, deformação e morte do inseto) (GATEHOUSE et al., 1979; MACEDO et al., 2002).

O efeito inseticida dos inibidores de proteases já foi comprovado de diversas maneiras: incorporados na dieta dos insetos (POMPERMAYER et al., 2003; PILON et al., 2006), pulverizados diretamente sobre a planta (MARINHO, 2006) e expresso em plantas transgênicas (STEPPUHN, 2007). Por um longo tempo pensava-se que, semelhantes aos vertebrados, os insetos continham apenas proteinases serínicas do tipo tripsina, quimotripsina e aspártica do tipo pepsina, pois a maioria das pesquisas foram realizadas com insetos da ordem Lepidóptera e Diptera. Tais insetos geralmente usam proteinases serínicas para a digestão das proteínas, possuindo no intestino médio um pH alcalino variando entre 8 a 11,5, ideal para atividade dessa classe de enzimas.

Entretanto, estudos evidenciaram que outras classes de insetos utilizam proteinases cisteínicas e aspártica para degradar as proteínas da dieta. Dentre esses estão os insetos da ordem Coleóptera (larvas e adultos) os quais possuem a porção anterior do intestino médio na faixa de pH ácido, entre 5 e 7, enquanto a parte posterior é neutra ou alcalina (TERRA e FERREIRA, 1994; LOPES et al., 2006). Neste sentido, insetos da ordem coleóptera, viabilizam também a presença marcante de enzimas proteolíticas como tripsina, quimotripsina e elastase (TERRA, 1994; OLIVEIRA 2007), destacando-se o *Tenebrio molitor* (TERRA e CHRISTOFOLETTI, 1996), *Rhizoperta dominica* (ZHU e BARKER, 1999), *A. grandis* (OLIVEIRA NETO et al., 2004).

Assim sendo, o potencial inseticida dos inibidores de proteases tem sido demonstrado em diversos estudos quando esses são ingeridos em dieta natural ou artificial, sugerindo que esses compostos podem ser efetivos no controle de várias ordens de insetos (PRADO, 2010).

2.4. Pragas de grãos armazenados: *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae)

Dentre as pragas de grãos armazenados de amendoim destacam-se: *Corcyra cephalonica* (Staint) (Lepidoptera: Pyralidae), *Tribolium castaneum* (Herbest), (Coleoptera Tenebrionidae);

Alphitobius diaperinus (Panzer) (Coleóptera: Tenebrionidae), *Lasioderma serricorne* (Fabricio) (Coleoptera: Anobidae), *Oryzaephilus surinamensis* (Lineu, 1758), *Laemophloeus minutus* (Oliver) (Coleoptera: Cuculidae) (AZEVEDO et al., 2007; AZEVEDO, 2008).

O *A. diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) é uma espécie cosmopolita, de origem tropical da África sub-saariana, praga secundária de grãos, que se alimenta também de produtos de cereais e de ração humana. De acordo com Spilman (1991) e Ferreira (2011), esses insetos infestam farinhas e grãos, especialmente em unidades de armazenamento de grãos mal condicionados, e tem sido encontrado em trigo, cevada, arroz, aveia, soja, feijão e amendoim. A presença desses insetos pode indicar alta umidade do produto (AZEVEDO et al., 2010).

O ciclo de vida completo desse inseto dura de 50 a 70 dias. A eclosão dos ovos ocorre em 2 a 13 dias, em temperaturas entre 18 °C e 40 °C. O período larval dura entre 35 e 65 dias, variando de 6 a 11 estágios. A seguir, a fase de pupa, dura entre 4 e 17 dias. Na fase adulta o inseto adquire coloração que varia de castanha a preta. Os insetos adultos podem viver até 400 dias dependendo das condições ambientais. A fêmea tem potencial para ovopositar mais de 2000 ovos, escolhendo o local ideal para o desenvolvimento da larva. Nas temperaturas entre 35 °C e 38 °C, todos os estágios se desenvolvem mais rapidamente e os índices de sobrevivência também são maiores (OURO FINO, 2000). Umidades entre 15% e 20% são mais propícias ao desenvolvimento deste inseto (AZEVEDO et al., 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Sementes de Amendoim

Sementes de 11 genótipos de Amendoim (*Arachis hypogea L.*) (Tabela 2) foram cedidas pelo Programa de melhoramento de Amendoim da Embrapa Algodão, os quais possuem descritores discriminatórios quanto aos aspectos morfológicos e agronômicos.

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

Genótipo	Genealogia	Origem	HC	Ciclo (dias)	TS
BRS Pérola Branca	Cultivar	PB, Brasil	rasteiro copa densa	115	G
CNPA 270 AM	Linhagem (Manfredi 407 x Manfredi 424)	PB, Brasil	ereto	90	M
CNPA 283 AM	Linhagem(Manfredi x Florruner)	PB, Brasil	ereto	90	M
Florruner	Cultivar	EUA	rasteiro	120	G
IAC Caiapó	Cultivar	SP, Brasil	rasteiro	130	G
CNPA 271 AM	Linhagem (Manfredi 407 x Manfredi 424)	PB, Brasil	ereto	90	M
BRS Havana	Cultivar	PB, Brasil	ereto	90	M

Tabela 2, cont.

L7 Bege	Linhagem (IAC Tupã x Senegal 55437)	PB, Brasil	ereto	90	G
CNPA 280 M	Linhagem(Manfredi 407 x Florryner	PB, Brasil	ereto	90	M
L GoPE – 06	<i>Land race</i>	PB, Brasil	Rasteiro	120	EG
BRS 151- L7	Cultivar (IAC TupaxSenegal 55437)	Brasil	Ereta	85-87	G

TS: tamanho da semente - M: média, G: grande e EG: extra grande; HC: Hábito de Crescimento.

3.2. Insetos

As populações de insetos de: *A. diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae), *Tenebrio molitor* (Linnaeus), (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) foram obtidas a partir de criações mantidas no Laboratório de Entomologia e Laboratório de Biologia de Insetos, da Embrapa Algodão.



Figura 2. Adulto de *A. diaperinus* em grãos.
(Foto: Patrícia de Lima Martins).

3.3. Preparação do extrato proteico de sementes de amendoim

Para obtenção do extrato bruto protéico foram triturados 10 g de sementes de cada genótipo de amendoim em multiprocessador, com posterior delipidação com 20 mL de acetona PA e 20 mL de hexano PA, seguindo metodologia descrita por Bland e Lax (2000); em seguida, foram pesados 100 mg da amostra delipidada e acrescentado 1 mL do tampão Tris-HCl 50 mol.L⁻¹, pH 8,5, incubado sob agitação durante a noite à 4 °C. O extrato foi centrifugado a 12.000 x g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante coletado denominado extrato bruto (EB).

O EB foi fracionado por meio da precipitação sequencial com sulfato de amônio nas faixas de saturação de 0-30%, 30-60%, e 60-90% e denominadas F1, F2 e F3, respectivamente. Na sequência, cada fração foi mantida por cerca de 12 h a 8 °C para solubilização e centrifugada a 12.000 x g por 30 min a 4 °C para obtenção das proteínas precipitadas. Os precipitados foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 50 mol.L⁻¹ pH 8,5, dialisados contra o mesmo tampão e mantidos a -20 °C até a realização dos ensaios. Seguiu-se a metodologia baseada em Green and Hughes (1955).

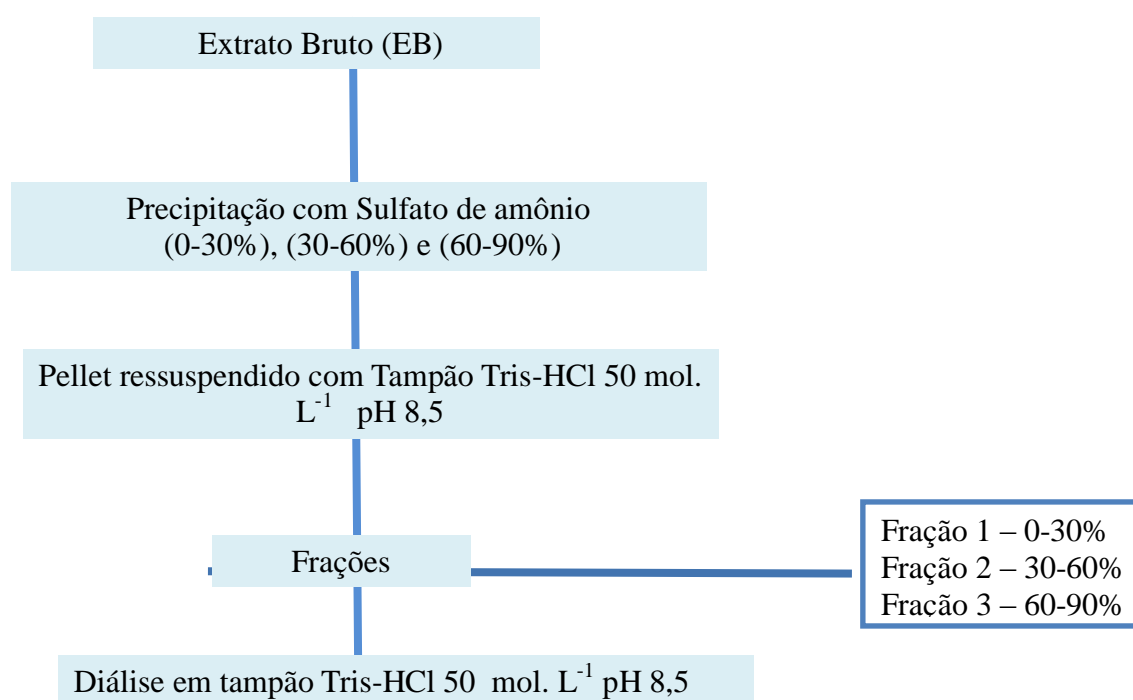


Figura 3. Esquema da precipitação do extrato bruto de amendoim genótipo CNPA 280 AM com sulfato de amônio e concentrações 0-30%, 30-60% e 60-90%.

3.4. Determinação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão analítico nas concentrações de 1,25; 2,5; 3,75; 5,0; 6,25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. As medidas de absorbância das amostras padrões foi 110 a 380 nm. A leitura de quantificação proteica foi realizada em espectrofotômetro (marca Femto espectrofotômetro 700S) no comprimento de onda 595 nm.

3.5. Preparação da solução usada como substrato

Azocaseína a 1,5% (m/v) foi preparada em tampão Tris-HCL 50 mol.L^{-1} , pH 8,5. A solução foi mantida a -20°C até sua utilização.

3.6. Determinação da atividade ótima da tripsina bovina e de *A. diaperinus*

O pH ótimo para determinar a atividade da tripsina bovina e de *A. diaperinus* foi realizado pelo uso de diferentes soluções tamponantes. Os tampões utilizados foram tampão Fosfato de sódio 50 mol.L^{-1} pH 6,5 e 7,5 e Tris-HCL 50 mol.L^{-1} para pH 8,5, 9,5 e 10,5.

3.7. Preparo do homogenato intestinal de insetos

Larvas em último instar dos diferentes insetos alimentando-se ativamente foram dissecadas, com o auxílio de pinças e lupa estereoscópica, para a remoção do intestino, que foi imediatamente imerso em tampão fosfato de sódio 50 mol.L^{-1} pH 7,0 e mantido a 4°C . Em seguida, os intestinos foram macerados em microtubo com auxílio de um pistilo. O homogenato foi centrifugado a $12.000 \times g$ durante 20 minutos a 4°C e, posteriormente, coletado o sobrenadante, o qual foi utilizado nos ensaios de atividade enzimática e inibitória. Seguiu metodologia estabelecida por Terra et al. (1977). Posteriormente o homogenato foi quantificado pelo método de Bradford (1976) e diluído a $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ e a leitura no ensaio padronizado para cerca de 0.100 de absorbância.

3.8. Bioensaio com *A. diaperinus*

Sementes de cinco genótipos de amendoim (BRS Havana, Florruner, CNPA 270 AM, CNPA 280 AM e BRS 151 L7), selecionados previamente em ensaios bioquímicos por apresentarem maior percentual de inibição para tripsina bovina e o BRS 151 L7 com menor inibição, foram pesadas em amostras de 50 g e colocadas em recipientes plásticos (8,0 cm de altura x 11,0 cm de diâmetro) telados e etiquetados. Uma testemunha com farelo de milho foi utilizada. O delineamento adotado foi inteiramente casualizado com 4 repetições.

As sementes foram infestadas com 20 insetos adultos sexados de *A. diaperinus* e mantidas a temperatura e umidade relativa ambiente. Para a avaliação da resistência dos genótipos, análises da reprodução dos insetos foram realizadas a partir da contagem do número de larvas após 53 e 90 dias seguindo metodologia estabelecida por Azevedo et al. (2010).

3.9. Análises estatísticas

Os dados foram submetidos a análise de variância pelo teste de Friedman ($p \leq 0,05$) e a comparação de médias foi realizada pelo teste de Student Newman Keuls ($p \leq 0,05$).

3.10. Determinação da atividade antitriptica

A atividade inibitória foi determinada incubando-se alíquotas de 1 μg de proteína do homogenato intestinal e 5 μg de proteína do inibidor, foram acondicionadas a 69 μL de tampão Tris-HCl 50 mol.L^{-1} pH 8,5 e 100 μL da solução do substrato de azocaseína a 1,5% (m/v). A reação foi pré-incubada a 37 °C por 20 minutos. No final desse tempo foram adicionados 100 μL da azocaseína nos negativos da atividade e a reação foi parada com 150 μL de solução de ácido tricloracético (TCA 20%). Após 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos. Alíquotas de 250 μL do sobrenadante foram coletadas e adicionados a 250 μL de NaOH 2 mol.L^{-1} e a absorbância medida a 440 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata autêntica. Seguiu-se a metodologia estabelecida por Kakade et al. (1969).

3.11. Estabilidade térmica do inibidor

A F3 obtida da precipitação com Sulfato de amônio apresentou a maior atividade antitriptica, sendo a escolhida para avaliação de estabilidade térmica. Seguiu-se a metodologia descrita por Gomes et al. (2005), na qual alíquotas de 50 μL do inibidor foram incubadas por 30 minutos a 40 °C, 60 °C, 80 °C e 100 °C. Após incubação, as amostras foram resfriadas a 4 °C e então alíquotas contendo 5 μg do inibidor foram utilizadas no ensaio de atividade inibitória sobre a tripsina e sobre o homogenato de inseto como tratado no item 3.10. Os ensaios foram realizados em triplicata e provas em branco foram feitas.

3.12. Estabilidade do inibidor em diferentes pHs

Para avaliar a estabilidade do inibidor da F3 em diferentes pHs, seguiu-se a metodologia descrita por Gomes et al. (2005), com algumas modificações. Alíquotas de 100 μL do inibidor foram dialisadas por 16 horas contra os seguintes tampões: fosfato de sódio 100 mol.L^{-1} pH 5-8; Tris-HCL 100 mol.L^{-1} para pH 9-11. Após 1 h de incubação a 37 °C nos referidos tampões, as amostras foram dialisadas por 4 h, em Tris-HCL 50 mol.L^{-1} pH 8,5, para ajuste ao pH do ensaio. Os ensaios de atividade inibitória para tripsina foram feitos em triplicata utilizando-se 5 μL do inibidor como descritos no item 3.10. Provas em branco também foram realizadas.

3.13. Eletroforese em Gel de poliacrilamida (SDS–PAGE)

Foram utilizadas placas de vidro de dimensões 10 x 14 cm, espaçadores de 0,75 mm e soluções estoque de acrilamida/bisacrilamida (30%/ 0,8%, m/v) dissolvidas em água destilada em volume para 100 mL. O gel de separação foi preparado com uma solução de 12%, contendo: 15 mL de água destilada, 11,4 mL de tampão Tris-HCL 1,5 mol.L^{-1} pH 8,8, 450 μL de SDS 10%, 18 mL de solução estoque de acrilamida/bisacrilamida, 225 μL de persulfato de amônio e 22,5 μL de Temed. Às frações F1, F2, F3 e EB com 4,0 μg de proteínas foram adicionadas tampão de amostra constituído de Tris-HCL 62,5 mol.L^{-1} pH 6,8, 150 μL de SDS 2%, glicerol 10% (v/v) e 0,01% de azul de bromofenol. O tampão de corrida continha glicina 960 mol.L^{-1} e SDS 0,5%. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 30 mA por aproximadamente 6 horas seguindo a metodologia estabelecida por Laemmli (1970).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Detecção da atividade inibitória para tripsina bovina em extratos proteicos de amendoim

Nos ensaios de inibição com extrato proteico dos onze genótipos de amendoim investigados, usando tripsina bovina como substrato, observou-se inibição em todas as amostras, variando entre 70% a 94% (Tabela 3), destacando-se o CNPA 280 AM, Florruner, CNPA 270 AM e BRS Havana com taxa de inibição superior a 90%.

Tabela 3. Atividade inibitória para tripsina em EB de Amendoim

Genótipo	Inibição (%)	UI*
CNPA 280 AM	94,2	11,7
Florruner	92,6	11,5
CNPA 270 AM	92,2	11,6
BRS Havana	90,3	11,2
CNPA 271 AM	89,7	11,1
CNPA 283 AM	89,7	11,2
IAC Caiapó	88,2	11,0
L7 Bege	79,3	9,0
BRS Pérola Branca	78,5	10,1
LGoPE -06	78,0	9,8
BRS 151 L7	70,7	8,6

*Uma unidade de inibição (UI) foi definida como a quantidade de inibidor que diminui a atividade da enzima em 0,01 de absorbância a 410 nm.

A atividade inibitória para tripsina em extrato bruto de amendoim apresentou níveis variados, corroborando com este resultado Santos (2005) relata que o amendoim (*Arachis hypogea L*) é uma das espécies de leguminosas que possui níveis variados de inibidores de tripsina em suas sementes cuja expressão é genótipo-dependente.

Há ainda relatos na literatura da presença de inibidores proteicos em sementes de várias outras classes de plantas, incluindo soja (*Glycine max*) (KUNITZ, 1947), uva (*Vitis vinifera*) (LI e GRAY, 2005), feijão-fava (*Phaseolus lunatus*) (TAN e STEVENS, 1971), amendoim (*Arachis hypogoea*) (SUZUKI et al., 1987), pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) (OLIVEIRA et al., 2002); eucalipto (*Eucalyptus urophylla*) (TREMACOLDI e PASCHOLATI, 2002) e gergelim (*S. indicum*) (EL-BRAMAWY, 2011).

4.2. Atividade inibitória dos genótipos de amendoim com o homogenato intestinal de *A. diaperinus*

Cinco genótipos de amendoim foram selecionados baseado no ensaio anterior, os que apresentaram maior percentual de inibição (CNPA 280 AM, Florruner, CNPA 270 AM e BRS Havana) e o BRS 151 L7 cujo percentual de inibição foi menor, visando observar o potencial de inibição no homogenato intestinal de *A. diaperinus*. Observou-se inibição entre 7,5% e 18% sugerindo diferentes compatibilidades estruturais entre os sítios reativos dos inibidores com o sítio ativo de proteinases serínicas presentes no homogenato intestinal de larvas de *A. diaperinus*.

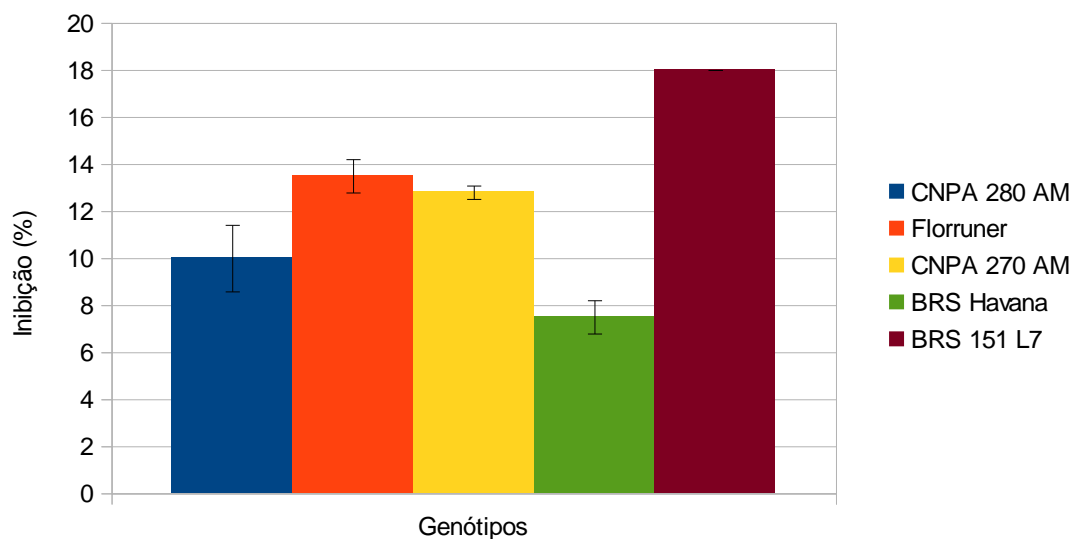


Figura 4, cont.: Ensaio de inibição com os genótipos de amendoim BRS 151 L7, BRS Havana, CNPA 270 AM, CNPA 280 AM e Florruner com homogenato intestinal de *A. diaperinus*. O extrato proteico foi pré-incubado com homogenato intestinal por 20 min., a 37 °C. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína a 1,5% (m/v) como substrato. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

A partir da análise de inibição *in vitro* de enzimas presentes no trato digestivo de insetos pode ser avaliado o potencial que as proteínas exercem sobre o desenvolvimento de larvas de insetos (GOMES, 2004; PRADO, 2010). Neste sentido outros trabalhos mostram a atividade inibitória de sementes de *Crotalaria pallida* contra extratos intestinais de diversos insetos pragas como *C. maculatus* (gorgulho do feijão de corda) com 74% de inibição e *P. interpunctela* (praga generalista) com 66% de inibição (GOMES, 2004).

Diante dos resultados, o genótipo BRS 151-L7 destacou-se mais eficiente, dentre os outros genótipos testados com o homogenato de inseto do *A. diaperinus*, devido à capacidade de inibir a tripsina do trato digestório do inseto em estudo.

Os insetos *A. diaperinus* por serem da ordem coleóptera possuem as proteases digestivas pertencentes à classe macanística de proteases aspárticas e cisteínicas (XAVIER-FILHO et al., 1996; OLIVEIRA, 2007). No entanto, no homogenato intestinal de larvas de outros insetos da ordem coleóptera, *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*, foi detectada a presença de proteinases serínicas envolvidas na digestão de proteínas da dieta, sendo essa atividade em *Z. subfasciatus* duas vezes mais ativa em comparação com essa mesma atividade no homogenato intestinal de *C. maculatus* (SILVA et al., 2000). A presença de proteinases serínicas no homogenato intestinal desses coleópteros indica que essa atividade pode ser efetivamente suprimida por inibidores de proteases serínicas de plantas (MACEDO, 2002; GOMES et al., 2005).

4.3. Bioensaio de alimentação de adultos de *A. diaperinus* com duas fontes de dieta

Com o intuito de comprovar a influencia da dieta com amendoim sobre a oviposição de *A. diaperinus*, sementes de cinco genótipos de amendoim (BRS Havana, Florruner, CNPA 280 AM, CNPA 270 AM, BRS 151 L7) foram fornecidas aos insetos adultos, tendo a dieta à base de milho como controle positivo. Foi observado, na análise de variância, diferença estatística significativa para o período de incubação e entre as dietas utilizadas, contudo, não houve

resposta na interação Período de incubação x Dieta, indicando que os efeitos das dietas sobre o período em que os insetos foram incubados são independentes (Tabela 4).

Tabela 4: Síntese da análise de variância para número de larvas de *A. diaperinus* eclodidas após 2 períodos de incubação em dietas *in natura* de amendoim e milho.

Fonte de variação	GL	QM	F
Período de incubação (P)	1	91,16	24,41**
Repetição do período	6	4,97	1,33
Dieta (D)	5	40,91	10,77**
P x D	5	2,71	0,73
Erro	28		

** Significativo a 1% pelo teste Friedman ($p \leq 0,05$).

Na Tabela 5 encontra-se a média do número de larvas obtidas nos diferentes tratamentos em que os adultos de *A. diaperinus* foram submetidos.

Verificou-se que o número de larvas foi 33% mais elevado quando os insetos estiveram incubados até os 53 dias. Sugere-se que este fato possa estar associado ao inibidor ter promovido um efeito negativo no que se refere à reprodução do inseto, ensejando conseqüentemente na diminuição do número de larvas após os 53 dias.

Com relação à dieta, verifica-se que a BRS Havana permitiu a mesma produção de larvas, comparada ao controle, indicando que esta cultivar de amendoim é mais atraente para alimentação e oviposição dos insetos. Entre os cinco genótipos de amendoim testados, não apresentou diferença estatística, porém o genótipo BRS 151 L7 destacou-se com o maior número de larvas. Tais resultados corroboram com os dados obtidos *in vitro*, em que a maior (18%) e menor (7,5%) inibição para tripsina do homogenato intestinal de *A. diaperinus* foram conseguidas com as cultivares BRS 151 L7 e BRS Havana respectivamente.

No aspecto agrícola, esse resultado é de grande relevância no que se refere à possibilidade de redução de perdas de grãos na fase de pós-colheita, uma vez que BRS 151 L7 é uma cultivar precoce, desenvolvida para o semiárido brasileiro, com características agrônômicas de fácil transferibilidade por meio de hibridação (NOGUEIRA et al., 2000; GOMES et al., 2007). Embora não se saiba ainda quantos genes estão relacionados com a resistência a pragas de

grãos armazenados em amendoim, ou os associados a produção de inibidores de proteases em cultivares tolerantes, com base nestes resultados, a utilização da BRS 151 L7 como genitor tolerante pode se constituir como um expressivo recurso genético não apenas para responder as questões ainda indefinidas quanto a genética da tolerância como também como doador desse caráter para formação de novas progênies.

Tabela 5: Número de larvas de *A. diaperinus* eclodidas após 2 períodos de incubação em dietas *in natura* de amendoim e milho.

Tratamentos	Número de larvas
<i>Período de incubação (dias)</i>	
53	9,00a
90	6,08b
<i>Dieta</i>	
BRS 151 L7	5,52b
Florruner	5,89b
CNPA 280 AM	6,34b
CNPA 270 AM	6,51b
BRS Havana	9,39a
Farelo de milho	11,17a
Média	7,47
CV (%)	22,47

Médias com a mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Student-newman-keuls (SNK) a 5% de probabilidade. As médias foram transformadas em raiz quadrada, para efeito de análise estatística.

Diante do exposto, afirma-se que o genótipo BRS 151 L7 é um candidato promissor para posterior uso nos trabalhos de melhoramento do amendoim visando tolerância a pragas de grãos armazenados. Outro trabalho relata a importância desta cultivar para o programa de melhoramento, de acordo com Santos (2000), essa cultivar possui grande potencial produtivo e larga adaptação às condições da região Nordeste.

4.4. Caracterização do inibidor de tripsina do genótipo CNPA 280 AM

4.4.1. Atividade antitriptica do extrato de amendoim e frações protéicas

Baseado no ensaio com tripsina bovina, o genótipo CNPA 280 AM que inibiu a tripsina

em 94%, foi selecionado para caracterização bioquímica. O extrato bruto de proteínas totais de amendoim foi fracionado em três faixas de concentração de sulfato de amônio F1 (0-30%) F2 (30-60%) e F3 (60-90%) e as atividades inibitórias para tripsina bovina e homogenato intestinal de *A. diaperinus* foram avaliadas em cada uma delas. Dentre as frações precipitadas com sulfato de amônio, a F3 apresentou maior atividade anti-tríptica atingindo índice de 91% com tripsina e 38% com homogenato intestinal (Figura 5), correspondendo a 10,9 UI/mg e 1,2 UI/mg, respectivamente.

Na literatura, outros inibidores de amendoim já foram purificados. De acordo com Serquiz (2012), um novo inibidor de tripsina foi identificado e parcialmente purificado da paçoca de amendoim. Após o fracionamento de suas proteínas com sulfato de amônio a fração correspondente a 30-60% denominada F2 de saturação apresentou maior atividade antitriptica, com 18,3 UI/mg de proteína. Comparando a fração 30-60% de CNPA 280 AM precipitada apresentou atividade tríptica com 12,1 UI/mg de proteína.

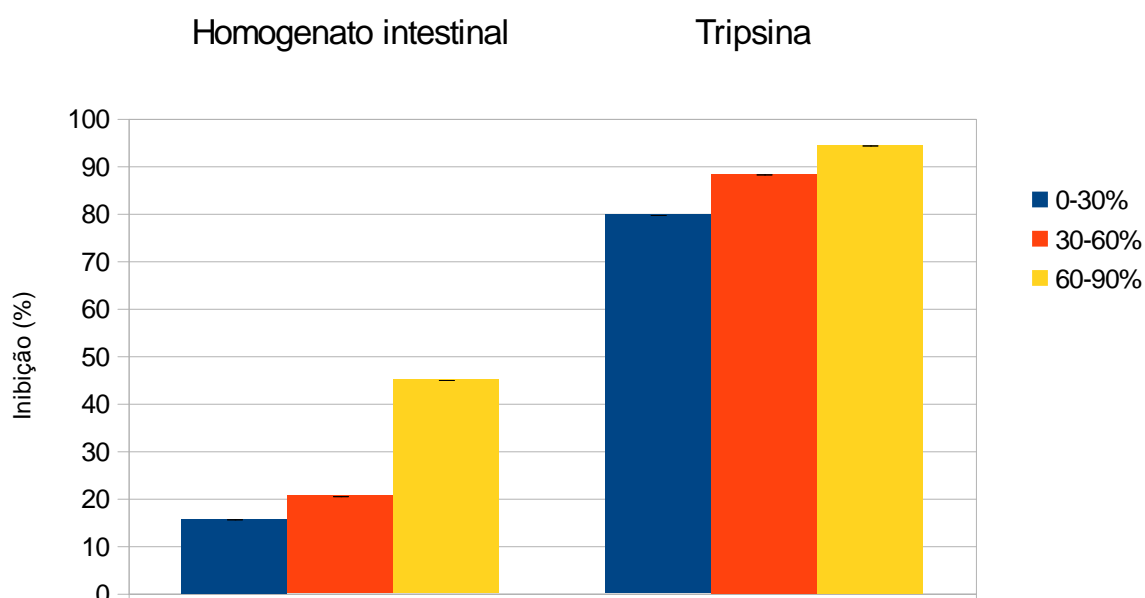


Figura 5. Ensaio de inibição com F1 (0-30%), F2 (30-60%) e F3 (60-90%) de CNPA 280 AM. As frações foram pré-incubadas com homogenato intestinal de *A. diaperinus* ou tripsina bovina por 20 min., a 37 °C. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína a 1,5% (m/v) como substrato. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

A precipitação de proteínas com sulfato de amônio é conhecida por ser útil na concentração de soluções diluídas de proteína e no fracionamento de mistura de proteínas. A precipitação de proteínas pelo gradativo aumento da concentração de sais é um processo muito importante para a separação de misturas complexas de proteínas, uma vez que a concentração de sal necessária para precipitação é diferente para cada proteína. O sulfato de amônio tem sido o sal mais comumente utilizado nos ensaios de precipitação de proteína por algumas de suas características como a alta solubilidade, baixo custo e baixa toxicidade (LIMA, 2008).

Desse modo o fracionamento com sulfato de amônio é bastante eficiente para separar as proteínas, demonstra isso o trabalho de Serquiz (2012) que conseguiu identificar um novo inibidor de tripsina e parcialmente purificar da paçoca de amendoim utilizando essa metodologia.

4.4.2. Eletroforese em Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Tanto o EB, quanto as frações F1, F2 e F3 foram analisadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE o qual revelou a presença de várias bandas proteicas, contudo há bandas diferenciadas em cada fração, mostrando que houve uma separação proteica. Na F3 pode-se observar duas bandas na altura de 12 e 15 kDa aproximadamente, que se diferencia das demais frações, sugerindo que pode ser o inibidor em questão (Figura 6). Com o fracionamento, na F3 houve uma maior concentração das duas bandas proteicas nas alturas 12 kDa e 15 kDa o que sugere ser o inibidor de interesse.

De acordo com outros estudos um grande número de proteínas envolvidas em processo de defesa de plantas foi isolado, purificado e caracterizado, destacando-se entre elas as proteínas de baixo peso molecular como inibidores de proteinases e amilases (GOMES et al., 2005; ARAÚJO et al., 2004; CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002; OLIVEIRA, 2007). Existem ainda relatos de outros inibidores de tripsina do amendoim que já foram purificados e contém baixo peso molecular (NORIOKA et al., 1982; DODO et al., 2004).

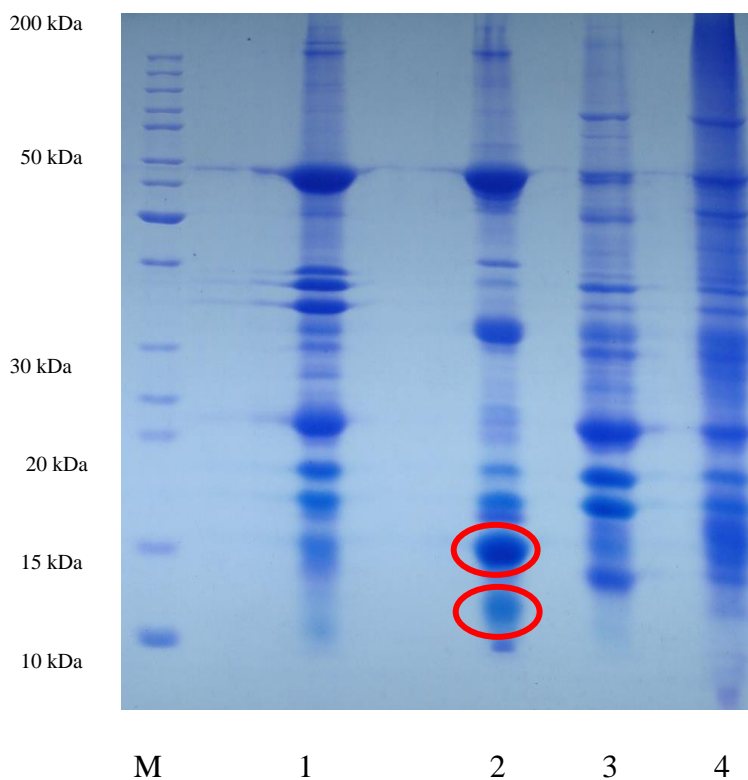


Figura 6. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% na presença de SDS com proteínas de amendoim CNPA 280 AM. M- Marcador de peso molecular; 1- EB; 2- Fração protéica saturada com sulfato de amônio na faixa F3; 3- F2 ; 4- F1.

Em função da fração F3 ter apresentado maior percentual de inibição, tanto nos ensaios com tripsina bovina como no homogenato intestinal de *A. diaperinus*, essa fração foi escolhida para os ensaios de estabilidade térmica, estabilidade de pH e ensaios *in vitro* com homogenato intestinal de *S. Frugiperda*, *T. molitor* e *T. castaneum*.

4.4.3. Estabilidade térmica da F3

O inibidor de tripsina do EB e da F3 foram avaliados quanto a sua resistência a diferentes temperaturas. Observou-se que a F3 manteve a atividade inibitória para tripsina entre 74% e 78,5%, enquanto que o extrato bruto manteve a inibição entre 85% e 100%.

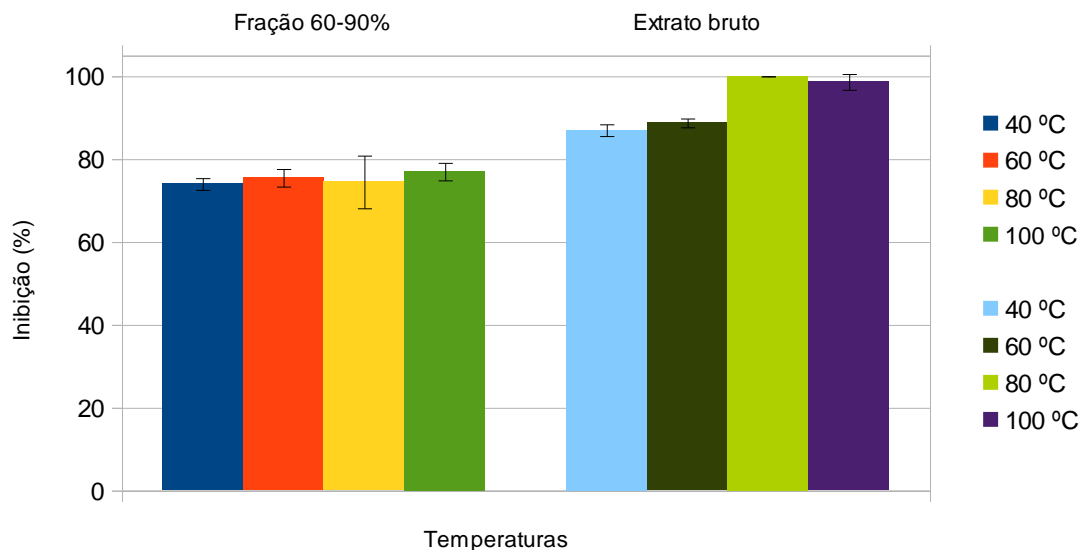


Figura 7. Estabilidade dos inibidores da F3 e do EB do genótipo CNPA 280 AM em diferentes temperaturas (40 °C; 60 °C; 80 °C; 100 °C), incubados por 30 min. Após o tratamento térmico, o inibidor foi pré-incubado com tripsina por 20 min, a 37 °C. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína a 1,5% (m/v) como substrato. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

De acordo com Caceres (2008), as proteínas possuem temperaturas características, nas quais apresentam o máximo de estabilidade e à medida que a temperatura se eleva praticamente todas as proteínas se desnaturam. Esse resultado é esperado, de acordo com outros trabalhos que realizaram ensaios de termorresistência (GOMES, 2005; CRUZ, 2008). Contudo, o inibidor da F3 foi bastante termorresistente, mantendo sua atividade inibitória total sobre a atividade da tripsina, corroborando com outros inibidores de tripsina já caracterizados (MACEDO et al., 2000; OSMAN et al., 2002; SERQUIZ, 2012). A estabilidade funcional das proteínas diante de agentes desnaturantes físico e químicos, como temperatura e pH ocorre devido as pontes dissulfeto entre as cadeias polipeptídicas, presentes na estrutura de inibidores de proteases.

Resultados de termoestabilidade da F3 (Figura 8) mostraram que este inibidor não apresentou diminuição considerável de sua atividade inibitória com o homogenato intestinal de *A. diaperinus* até 80 °C. Acima de 80 °C houve um decréscimo da atividade inibitória. Semelhantes a outros inibidores de tripsina purificados e caracterizados (MACEDO et al., 2003), a F3 foi termorresistente, mantendo sua atividade total quando aquecido até 80 °C e somente reduzindo sua atividade após o aquecimento a 100 °C.

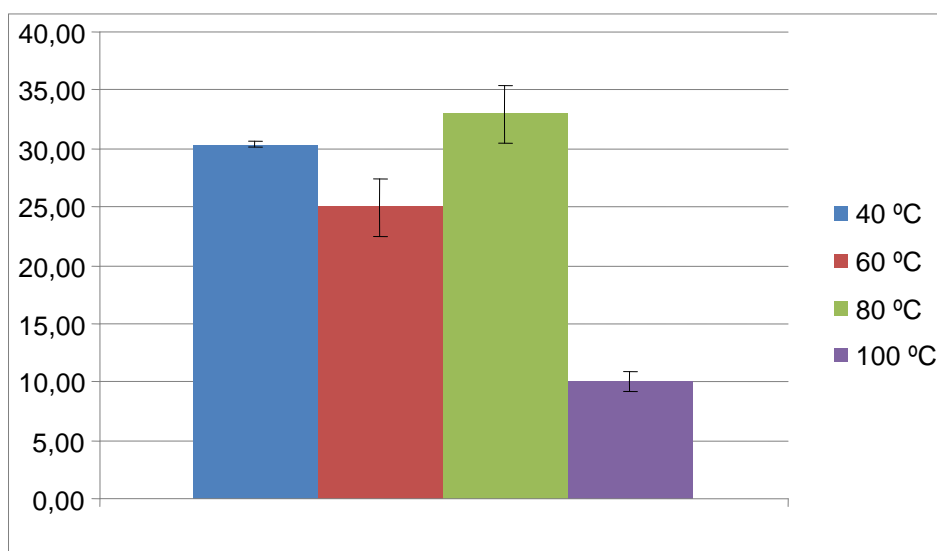


Figura 8. Estabilidade dos inibidores da F3 do genótipo CNPA 280 AM em diferentes temperaturas (40 °C; 60 °C; 80 °C; 100 °C), incubados por 30 min. Após o tratamento térmico, o inibidor foi pré-incubado com homogenato intestinal de *A. diaperinus* por 20 min, a 37 °C. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína a 1,5% (m/v) como substrato. Resultados expressos em média ± desvio padrão.

4.4.4. Estabilidade em diferentes pHs

A estabilidade da F3 em diferentes pHs foi testada incubando-se o inibidor em tampões com pHs variando entre 6,5 a 10,5. Após ensaio com a tripsina bovina e homogenato intestinal de *A. diaperinus*, verificou-se pouca alteração da capacidade inibitória nos diferentes pHs testados.

No ensaio com F3 e a tripsina bovina no pH 6,5, a atividade inibitória ficou em torno de 86% e manteve-se nesse patamar em todos os pHs testados, contudo, no pH 10,5 a inibição ficou em torno de 90,5% (Figura 9).

No ensaio da F3 com homogenato intestinal de *A. diaperinus* verificou-se também que houve pouca alteração na atividade inibitória, variando entre 19,5% a 28,5%, revelando que o inibidor é notadamente estável a uma ampla faixa de pH (Figura 9).

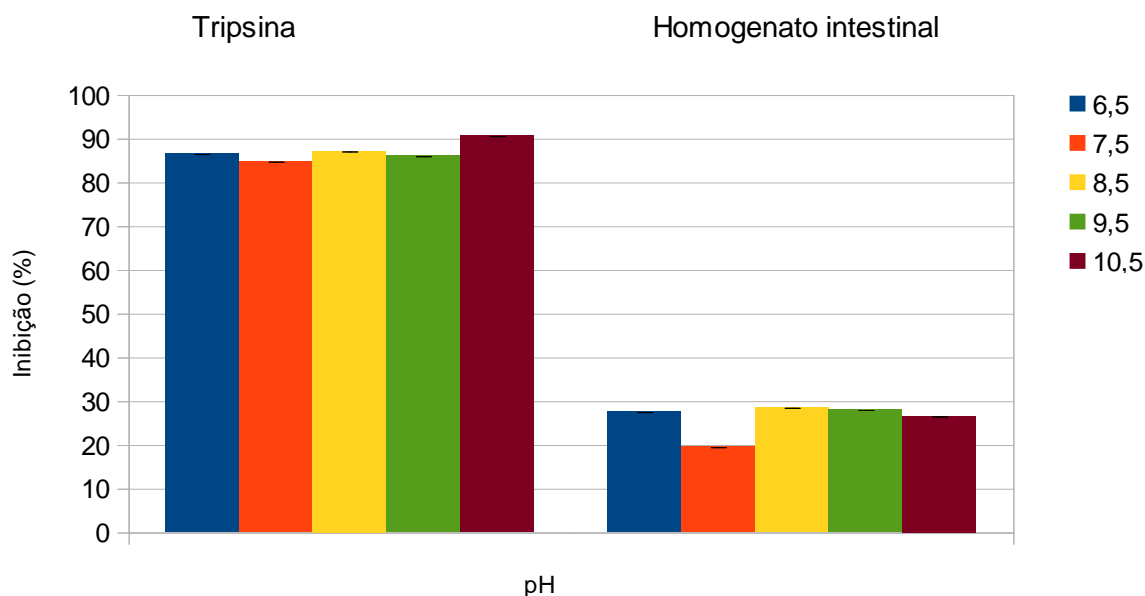


Figura 9. Estabilidade da F3 e, diferentes pHs. A F3 foi dialisada em diferentes pHs e em seguida pré-incubado com tripsina ou homogenato intestinal de *A. diaperinus* por 20 min, a 37 °C em pH 8,5. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

Tais resultados demonstram que esses inibidores são capazes de suportar variações de pHs. Tal capacidade é muito importante para a defesa de plantas tendo em vista que os insetos da ordem Coleoptera (larvas e adulto) possuem a porção anterior do intestino médio ácida, enquanto a parte posterior é neutra ou alcalina (TERRA e FERREIRA, 1994; LOPES et al., 2006). Um inibidor isolado de sementes de *Peltophorum dubium* por Macedo et al., (2003), também apresentou estabilidade da atividade inibitória em diferentes pHs.

4.4.5. Atividade inibitória da F3 com homogenato intestinal de diferentes insetos

A atividade *in vitro* da F3, para enzimas digestivas de diferentes insetos pragas do amendoim foram testadas. A F3 inibiu a atividade das enzimas digestivas dos Coleópteros *T. castaneum* e *T. molitor* e do Lepidóptera *S. frugiperda* com 82% 42% e 16% de inibição, respectivamente. (Figura 10).

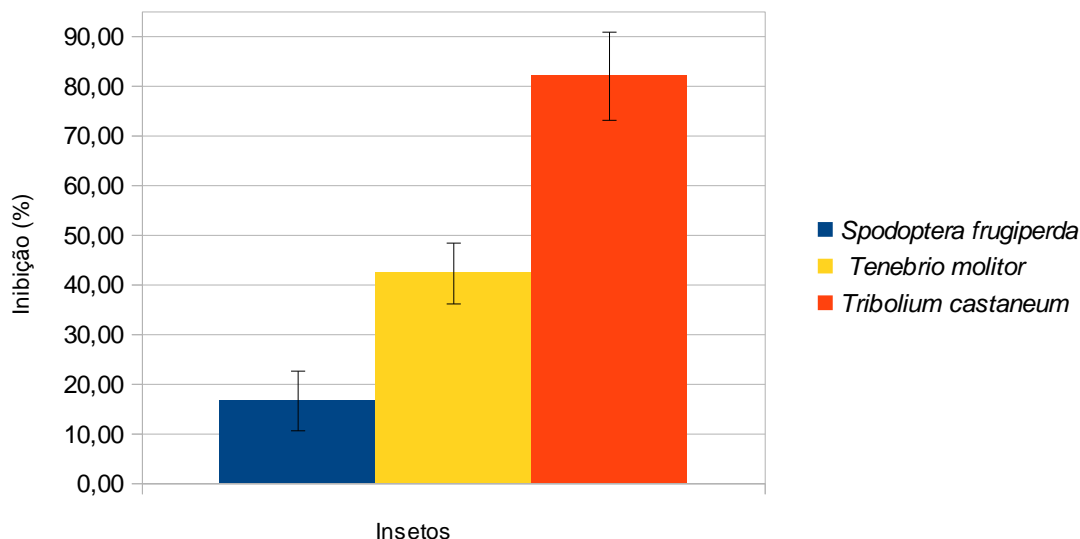


Figura 10. Atividade inibitória da F3 com homogenato intestinal de *S. Frugiperda*, *T. molitor* e *T. castaneum*. A F3 foi pré-incubado com homogenato intestinal por 20 min, a 37 °C. A atividade inibitória foi determinada usando azocaseína 1,5% (m/v) como substrato. Resultados expressos em média \pm desvio padrão.

As plantas podem desenvolver mecanismos de defesa que diminuem o ataque de herbívoros. Essa defesa das plantas pode ser constitutiva ou induzida; ambas podem se expressar de formas direta e indireta e consistem de compostos químicos e estruturas morfológicas que prejudicam o inseto, podendo reduzir-lhes a sobrevivência, o desenvolvimento e a reprodução (KARBAN e BALDWIN, 1997). Porém os herbívoros podem suplantar essas defesas.

Conforme pode ser observado na figura 10, verificou-se em *S. frugiperda* um menor percentual de inibição (16%). Alguns insetos conseguem se adaptar a determinados compostos de defesa produzidos pelas plantas. Lagartas de *S. frugiperda*, por exemplo, são capazes de suplantar os efeitos deletérios de inibidores de proteases de plantas de soja em dieta artificial, possivelmente por meio de uma habilidade na produção de novas enzimas tripsina-*like* menos sensíveis aos inibidores produzidos pelas plantas e ingeridos pelos insetos e, também, por meio da síntese de outras classes de enzimas (PAULILLO et al., 2000; XAVIER et al., 2005; PILON et al., 2006).

De acordo com Oliveira (2007), foram também realizados ensaios *in vitro* sobre as proteinases digestórias de Lepidóptera e Coleóptera. Observou-se que esses inibidores foram efetivos para enzimas digestórias semelhantes à tripsina dos insetos destas ordens. Como exemplo as enzimas de *C. maculatus* apresentou 29% de inibição com as sementes de Jurema

Branca, enquanto que *A. argillaceae* e *P. interpunctella* foram suprimidas em 13,58% e 48,67%, respectivamente, e larvas de *P. interpunctella* e *C. capitata* foram inibidas em 8,97% e 37,47%, respectivamente.

Em contrapartida o *T. castaneum* foi inibido em 82% da sua atividade digestiva para tripsina, o que revela que existe uma maior compatibilidade estrutural entre o sítio reativo do inibidor e o sítio ativo da enzima.

5. CONCLUSÕES

- ❖ A presença de inibidores de tripsina nos extratos proteicos das sementes de amendoim dos onze genótipos testados foi bastante expressiva com tripsina, devido ao alto potencial inibitório acima de 70%.
- ❖ Os maiores percentuais de inibição para tripsina foram dos genótipos BRS Havana, CNPA 270 AM, Florruner e CNPA 280 AM, com: 90,3%, 92,2%, 92,6% e 94,2%, respectivamente.
- ❖ Dentre os cinco genótipos de amendoim testados com *A. diaperinus*, o BRS 151 L7 apresentou a maior inibição *in vitro* para as enzimas do trato digestivo e o menor número de larvas no bioensaio.
- ❖ A F3 do genótipo CNPA 280 AM forneceu o maior percentual de inibição tanto nos ensaios com tripsina bovina como no homogenato intestinal de *A. diaperinus*, e foi altamente estável nos ensaios de pH e temperatura.
- ❖ A F3 do genótipo CNPA 280 AM inibiu em 16%, 42% e 82% as serino proteases intestinais de *S. frugiperda*, *T. molitor* e *T. castaneum*, respectivamente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os genótipos de amendoim BRS 151 L7 e o CNPA 280 AM destacaram-se como promissores, devido as suas capacidades de inibição *in vitro* para as enzimas do trato digestivo de insetos-pragas e tripsina bovina, inibição da capacidade de reprodução de *A. diaperinus in vivo*, e ainda apresentaram estabilidade nos ensaios com diferentes temperaturas e pH.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que os genótipos investigados são importantes fontes de inibidores de proteases serínicas podendo ser utilizados como candidatos potenciais para os trabalhos de melhoramento do amendoim, visando tolerância a pragas de grãos armazenados.

A perspectiva que se tem em relação aos resultados obtidos é que outros genótipos de amendoim do Programa de melhoramento de Amendoim da Embrapa Algodão sejam analisados com a finalidade de uso em trabalhos de melhoramento e na possibilidade de redução de perdas de grãos na fase de pós-colheita.

REFERÊNCIAS

ADAM, Z. Chloroplast proteases. Possible Regulators of gene expression? **Biochimie** 82: 647- 654. 2000.

ALVES, M. O. M. J. **Inibidores de proteinase do tipo Bowman Birk: evolução molecular, expressão na superfície de fagos filamentosos e seu papel na interação planta-inseto.** Tese apresentada a Universidade de São Paulo. Piracicaba: 2002.

APPLEBAUM, S. W. Biochemistry of digestion. In: Kerkut, G. A.; Gilbert, L. I. (eds.) **Comprehensive Insect physiology, Biochemistry and Farmacology. Pergamon Press, Oxford**, p. 270-311, 1985.

ARAUJO, C. L.; BEZERRA, I. W. L.; DANTAS, I. C.; LIMA, T. V. S.; OLIVEIRA, A. S.; MIRANDA, M. R. A.; LEITE, E. L.; SALES, M. P. Biological activity of proteína from pulps of tropical fruits. **Food Chemistry**, v. 85, n.1, p.107-110, 2004.

AZEVEDO, A. I. B.; LIRA, A. S; CUNHA, L. C; ALMEIDA, F. A.C.; ALMEIDA, R. P. Bioatividade do óleo de nim sobre *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em sementes de amendoim **Revista Brasileira Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 309–313, 2010.

AZEVEDO, A. I. B.; CUNHA, L. C.; SANTOS, E. C. X. R.; LICARIÃO, M. R.; ALMEIDA, R. P. de Efeitos da formulação comercial Neemseto sobre *Alphitobius* sp. , alimentados com sementes de amendoim. In: Simpósio de Entomologia, Reunião anual da Sociedade de Entomologia da Paraíba, 2007, Campina Grande. **Entomologia e Biodiversidade – Anais...** Campina Grande: UEPB, p.156, 2007.

AZEVEDO, A. I. B. **Bioatividade do óleo de nim sobre *Tribolium castaneum* e *Alphitobius diaperinus* ((Coleoptera: Tenebrionidae) em sementes de amendoim armazenado.**2008. 79f. Dissertação Mestrado- Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, 2008.

BHATTACHARYYA, A.; BABU, C. R. Purification and biochemical characterization of a serine protease inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: Insight into structural and antimalarial features. **Phytochemistry**, v. 70, p. 703–712. 2009.

BAUDYS, M.; GHOSH, M.; HARLOS, K.; MARES, M.; FUSEK, M.; KOSTKA, V.; BLAKE,

C.C. Crystallization and preliminary crystallographic study of cathepsinD inhibitor from potatoes. **J. Molecular Biology**. v. 218, n.1, p. 21-22, 1991.

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

BODE, W.; HUDER, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1477, p. 241-252, 2000.

BRADFORD, M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**., [S.l.], v. 72, p. 248-254, 1976.

BROADWAY, R.M.; DUFFEY, S.S. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of insect physiology**, 32: 827-833, 1986.

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.

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

Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos – Safra 2011/2012**, nono levantamento-Junho/2012. Brasília: Conab 2012.

CRUZ, A. C. B. **Purificação, caracterização e análise das atividades bioinseticidas, de um inibidor de tripsina em sementes de Catanduva (*Piptadenia moniliformis*)**. Dissertação apresentada a Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2008.

DODO, H. W. et al., cDNA clone of a putative peanut (*Arachis hypogaea* L.) trypsin inhibitor has homology with peanut allergens Ara h 3 and Ara h 4. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. [S.l.], v. 52, n. 5, 2004.

ESTELLE, M. Proteases and cellular regulation in plant. **Curr. Opin. Plant Biology**. 4: 252-260. 2001

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, p. 352-366, 2011.

FÁVERO, A. R. ; SIMPSON, C. E; VALLS, J. F. M. ; VELLO, N. A. Study of the evolution of cultivated peanut through crossability studies among *Arachis ipaensis*, *A. duraanensis* and *A. hypogaea*. **Crop Science**, Madison, v. 46, p. 1546- 1555, 2006.

FERREIRA, E. C. B. **Uso de nim no controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera Tenebrionidae) em vagens de amendoim armazenado**. Trabalho de conclusão de graduação. Universidade Estadual da Paraíba, 2011.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish: review. **Aquaculture**, v.199, p.197-227, 2001a.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; BLOCH Jr.; SILVA, C. P.; GROSSI de Sá, M. F. Activity of wheat α -amylases inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 8, p.1466-1473, 2000.

FREITAS, S. M.; MARTINS, S. S.; NOMI, A. K.; CAMPOS, A. F. Evolução do mercado brasileiro de amendoim. In: SANTOS, R.C. (Ed.). **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005. p.15-44.

GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect resistant transgenic crops. **Pesticide Science** 52: 165-175 1998.

GODOY, I. J.; MORAES, S. A.; ZANOTTO, M. D.; SANTOS, R. C. Melhoramento do amendoim. In: BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 2005. p.54-95.

GOMES, C. E. M. **Purificação, Caracterização e Atividade Bioinseticida de um Inibidor de Sementes de *Crotalaria pallida***, 2004, 74 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)-Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2004.

GOMES, L. R.; SANTOS, R. C.; FILHO, C. J. A.; MELO, P. A. F. **Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de genótipos de amendoim de porte ereto**. In: Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 42, n. 7, jul. 2007 p.985-989.

GOMES, C. E. M. et al., Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (Cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (Fruit fly). **Plant physiology and biochemistry**, [S.l.], v. 43, n. 12, p. 1095-1102, 2005.

GREEN, A. A.; HUGHES, W. L. Protein solubility on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. **Methods Enzymol.** 1: 67-90. 1955

HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pest and pathogens natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 2004.

HUMA, H.; KHALID, M. F. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review** vol. 2 (3), p. 068-085, August 2007.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/estProdAgr_2012_05.pdf>. Acesso em 05 de junho 2012.

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.

KIM, Y. S.; LAMBOOY, J. P. Covalent bonding of riboflavin homologs by hepatics mitochondrial membrane enzymes. **Internacional Journal Biochemistry**. 17, 9, 975-981, 1985.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. T4. **Nature**. , (S.I.) v. 227. p. 680-685, 1970.

LAWRENCE. P. K.; KOUNDAL. K. R.; Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology** 5 (1): 93-109, 2002.

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, 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 Riquímica**. Salvador BA, 2008.

LINGARAJU, M. H.; GOWDA, L. R. A Kunitz trypsin inhibitor of Entada scandens seeds: Another member with single disulfide bridge. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1784, p. 850-855. 2008.

LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; MARANA, S. R.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their substites in catalysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. n. 36, p. 130-140. 2003.

LUCENA, S. V. **Purificação, caracterização e avaliação da atividade antiproliferativa de um inibidor de quimotripsina tipo kunitz de semente de *Eryhrina velutina***. Dissertação apresentada a UFRN. Natal 2010.

MACHADO, J. G. de C. F. Análise das estratégias de marketing das indústrias de processamento de amendoim da região de Tupã-SP. In: **Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural**, 44. 2006, Fortaleza, Ceará, Brasil. Anais... Fortaleza: Sober, 2006. CD-ROM.

MACEDO, M. L. R.; MATOS, D.G. G; MACHADO, O. L. T. ; MARANGONI, S.; NOVELO, J. C. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification e properties. **Phytochemistry**, 54: 553-558. 2000.

MACEDO, M. L. R.; MELLO, G. C.; FREIRE, M. G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MATOS, D. G. G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the

development of *Callosobruchus maculatus*. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 40, p. 891-898. 2002.

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**, 2003.

MARINHO. J. L.; **Resposta bioquímica de lagartas de *Thyrinteina leucoceraea* (Lepidoptera: Geometridae) submetida ao inibidor de serino protease benzamidina.** Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais, 2006.

MOSOLOV, W.; VALUEVA, T. A. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 233-240, 2008.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; TÁVORA, F. J. A. F. Ecofisiologia do amendoim (*Arachis hipogaea* L.). In: SANTOS, R.C. dos (Ed.) **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Ed. Campina Grande-PB: EMBRAPA, 2005, p. 16-44.

NORIOKA, S.; OMICHI, K.; IKENAKA, T. Purification and Characterization of Protease Inhibitors from Peanuts (*Arachis hypogaea*). **Journal of Biochemistry** [S.l.], v. 91, n. 4, p.1427-1434, 1982.

OLIVEIRA. C. F. R.; MACEDO. M. L. R. Emprego de inibidores de protease vegetais como ferramenta biotecnológica alternativa no controle de pragas. **Perspectivas on line Ciências Biológicas e da Saúde**. v1. n. 1. 2011.

OLIVEIRA, A. S. de. **Purificação e caracterização de inibidores de tripsina de sementes de *Pithecellobium dumosun* e seus efeitos.** 222 f. Tese (Doutorado em Bioquímica)- Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007

OLIVEIRA, M. G. A; SIMONE, C. G; XAVIER. L. P; GUEDES. R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar *Anticarsia gemmatilis*. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 140 (B); 369-380, 2009

OLIVEIRA, L. G; GOZZO, A. J.; NUNES, V. A.; SILVA, I. C; SAMPAIO, M. U; SAMPAIO, C. A. M.; ARAÚJO, M. S. Inibidores de proteases encontrados em sementes de *Caesalpinia echinata* (paubrasil) – isolamento e caracterização do inibidor de tripsina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 72-74, 2002.

OLIVEIRA-NETO, O. B; BATISTA, J. A; RIGDEN, D. J; FRANCO, O. L; FRAGOSO, R. R.; MONTEIRO, A. C; MONNERAT, R. G; GROSSI- DE-SÁ, M. F. Molecular cloning of a cysteine proteinase cDNA from the cotton boll weevil *Anthonomus grandis* (Coleoptera Curculionidae). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 68, 2004.

OUROFINO. **Programa de manejo integrado para o controle de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) em aviários.** Ribeirão Preto, p. 10, 2000,

OSMAN, M. A.; REID, P. M. WEBER, C. W. Thermal inactivation of therapy beans (Phaseolus

acutifolius), soybeans and lima bean protease inhibitors effect of acidic and basic p H. **Food Chemistry**, 2002.

PAULILLO, L. C. M. S. et al. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 3, p. 92-896, 2000.

PEREIRA, R. A. **Inibidores proteicos e seu potencial o controle de insetos praga de importância para a cultura do café e do feijão**. Tese apresentada a Universidade de Brasília. Brasília; 2005.

PILON, A. M.; OLIVEIRA. M. G. A.; GUEDES. R. N. C. Protein digestibility, proteases activity and post embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmantalis*) exposed to the tripsin inhibitor benzamidine. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2006.

POMPERMAYER, P.; PARRA, J. R. P.; FALCO, M. C.; SILVA FILHO, M. C. Coupling diet quality and Bowman-Birk and Kunitz-type soybean proteinase inhibitor effectiveness to *Diatraea saccharalis* development and mortality. **Entomol. Exp. Appl**, 2003.

PRADO, J. S. M.; **Bioatividade de Berenil, um inibidor de proteases do tipo bis-benzamidina, sobre *Thyrinteina arnobia***. Tese apresentada a Universidade de Viçosa. Minas Gerais, 2010.

RESENDE, M. L. V.; BARRETTI, P. B.; MEDEIROS, F. C. L.; SILVA, D. D.; PEREIRA, R. B.; LINS, S. R. O.; PEREIRA, L. M.; CAMPOS, M. A. **Percepção e transdução de sinais para a ativação de respostas de defesa em plantas contra patógenos.**, v. 15, p. 129 – 198, 2007.

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*, v. 5. **Academic Press**, New York, p. 259–305. 1991.

RINTOJA. A.; KRIZAJ I.; MESKO. P.; KOPITAR. M.; LUCOVNIK. P.; STRUKEL. J B.; PUNGERCAR. J.; BUTTLE. D. J.; BARRETT. A. J; TURK. V. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. **FEBS lett.** v. 267, n. 1, p 13-15, 1990.

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

SALES, M. P.; GERHARDT, I. R.; GROSSI de Sá, M. F.; XAVIER FILHO, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**, v. 124, p. 515-522, 2000.

SANTANU, B.; ROY, A.; SAMPA, D. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. **Plant Science**, v. 161, p. 1025-1033, 2001.

SANTOS, R. C. BRS 151 L-7: Nova cultivar de amendoim para as condições do nordeste brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v. 35, n. 3, p. 665-670, mar. 2000.

SANTOS, R.C.; ALBUQUERQUE, F.A. Cultivo do Amendoim. **Sistemas de produção**, Embrapa Algodão N.7 ISSN 1678-8710 versão eletrônica. Dez/2006.

SANTOS, R. C.; Freire, R.M. M.; Suassuna, T. M. F.; Rego, G. M. Novas cultivares - BRS Havana: Nova cultivar de amendoim de pele clara. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 8, p.1337-1339, 2006.

SANTOS, R.C. O agronegócio do amendoim no Brasil. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005.

SANTOS, J. F.; GODOY, I. J.; FÁVERO, A. P.; MOURA, N. F.; MICHELOTTO, M. D.; MARTINS, A. L. M. Resistance to late leaf spot in F4 populations selected from crosses between the cultivated peanut and an *Arachis amphidiploid*. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 3, p.512-518, 2011.

SAWANO, Y.; HATANO, K.; MIYAKAWA, T.; KOMAGATA, H.; MIYAUCHI, Y.; YAMAZAKI, H.; TANOKURA, M. Protease inhibitor from Ginkgo seeds is a member of the plant nonspecific lipid transfer protein gene family. **Plant Physiology**, v. 146, p. 1909-1919. 2008.

SERQUIZ. Alexandre Coelho. **Efeito sacietogênico de um novo inibidor de tripsina da paçoca do amendoim com aumento plasmático de colecistocinina (cck)**. Dissertação apresentada a UFRN. Natal 2012.

SVENDENSEN, I.; HANSEN, S. I.; HOLM, J.; LYNGBYE, J. The complete amino acid sequence of the folate-binding protein from cow milk. **Caresberg Research communication**, 49. 1984.

SILVA. R. LOPES. **Inclusão do farelo de amendoim em dietas para juvenis de tilápia do Nilo**. Dissertação apresentada a Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal, 2012.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista Nutrição**, Campinas, v.13, n.1, p.3-9, 2000.

SILVEIRA, P. S. et al. Teor de proteínas e óleo de amendoim em diferentes épocas de semeadura e densidade de plantas. **Revista FZVA Uruguaiana**, v. 18, n. 1, p. 34-45, 2011.

SPILMAN, T. I. Darkling beetles (Tenebrionidae, Coleoptera). Washington, D.C.: **United States Government Printing Office**. v. 1, p. 310, 1991.

STEPPUHN, A.; BALDWIN, I.T. Resistance management in a native plant: nicotine prevents herbivores from compensating for plant protease inhibitor. **Ecology Letters**, 2007.

SUASSUNA, T. M. F.; SUASSUNA, N. D.; ALMEIDA, R. P.; FONSECA, H. Segurança e qualidade na produção primária do amendoim. Campina Grande: **Embrapa Algodão**, 2006. 22 p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 88).

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, 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, 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**, 56B, p. 201-209, 1977.

TERRA, W. T.; FERREIRA, C. Insect Digestive Enzymes: Properties, Compartmentalization and Function. **Comparative Biochemistry and Physiology, Vancouver**, v. 109B, p. 1-62, 1994.

TERRA, W. R.; CHRISTOFOLETTI, P. T. Midgut proteinases in three divergent species of coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 1996.

TORRES-CASTILLO, J. A.; MONDRAGON JACOBO, C.; BLANCO-LABRA, A., Characterization of a highly stable trypsin-like protease inhibitor from the seeds of *Opuntia streptacantha* (*O. streptacantha* Lemaire). **Phytochemistry**, v. 70, p. 1374-1381, 2009.

TREMACOLDI, C. R.; PASCHOLATI, S. F. Detection of trypsin inhibitor in seeds of *Eucalyptus urophylla* and its influence on the *in vitro* growth of the fungi *Pisolithus tinctorius* and *Rhizoctonia solani*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 281-286, 2002

VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. New Species of *Arachis* from Brazil. **Bonplandia**, Corrientes, v. 14, p. 35-64, 2005.

XAVIER-FILHO, J.; SALES, M. P.; FERNANDES, K. V. S.; GOMES, V. M. The Resistance of Cowpea (*Vigna unguiculata*) Seeds to the Cowpea Weevil (*Callosobruchus maculatus*) is Due to the Association of Variant Vicilins (7S storage proteins) to Chitinous Structures in the Insect Midgut. **Biology and Technology**, New York, v. 39, p. 693-699, 1996.

XAVIER, L. P. et al. Membrane-bound trypsin-like activity of midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **European Journal of Entomology (Ceske Budejovice)**, v. 102, n. 2, p. 147-153, 2005.

ZHU, Y. C.; BAKER, J. E. Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNA from the lesser grain borer, *Rhizopertha dominica* (coleoptera Bostrichidae). **Insect Biochemistry and molecular Biology**, 29, 1999.

WALKER, A. J.; FORD, L.; MAJERUS, M. E. N.; GEOGHEGAN, A. E.; BIRCH, N.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Characterization of the midgut digestive

proteinase activity of the two spot lady bird (*Adalia bipunctata*) and its sensitivity to proteinase inhibitors. **Insect Biochemistry and molecular biology**, 28: 173-180, 1997.

WIJAYA, R.; NEUMANN, G. M.; CONDRON, R.; HUCHES, A. B.; POLYA, G.M. Defense protein from seed of *Cassia fistulal* include a lipid transfer protein homologues and a protease inhibitory plant defensin. **Plant Science**, v. 519, p. 243-255, 2000.