

**EFEITO DE INIBIDORES DE PROTEINASE DE SOJA SOBRE A
AÇÃO, CRESCIMENTO E METABOLISMO DE PROTEINASES
INTESTINAIS DE LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda*
(J.E.Smith,1797)**

Luis Cesar Maffei Sartini Paulillo
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1999

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

Paulillo, Luis Cesar Maffei Sartini

Efeito de inibidores de proteínase de soja sobre a ação, crescimento e metabolismo de proteínases intestinais de lagartas de *Spodoptera frugiperda* / Luis Cesar Maffei Sartini Paulillo. - - Piracicaba, 1999.

72 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.

Bibliografia.

1. Dieta artificial 2. Inibidor de proteínase 3. Lagarta-do-cartucho-do-milho
4. Melhoramento genético vegetal 5. Planta transgênica 6. Praga agrícola 7.
Resistência genética I. Título

CDD 632.78

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O Autor"

**À meus pais Erasmo e Neyde Paulillo
Parafrazeando Isaac Newton ... Se hoje
posso considerar-me "grande" é porque
apoiei-me nos ombros de gigantes**

OFEREÇO

**À Bruna, minha afilhada,
o renascer da alegria em minha família,**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho, pela orientação segura e indispensável deste trabalho, amizade e pelos ensinamentos transmitidos para minha formação profissional;

Ao Departamento de Genética da ESALQ/USP, pela oportunidade e apoio técnico recebido para a realização deste projeto;

Ao Prof. Dr. José Roberto P. Parra, pela realização dos ensaios biológicos e discussão dos resultados alcançados; de vital importância para a conclusão deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Walter R. Terra, pela oportunidade de realização dos ensaios bioquímicos e aconselhamentos, sem os quais este trabalho não poderia ter sido realizado;

À Prof.a Dr.a Aparecida Tanaka; pela aprendizagem das técnicas de extração e purificação de inibidores de proteinase, amizade e auxílio na discussão dos resultados;

A todos os colegas, professores e funcionários do Departamento de Genética da ESALQ/USP que, de um modo ou outro contribuíram para a realização deste trabalho;

À Sr.a Neide Graciano Zério, técnica do Laboratório de Biologia de Insetos do Departamento de Entomologia da ESALQ/USP, pelo preparo das dietas artificiais e ajuda nos ensaios biológicos ;

Ao funcionário Carlos Roberto Macedônio, pela ajuda imprescindível para a configuração final deste trabalho;

Aos funcionários Rafael, Fernando e Oberdã, pela amizade e auxílio;

Aos funcionários das bibliotecas da ESALQ/USP, pelos auxílios prestados;

Aos meus tios Lúcio e Rosa Kroll, Sérgio e Elizabeth Paulillo, pelo carinho e ajuda;

Aos meus irmãos Luis Alexandre e Analucia, pelo incentivo e estímulo;

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/IPCD), pela concessão da bolsa de estudo.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| RESUMO | viii |
| SUMMARY | x |
| I INTRODUÇÃO | 01 |
| II - REVISÃO DE LITERATURA | 03 |
| 2.1 - INIBIDORES DE PROTEINASE | 03 |
| 2.1.1 - Ocorrência, Tipos e Distribuição | 03 |
| 2.1.2 - Modo de Ação | 06 |
| 2.1.3 - Efeitos sobre o desenvolvimento e metabolismo de insetos | 07 |
| III - MATERIAL E MÉTODOS | 12 |
| 3.1 - Criação das lagartas em laboratório | 12 |
| 3.2 - Ensaio enzimáticos/bioquímicos | 13 |
| 3.2.1 - Preparo do extrato intestinal de <i>Spodoptera frugiperda</i> | 13 |
| 3.2.2 – Determinação de proteína | 14 |
| 3.2.3 - Separação das proteinases intestinais do tipo tripsinas de lagartas de <i>S. frugiperda</i> pela coluna Metil HIC | 14 |
| 3.2.4 – Caracterização das enzimas do tipo tripsinas e quimotripsinas | 15 |
| 3.2.5 - Ensaio de pH ótimo para a tripsina e quimotripsina | 16 |
| 3.2.6 - Potencial de inibidores de proteinase sobre as enzimas digestivas de <i>S. frugiperda</i> | 16 |
| 3.2.7 - Extração e purificação parcial dos inibidores de proteinase a partir de sementes de soja | 17 |
| 3.2.8 - Determinação da inibição <i>in vitro</i> da atividade proteolítica intestinal de <i>S. frugiperda</i> pelos inibidores de proteinase extraídos de soja | 17 |
| 3.2.9 - Separação das proteinases digestivas de <i>S. frugiperda</i> em gel cilíndrico de poliacrilamida | 17 |
| 3.3 - Ensaio Biológicos | 18 |
| IV - RESULTADOS | 20 |
| 4.1 - Ensaio enzimáticos/bioquímicos | 20 |

| | |
|--|----|
| 4.1.1 – Caracterização das enzimas do tipo tripsinas e quimotripsinas de <i>S. frugiperda</i> | 20 |
| 4.1.2 - Separação das proteinases intestinais de larvas de <i>S. frugiperda</i> pela coluna Econo-Pac Cartridge HIC | 21 |
| 4.1.3 – Determinação da inibição <i>in vitro</i> da atividade proteolítica intestinal de larvas de <i>S. frugiperda</i> pelos inibidores: SBBI e SBTI e inibidor de soja semi-purificado | 22 |
| 4.1.4. - Determinação da inibição <i>in vitro</i> da atividade proteolítica intestinal de lagartas de <i>S. frugiperda</i> pelo inibidor de soja semi-purificado | 23 |
| 4.2 - Ensaios Biológicos | 24 |
| 4.2.1 - Fase de larva | 24 |
| 4.2.1.1 – Mortalidade Inicial | 25 |
| 4.2.1.2 - Duração e viabilidade | 26 |
| 4.2.2 - Fase de Pupa | 26 |
| 4.2.2.1 – Mortalidade Pupal | 26 |
| 4.2.2.2 - Duração, Peso e Viabilidade | 27 |
| 4.3 - Ensaios bioquímicos seguintes aos ensaios biológicos | 30 |
| 4.3.1 - Inibição <i>in vitro</i> da atividade trípica larval de <i>S. frugiperda</i> posteriormente à ingestão de inibidores de proteinase de soja | 30 |
| 4.3.2 - Atividade trípica e quimotríptica de lagartas de <i>S. frugiperda</i> seguinte à ingestão de IP de soja | 31 |
| V - DISCUSSÃO | 33 |
| 5.1 – Caracterização das principais proteinases intestinais de lagartas de <i>S. frugiperda</i> e ensaios de inibição com inibidores de proteinase de soja .. | 33 |
| 5.2 - Ensaio biológicos | 35 |
| 5.3 - Ensaio bioquímicos seguintes à ingestão de IPs pelas lagartas de <i>S. frugiperda</i> | 36 |
| VI - CONCLUSÕES | 39 |
| REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS | 40 |
| ANEXO | 58 |

**EFEITO DE INIBIDORES DE PROTEINASE DE SOJA NO CRESCIMENTO,
METABOLISMO E AÇÃO SOBRE AS PROTEINASES INTESTINAIS DE
LAGARTAS DE *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797).**

Autor: Luis Cesar Maffei Sartini Paulillo
Orientador: Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho

RESUMO

O desenvolvimento de plantas transgênicas de milho expressando inibidores de proteinase de soja poderia reduzir os danos econômicos de uma das principais pragas do milho no Brasil, a lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). Além disso, a atividade de serina proteinase (tripsina e quimotripsina) proveniente de extrato intestinal de lagartas foi caracterizada. Posteriormente, nós examinamos a influência de inibidores de proteinase de soja (Kunitz e Bowman-Birk) sobre as propriedades de enzimas digestivas e desenvolvimento de lagartas de *S.frugiperda*. A inibição de atividades específicas *in vitro* pelos inibidores de proteinase de soja sugeriu que ambos Kunitz (SBTI) ou Bowman-Birk (SBTI) teriam um efeito potencial antimetabólico quando ingeridos pelas lagartas do inseto. Entretanto, a ingestão crônica de inibidor de soja semi-purificado não resultou em uma redução significativa do crescimento e desenvolvimento de lagartas do cartucho do milho. Por outro lado, a atividade de tripsinas e quimotripsinas de lagartas de *S. frugiperda* não foi significativamente inibida *in vivo* por SBTI ou SBBI de soja. Estes resultados sugerem que as lagartas de *S. frugiperda* foram capazes de se adaptarem fisiologicamente aos inibidores de proteinase de soja pela superprodução de uma quimotripsina existente ou pela

produção de um novo tipo de enzima semelhante à tripsina que é menos susceptível à ação inibitória.

**EFFECT OF SOYBEAN TRYPSIN INHIBITOR ON THE GROWTH,
METABOLISM AND ACTION OVER MIDGUT PROTEINASES ACTIVITIES OF
LARVAL *Spodoptera frugiperda* (J. E. SMITH, 1797).**

Author: Luis Cesar Maffei Sartini Paulillo

Adviser: Prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho

SUMMARY

The development of transgenic maize plants expressing soybean proteinase inhibitors could reduce the economic damage of one of the major maize pests in Brazil, the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Therefore, serine proteinase activity (trypsin and chymotrypsin) from insect larvae midgut extracts from was characterized. Further, we examined the influence of soybean proteinase inhibitors (Kunitz and Bowman-Birk) on digestive enzymes properties and development of *Spodoptera frugiperda* larvae. The *in vitro* inhibition of specific activities by soybean proteinase inhibitors suggested that either Kunitz (SBTI) or Bowman-Birk (SBBI) would have a potential antimetabolic effect when ingested by the insect larvae. However, chronic ingestion of semi-purified soybean inhibitors did not result in a significant reduction of growth and development of fall armyworm. On the other hand, trypsin and chymotrypsin activities from larvae of *S. frugiperda* were not significantly *in vivo* inhibited by SBTI or SBBI inhibitors from soybean. These results suggest that *S. frugiperda* larvae were able to physiologically adapt to dietary proteinase inhibitors by either overproduction of an existing chymotrypsin or production of a new type of trypsin-like enzyme that is less susceptible to the inhibitory action.

I- INTRODUÇÃO

A lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797), é uma das pragas mais importantes da cultura do milho no Brasil. Apesar de ser originária das regiões tropicais, sua ocorrência é observada em toda a América (Metcalf et al., 1962; Labrador, 1967). No Brasil, devido a disponibilidade de alimentos durante todo o ano e das condições climáticas favoráveis ao inseto, sua distribuição é observada em todas as regiões do território nacional.

S. frugiperda é um inseto polífono que se alimenta de um grande número de plantas cultivadas, tendo entretanto preferência por gramíneas. As perdas causadas por sua infestação nas culturas podem reduzir a produtividade em cerca de 34% (Carvalho, 1970); no entanto, aspectos como a fase de desenvolvimento da cultura, tipo de cultivar utilizada, local de plantio, práticas agrônomicas adotadas, podem influenciar o nível de infestação. Geralmente, o controle da lagarta-do-cartucho, tem sido feito através da aplicação de inseticidas químicos sintéticos. Ao mesmo tempo, são verificados problemas de desequilíbrio biológico, contaminação do ambiente, aparecimento de populações de insetos resistentes aos inseticidas, etc.

Diante disso, novas tecnologias têm sido estudadas, dentre as quais, deve-se ressaltar a utilização de inibidores de proteinase (Johnson et al., 1989). Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, tornou-se possível a transferência de genes que codificam inibidores de proteinase (IPs) para

outras espécies sexualmente incompatíveis, resultando em plantas mais tolerantes a determinados insetos-praga.

Assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a atuação dos inibidores de proteinase de soja, incorporados à dietas artificiais, sobre as proteinases digestivas de lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) e, conseqüentemente, avaliar os seus efeitos sobre o desenvolvimento e biologia das lagartas. Além disso, estudar os possíveis mecanismos adaptativos do inseto à presença dos IPs.

II- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inibidores de Proteinase: Ocorrência, Tipos e Distribuição

Produzidos naturalmente, os inibidores de proteinases (IPs) de plantas já foram extensivamente descritos (Ryan, 1990). Eles foram primeiramente identificados em tecidos de plantas há mais de sessenta anos por Read & Haas em 1938 (Liener, 1994). Existem quatro grandes famílias de IPs, incluindo aqueles que inibem proteinases do tipo serina, cisteína, aspartato, e metalocarboxipeptidases.

Os IPs direcionados contra proteinases do tipo serina podem ser agrupados dentro de pelo menos dezesseis diferentes famílias baseando-se na similaridade de seqüências de aminoácidos, topologia, e mecanismo de ligação (Bode & Huber, 1992). Para onze destas famílias, pelo menos uma, e freqüentemente várias, a estrutura tridimensional é conhecida; para outras como o inibidor de tripsina de *Escherichia coli* e *Ascaris*, a análise da estrutura está em estudo.

Os inibidores de proteinase de soja classificam-se em duas categorias principais: primeiramente, os que contêm peso molecular ao redor de 20.000 Da, apresentam duas pontes de enxofre e, possuem especificidade dirigida principalmente contra à ação de tripsina e, segundo, aqueles que possuem peso molecular de 6.000 a 10.000 Da, exibem alta proporção de pontes de dissulfeto e, a capacidade de inibir a atividade de quimotripsina bem

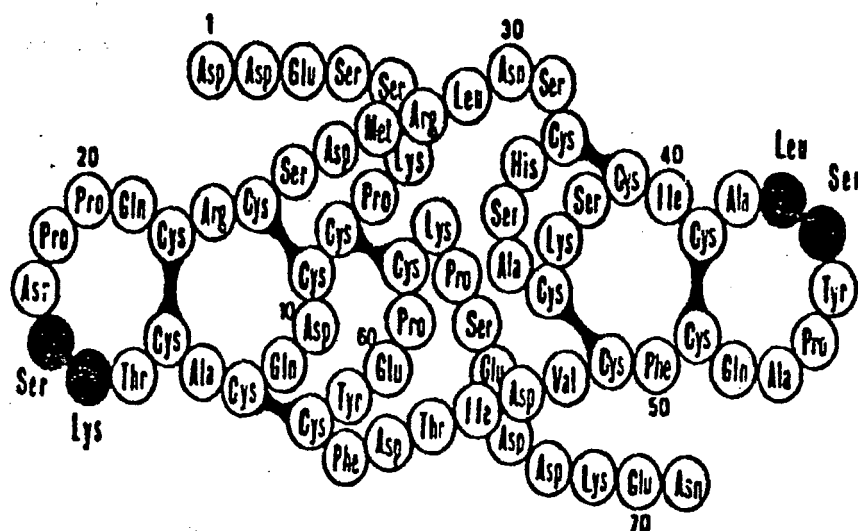


Figura 2: Molécula do inibidor de proteinase do tipo Bowman-Birk. Adaptado de Liener, 1994.

Em contraste ao inibidor do tipo Kunitz, os inibidores do tipo Bowman-Birk são muito ricos em pontes de dissulfeto. Essa característica é responsável pela estrutura tridimensional compacta e muito firme, revelada por cristalografia de raio-X e ressonância magnética nuclear.(Liener, 1994)

As seqüências de aminoácidos circundantes desses dois sítios reativos são notavelmente similares a outras e, alto grau de homologia tem sido encontrado entre os inibidores do tipo Bowman-Birk e um número de inibidores isolados de outras leguminosas.(Liener, 1994)

No Brasil , diversos pesquisadores têm purificado e caracterizado inibidores de proteinase de espécies tropicais. Negreiros et al., (1991) determinaram a seqüência completa de aminoácidos do maior inibidor de tripsina do tipo Kunitz de sementes de *Prosopis juliflora*. Souza et al., (1994) realizaram trabalhos de purificação e caracterização de inibidor de quimotripsina de sementes de *Schizobolium parahyba*. Batista et al., (1995)

determinaram a estrutura primária do inibidor de tripsina do tipo Kunitz encontrado em sementes de *Enterobolium contortisiliquum*. Paiva et al., (1996) caracterizaram o inibidor de tripsina de sementes de *Cratylia mollis*.

A capacidade do extrato de soja de inibir a atividade enzimática da tripsina foi inicialmente relatada por Read & Haas (Liener, 1994). Atualmente, sabe-se que a especificidade desses inibidores não é necessariamente restrita à tripsina, mas alguns deles podem inibir também quimotripsina, elastase, e um número de outras enzimas denominadas serina-proteinases, nas quais a serina está presente no sítio ativo.

2.2 Inibidores de Proteinase: Modo de Ação

No passado, dois modelos foram propostos para explicar os efeitos dos IPs sobre o crescimento e desenvolvimento de herbívoros. O primeiro mecanismo, baseado em resultados de experimentos com aves, propunha que a inibição de proteinases digestivas reduziria a digestão de dietas protéicas, por conseguinte reduzindo a disponibilidade de aminoácidos essenciais (Pearce et al., 1979, 1983).

Entretanto, o crescimento de ratos e camundongos foi reduzido pela adição de inibidores de tripsina, até mesmo quando eles foram adicionados em uma dieta contendo aminoácidos livres onde a digestão protéica não era necessária (Liener et al., 1949; Westfall et al., 1948). Posteriormente foi mostrado que, embora os IPs tenham um efeito negativo sobre as taxas de crescimento, a atividade proteolítica não diminuiu *in vivo* por estas formulações de inibidores. Lyman & Lepkovsky (1957) então propuseram um segundo mecanismo no qual a diminuição no crescimento foi devida à hiperatividade do pâncreas o qual respondeu à inibição pela síntese de grande quantidade de proteínas sensíveis, em um modo compensativo à falta de outras proteínas essenciais. A redução do crescimento em roedores foi então causada por um

grande incremento na demanda por aminoácidos a qual não poderia ser realizada.

Segundo Schuler (1998) a inibição direta das enzimas digestivas dos insetos não é considerado o principal efeito antimetabólico dos inibidores. De acordo com o autor o fator mais importante poderia ser a hipersecreção de enzimas digestivas causada pela presença dos inibidores, resultando numa carência de aminoácidos essenciais ao desenvolvimento normal dos insetos.

2.3 Inibidores de Proteinase: Efeitos sobre o desenvolvimento e metabolismo de insetos

Estudos desenvolvidos por Steffens et al. (1978), sobre os efeitos dos inibidores de tripsina de soja no crescimento e metamorfose de *Ostrinia nubilalis* (Hübner), revelaram que a incorporação de 2 a 5% (p/v) do inibidor do tipo Kunitz na dieta artificial, inibiu o crescimento larval e atrasou a pupação dos insetos, embora não tenha impedido a conclusão do ciclo vital.

Shukle e Murdock (1983), estudaram os efeitos do inibidor de tripsina do tipo Kunitz sobre o crescimento de lagartas de *Manduca sexta* e revelaram que esse inibidor, quando incorporado na dieta na concentração de 5% (p/v), promoveu um atraso no desenvolvimento larval. Segundo os autores, a concentração utilizada na dieta é semelhante à encontrada em muitas sementes de plantas leguminosas, ou seja, entre 3 a 4%.

Em outro trabalho sobre inibidores de proteinase em lagartas de *Spodoptera exigua*, Broadway & Duffey (1988), compararam os efeitos de dois IPs (inibidor de tripsina de soja e inibidor de proteinase de batata do tipo II). Quando incorporados à dieta artificial, nas concentrações de 0,04375 à 2,5 mg de inibidor por ml de dieta, ambos reduziram significativamente o crescimento e o desenvolvimento das lagartas. A ingestão crônica dos inibidores ocasionou elevação significativa nos níveis de atividade triptica. Segundo os autores, essa superprodução de proteinases decorrente da presença de inibidores teve um

efeito na disponibilidade de aminoácidos necessários à síntese de proteínas essenciais, o que resultou na inibição do crescimento larval.

Broadway & Duffey (1986a) foram os primeiros pesquisadores a examinarem os efeitos fisiológicos de IPs sobre a atividade de proteinases digestivas em insetos. A incorporação de inibidor de tripsina de soja e inibidor de tripsina de batata PIN2 em dietas de *Helicoverpa zea* e *Spodoptera exigua* resultou em uma pequena redução na taxa de crescimento. No entanto, a atividade trípica no intestino destas lagartas não foi reduzida, embora na ausência da exposição aos inibidores, os ensaios de inibição *in vitro* resultaram em 80% de diminuição na atividade.

Os inibidores de tripsina de "cowpea", os quais são pertencentes à uma pequena família de genes, da qual faz parte o inibidor do tipo Bowman-Birk, quando associados à dietas artificiais, mostraram ser agentes anti-metabólicos para insetos dos gêneros *Heliothis*, *Spodoptera*, *Diabrotica* e *Tribolium* (Hilder et al., 1987).

A qualidade protéica e sua influência no crescimento de lagartas de *S. exigua* e, na toxicidade aos inibidores de tripsina de soja, foi examinada por Broadway & Duffey (1988). Utilizando dietas artificiais contendo proteínas teste, os autores mostraram que a qualidade protéica não teve efeito significativo nas atividades trípicas intestinais das lagartas; no entanto, alterou significativamente a toxicidade dos inibidores de tripsina de soja para as mesmas, ou seja, quanto mais nutritiva a proteína, menos tóxica a ação do inibidor. As dietas ricas em lisina e arginina foram as que apresentaram efeitos mais significativos.

Johnson et al. (1989), estudaram a expressão dos inibidores do tipo I e II de tomate e do inibidor de batata do tipo II, sobre o mecanismo de defesa natural de plantas de fumo atacadas por lagartas de *Manduca sexta*. Os inibidores do tipo II, potentes inibidores de tripsina e quimotripsina, nas concentrações acima de 100µg/g de tecido foliar, reduziram drasticamente o crescimento larval. Por outro lado, o inibidor do tipo I de tomate, potente inibidor

de quimotripsina e um fraco inibidor de tripsina, teve um pequeno efeito inibitório no crescimento larval.

A fim de testar o efeito de inibidores de proteinase do tipo serina sobre o coleóptero *Acanthoscelides obtectus*, foi incorporado o inibidor do tipo Bowman-Birk (SBBI) à dieta artificial do inseto a fim de avaliar seus efeitos sobre o período de desenvolvimento e mortalidade. Foi constatado que o inibidor SBBI exerceu pequeno efeito nesses parâmetros, demonstrando que essa classe de inibidores tem maior eficiência entre os insetos que possuem enzimas digestivas do tipo serina, ou seja, insetos da Ordem Lepidoptera. (Hines et al., 1990).

Elden (1995) estudou os efeitos de inibidores de proteinase sobre o crescimento e desenvolvimento de *Hypera postica* (Coleóptera: Curculionidae). O autor observou um efeito significativo do inibidor do tipo Bowman-Birk, na concentração de 1,0% (p/v), sobre a quantidade de folhas consumidas pelas lagartas, pupação, e emergência dos adultos.

Pesquisas desenvolvidas por Jongsma et al. (1995), mostraram a adaptabilidade de lagartas de *Spodoptera exigua* quando alimentadas com plantas transgênicas de fumo expressando o inibidor de proteinase de batata do tipo 2. A análise da atividade trípica intestinal das lagartas revelou que somente 18% das proteinases larvais foram sensíveis à inibição por PIN2. A perda parcial da atividade trípica foi compensada por uma indução de 2,5-3,0 vezes maior de enzimas insensíveis ao PIN2. As proteinases intestinais das lagartas de *S.exigua* também mostraram-se insensíveis à inibidores de proteinase endógenos de plantas de fumo.

Os efeitos do inibidor de tripsina de soja do tipo kunitz, SBTI, sobre o crescimento e proteinases digestivas de *Spodoptera litura* foram estudados por McManus & Burgess (1995). Ensaios, *in vitro*, do inibidor com cada uma das enzimas e seus pH ótimos, revelaram que o inibidor foi muito efetivo para retardar a atividade de tripsinas, apresentou um leve efeito sobre a atividade de elastases e quimotripsinas e, foi completamente ineficaz sobre as

aminopeptidases. A incorporação do inibidor SBTI, na dieta de lagartas recém eclodidas, nas concentrações de 0,2 e 0,5% (p/v), retardou a taxa de crescimento quando comparada com lagartas que se alimentaram somente de dieta artificial. O atraso no crescimento resultou em diferenças de peso que foram observadas durante todo o período do ensaio, sendo correlacionadas à concentração do inibidor. A análise das proteinases digestivas dessas lagartas demonstrou que somente a atividade das tripsinas foi estimulada significativamente, quando alimentadas em dieta contendo SBTI.

Ferreira et al. (1994) em estudos sobre as propriedades digestivas e a permeabilidade da membrana periotrófica de lagartas de *S. frugiperda*, constataram que os valores de pH ótimos para tripsinas solúveis, utilizando-se BAPA e albumina como substrato, foram de 7,9 e 9,0 respectivamente. Segundo os autores, a atividade de tripsinas (utilizando-se BAPA ou albumina como substratos) foi anulada, *in vitro*, na presença de 16 μ M do inibidor de tripsina de soja. Baseado nestas observações, pode-se supor que os inibidores de proteinase de soja possam afetar o crescimento e a atividade das proteinases digestivas de *S. frugiperda*.

Terra & Ferreira (1994) realizaram um estudo de revisão no qual são descritos um conjunto de enzimas digestivas e suas propriedades, encontradas em insetos de diferentes Ordem. O estudo fornece subsídios importantes para que se possam encontrar relações entre os inibidores que tem sido isolados e as diferentes enzimas que participam do processo digestivo dos insetos.

Os efeitos de dietas protéicas acrescidas de inibidores de proteinase foram estudados por Markwick et al. (1995). Os autores encontraram uma relação linear entre ganho de peso larval médio e níveis de caseína na dieta de *Cydia pomonella* (L.). Quando IPs foram incorporados à dieta artificial, os efeitos sobre a taxa de crescimento de lagartas de *C. pomonella* foram mais pronunciados onde os níveis de caseína eram mais elevados. Os IPs de batata foram os mais efetivos na redução da taxa de crescimento, seguido de IPs de soja. No entanto, a mais significativa redução observada na taxa de

crescimento ocorreu com lagartas alimentadas com dieta contendo uma combinação de IP de batata e inibidor de carboxipeptidase.

Broadway & Villani (1995) examinaram a influência de inibidores de proteinase sobre as enzimas digestivas e desenvolvimento de insetos de diferentes Ordem. Estes autores verificaram que a ingestão crônica de inibidores de serina proteinase (STI) reduziu significativamente a atividade proteolítica, *in vivo*, daquelas espécies com hábitos alimentares relativamente especializados. No entanto, a ingestão crônica de STI não influenciou a sobrevivência de lagartas com hábitos alimentares relativamente generalizados. Baseados nestes resultados os autores propõem um mecanismo para seleção de IP para defesa fitoquímica contra insetos herbívoros.

Um interessante trabalho com o inibidor de proteinase do tipo Kunitz (SBTI) desenvolvido por Broadway (1997) revelou que a ingestão de SBTI por lagartas de *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon* e *Trichoplusia ni* aumentou o tempo de retenção do alimento no trato digestivo dos insetos e o nível de atividade de enzimas proteolíticas que foram susceptíveis à inibição por SBTI. O estudo revelou também que o incremento da atividade de enzimas resistentes à ação do SBTI foi diretamente influenciado pela dose e tempo de exposição ao inibidor. Baseada nestas observações, a autora sugere que um complexo sistema pode ser responsável pela regulação de enzimas proteolíticas no intestino de lagartas de lepidópteros.

Com o objetivo de identificar novos compostos que podem ser úteis ao controle dos afídios dos cereais, Tran et al. (1997) testaram cinco inibidores de proteinase de plantas em três espécies de afídios alimentados em dieta artificial. Os IPs de batata, quando incorporados em dieta artificial, na concentração de 1 mM, aumentaram a mortalidade entre o último instar dos afídios e reduziram a produção de ninfas nos bioensaios. Os IPs de soja apresentaram efeitos abióticos variáveis oscilando entre significativo e não significativo, dependendo da espécie de afídio analisada.

III - MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho desenvolveu-se conjuntamente no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas - Departamento de Genética, Laboratório de Biologia de Insetos - Departamento de Entomologia, ambos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – USP, e no Laboratório de Bioquímica de Insetos - Instituto de Química/USP.

3.1) Criação das lagartas em laboratório

Insetos

As lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797), Lepidoptera: Noctuidae, utilizadas nos ensaios bioquímicos e biológicos, foram criadas no Laboratório de Biologia de Insetos/ESALQ/USP à 25°C, 60 ± 10 % de Umidade Relativa e fotofase de 14 horas em dietas artificiais.

As lagartas foram mantidas (2/tubo) em tubos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura), tampados com algodão e alimentadas com dieta artificial, sendo que a dieta apresentava a seguinte composição (Perkins et al., 1973, adaptada por Parra, 1998).

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Agar | 25,5 g |
| Feijão | 165,0 g |
| Germe de trigo | 79,2 g |
| Levedura de cerveja | 50,5 g |
| Ácido ascórbico | 5,1 g |
| Ácido sórbico | 1,65 g |
| Metil p-hidroxibenzoato (nipagin) | 3,15 g |
| Água | 1195 ml |
| Formaldeído 10% | 12,5 ml |

* Quantidade suficiente para 100 tubos de dieta.

Foram estudados 3 tratamentos:

- 1- dieta artificial acrescida de IP de soja na concentração de 0,25% (p/v)
- 2- dieta artificial acrescida de IP de soja na concentração de 0,50% (p/v)
- 3- testemunha (sem inibidor)

3.2) Ensaios enzimáticos/bioquímicos

3.2.1 - Preparo do extrato intestinal de *S. frugiperda*

Lagartas no último instar larval foram imobilizadas em gelo por alguns minutos. Em seguida, com auxílio de microscópio estereoscópio e pinças, os intestinos foram dissecados em uma solução 125 mM de NaCl gelada, e a membrana peritrófica, que envolve o conteúdo alimentar dos insetos, foi separada da membrana do ventrículo (posicionada externamente à membrana peritrófica) e agrupadas em lotes.

Lotes de 5 intestinos por ml (membranas peritróficas juntamente com o conteúdo alimentar) foram homogeneizados em água Milli-Q gelada, utilizando-

se um homogeneizador Potter-Elvehjen. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à uma rotação de 15000 rpm, por 30 minutos, à 4°C. O sobrenadante resultante foi coletado, filtrado em algodão de vidro (para retenção das gorduras que poderiam afetar a determinação de proteína) (pelo método de Bradford) e armazenado em freezer -15°C (Ferreira et al., 1994a).

O nível de enzima a ser utilizado num ensaio só pôde ser descoberto por tentativa e erro. O produto formado deve ser facilmente medido sem exceder a capacidade do(s) método(s) na sua detecção (Terra & Ferreira, 1994). Por essa razão, a diluição de 50 vezes do homogeneizado de *S. frugiperda* (5 intestinos/ml) mostrou-se mais adequada.

3.2.2 - Determinação de proteína

A concentração de proteínas no extrato intestinal de lagartas de *S. frugiperda* foi determinada com base na metodologia descrita por Bradford (1976), em que 10 µl de extrato das amostras foram adicionados a 1ml do reagente de Bradford (50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, dissolvido em 25 ml de metanol, adicionando-se 50 ml de ácido fosfórico e completando-se o volume a 500 ml com água destilada) para reagir por 10 minutos. Após a reação, determinou-se a concentração protéica das amostras espectrofotometricamente com base na densidade ótica a 590 nm, tomando-se como base uma curva padrão construída com BSA (soro albumina bovina) com concentrações de proteína variando de 2,5 a 20 µg.

3.2.3 - Separação das proteinases intestinais do tipo tripsinas de lagartas de *S. frugiperda* pela coluna Metil HIC

Com a finalidade de isolar as enzimas do tipo tripsina de lagartas de *S. frugiperda* alimentadas em dieta artificial, foi utilizada a coluna Metil HIC (cromatografia de interação hidrofóbica).

Foi utilizado o tampão citrato fosfato na concentração 100 mM, pH 7,0, contendo 1,7 M de sulfato de amônio para equilibrar a coluna. Em seguida, foi realizado um gradiente decrescente na concentração de sulfato de amônio no mesmo tampão, de 1,7 a 0 M de sulfato de amônio. A amostra aplicada na coluna continha 1,7 M de sulfato de amônio para favorecer a interação com a matriz. Assim, foi utilizado o sistema de cromatografia da BioRad (Econo system) com um fluxo de 1ml/min., sendo o volume coletado por tubos de 1ml.

3.2.4 - Caracterização das enzimas do tipo tripsinas e quimotripsinas

Para a determinação da atividade triptica foi utilizado o substrato *N*-benzoyl-DL-arginine *p*-nitroanilide (BAPA). A atividade quimotriptica foi determinada usando-se o substrato *N*-succinyl-alanine-alanine-proline-phenylalanine *p*-nitroanilide (S(Ala)₂ProPhe-pNa).

O BAPA foi utilizado à uma concentração de 1 mM, enquanto o S(Ala)₂ProPhe-pNa utilizado a uma concentração de 0,1 mM. Cada substrato foi dissolvido em 0,8% (v/v) de dimetilformamida (solvente orgânico) e o volume completado com tampão CAPS (fervente, no caso do BAPA), em pH 9,0, o qual se mostrou ótimo a partir da na curva de pH ótimo, obtida anteriormente. A reação foi interrompida com ácido acético 30%, sendo em seguida feita a determinação da atividade enzimática em nmoles *p*-nitroanilina/min./mg proteína (Souza et al., 1995)

3.2.5 - Ensaio de pH ótimo para a tripsina e quimotripsina

Tampões numa faixa de pH entre 5,8 e 10,5 foram preparados em uma concentração de 0,2 M. Os tampões utilizados foram: fosfato de sódio (pH 5,8 a 8,0); Tris-HCl (pH 7,0 a 9,0) e glicina (pH 9,0 a 10,5) para o substrato BAPA, e fosfato de sódio (pH 5,8 a 8,0); Tris-HCl (pH 7,0 a 9,0) e Glicina (pH 9,0 a 10,5) para o substrato N(Ala)₂ProPhe pNa.

Os substratos foram preparados com o dobro da concentração utilizada nos ensaios (2 mM para o BAPA e 0,2 mM para o N(Ala)₂ProPhe pNa) e dissolvido em Dimetilformamida 0,8% e água Milli-Q (substitui o tampão e também deve estar em fervura para dissolver o BAPA).

Foram preparadas as misturas numa proporção de 1 substrato:1 tampão em diferentes pHs. Desta forma, a concentração do tampão foi diluída para 0,1 M, a do BAPA para 1mM e a do N(Ala)₂ProPhe pNa para 0,1 mM.

O homogeneizado de *S. frugiperda* (6 intestinos/ml) foi diluído 40 vezes e o pH nos tubos foi medido em ensaio a 30°C. Além do ensaio enzimático foram colocados no banho à 30°C as misturas (substrato e tampão); o padrão de pH e a água destilada para lavagem do eletrodo (para controle do pH a esta temperatura).

Foram feitas curvas de quatro tempos para cada pH (15, 30, 40 e 60 minutos) e a reação foi interrompida com ácido acético 30%.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda igual a 410 nm e determinada a atividade enzimática em nmoles de p-nitroanilina/min./mg de proteína para cada pH.

3.2.6 - Potencial de inibidores de proteinase sobre as enzimas digestivas de *S. frugiperda*

Foram utilizados os seguintes inibidores: Inibidores purificados do tipo Kunitz (Merck e Sigma), Bowman-Birk (Sigma) e precipitado protéico parcialmente purificado proveniente da extração de sementes de soja, variedade Cometa (o qual contém os IPs dos tipos Kunitz e Bowman-Birk).

3.2.7 - Extração e purificação parcial dos inibidores de proteinase a partir de sementes de soja.

Os inibidores de proteinase foram extraídos a partir de sementes de soja, variedade Cometa, por homogeneização de 100g de sementes de soja em 1.000 ml de tampão de extração (150 mM NaCl) durante uma hora. Em seguida o homogeneizado foi filtrado em gaze a fim de remover o material sólido. O filtrado foi centrifugado a 3.000g durante 20 minutos a 4°C. Após a centrifugação mediu-se o volume do sobrenadante o qual foi ajustado à 70% com acetona gelada em condições de agitação. Em seguida, a solução foi centrifugada a 6.000g durante 20 minutos à 4°C. O precipitado obtido foi liofilizado durante 72 horas para remoção da acetona residual e fornecer o inibidor semi-purificado de plantas de soja (adaptado de Broadway, 1994).

3.2.8 - Determinação da inibição *in vitro* da atividade proteolítica intestinal de *S. frugiperda* pelos inibidores de proteinase extraídos de soja.

A inibição da atividade triptica foi determinada pela medida da porcentagem de inibição da hidrólise do substrato BAPA pelos diferentes inibidores, conforme descrito por Souza *et al.* (1995); e a medida da porcentagem de inibição da quimotripsina sobre a hidrólise do substrato N(Ala)₂ProPhe pNa (Houseman & Philogène, 1988).

3.2.9 - Separação das proteinases digestivas de *S. frugiperda* em gel cilíndrico de poliacrilamida

Amostras do homogeneizado intestinal de lagartas de *S. frugiperda* (dieta artificial e dieta artificial acrescida de IP de soja) foram combinadas em uma

proporção 1:3 e 1:1 respectivamente ao tampão de amostra contendo 1,0ml de tampão Tris-HCl 0,5M pH 6,8, 1,6ml SDS 10%, 0,2ml bromofenol 0,05% (m/v), 0,8ml glicerol e 4,4 ml de água bidestilada.

As amostras foram aplicadas em géis cilíndricos de poliacrilamida (gradiente de 7,5% a 12%) de 0,5 cm de diâmetro por 9,0cm de comprimento.

Os géis são submetidos a uma voltagem de 100V a 4°C e a migração é acompanhada pela formação de uma linha de frente devido `a presença de azul de bromofenol no tampão de amostra. Após o processo eletroforético, os géis cilíndricos foram lavados durante 30 minutos em tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,5 TritonX-100 2,5% (v/v) para retirada do SDS presente no gel, sendo submetidos a três trocas de tampão durante o processo de lavagem.

Os géis foram fracionados com a utilização de um fracionador de géis de poliacrilamida (Auto gel divider-Savant Instruments Incorporation) em tampão Tris-HCl 0,1 M Triton X-100 2,5% (v/v). Frações de aproximadamente 2mm de gel foram coletadas e permaneceram a 4°C durante 12 horas para eluição. Alíquotas de cada uma das frações dos géis foram utilizadas para a realização das determinações de atividade de tripsina e quimotripsina. Para a determinação de atividade de enzimas semelhantes à tripsinas foram utilizados 10 µl de amostra do gel, 10 µl de substrato (N α -CBZ-L-Arginine 7-Amido 4-Methylcoumarin) e 1 ml de tampão (Tris-HCl 0,1 M pH 8,0) ensaiadas durante 45 minutos à 30 °C. Para a determinação de atividade de enzimas semelhantes à quimotripsinas foram utilizados 10 µl de amostra de gel, 10 µl de substrato (N-Succinyl-Ala-Ala-Phe 7 Amido 4-Methyl-Coumarin) e 1ml de tampão (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5) ensaiadas à 30 °C durante 3 horas.

3.3) Ensaio Biológicos

Lagartas de *S. frugiperda*, provenientes do Laboratório de Biologia de Insetos (Departamento de Entomologia ESALQ/USP) foram alimentadas em

dieta artificial (Tabela) contendo 0,00 , 0,25% e 0,50% (p/v) de IP parcialmente purificado de sementes de soja.

Foram avaliados os seguintes parâmetros biológicos: mortalidade inicial (5º dia), duração do período larval, duração do período pupal, peso médio de pupa com 24 h (média de machos e fêmeas) e mortalidade pupal.

IV) RESULTADOS

4.1) Ensaio enzimáticos/bioquímicos

4.1.1 - Caracterização das enzimas do tipo tripsinas e quimotripsinas de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797)

Observa-se a existência de mais de uma atividade trípica: a primeira em torno do pH 8,0, enquanto que uma segunda atividade foi encontrada em pH 10,5 (Figuras 3 e 4). Estes resultados estão de acordo com observações de Ferreira et al. (1994) que verificaram a presença de duas atividades trípicas principais de lagartas de *S. frugiperda*.

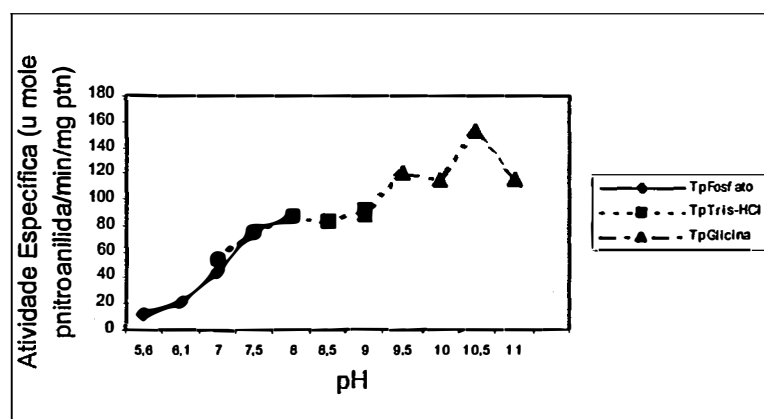


Figura 3: Curva de pH ótimo para a atividade proteolítica da enzima tripsina de *S. frugiperda* (substrato BAPA).

4.1.2 - Separação das proteinases intestinais do tipo tripsinas de lagartas de *S. frugiperda* pela coluna Metil HIC

Os resultados obtidos através da separação das enzimas semelhantes à tripsinas pela coluna Metil HIC (cromatografia de interação hidrofóbica) sugerem a existência de mais de um tipo de enzima com atividade semelhante às tripsinas no extrato intestinal de lagartas de *S. frugiperda*.

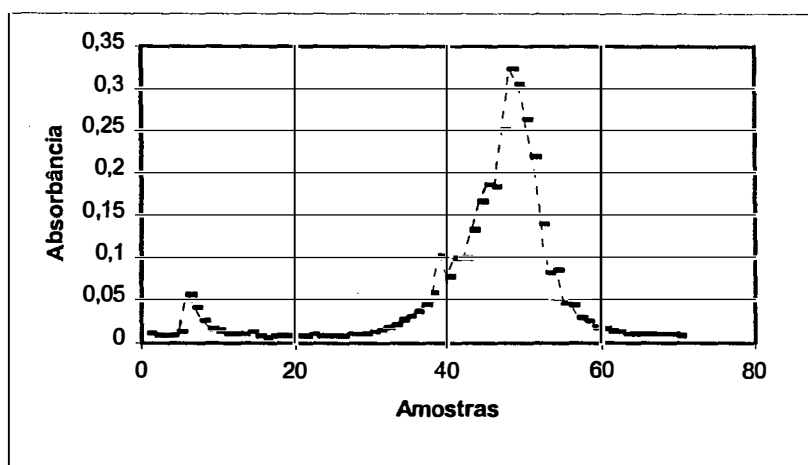


Figura 4: Curva obtida a partir da Coluna Metil HIC (cromatografia de interação hidrofóbica) de enzimas do tipo tripsina presentes no extrato intestinal de lagartas de *Spodoptera frugiperda*.

Ao contrário do observado com a tripsina, a quimotripsina apresenta apenas um pico de pH ótimo (7,0), sendo que neste pH ocorre a máxima hidrólise do substrato (maior atividade enzimática).

Em comparação com a tripsina, a quimotripsina apresenta uma atividade menor, ou seja, enquanto a tripsina possui um valor máximo de aproximadamente 0,4 mmoles de p-nitroanilina/min./mg de proteína, a

quimotripsina atinge aproximadamente 0,04 mmoles de p-nitroanilina/min./mg proteína. (Figura 5)

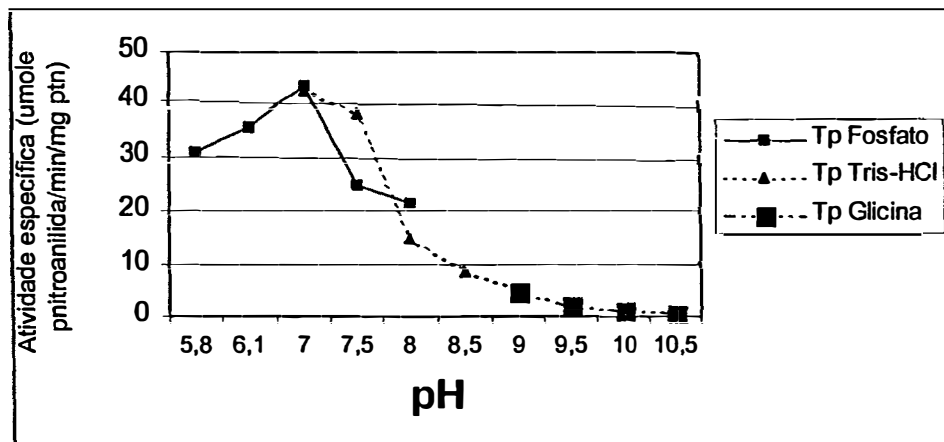


Figura 5: Curva de pH ótimo para a atividade proteolítica da enzima quimotripsina de *S.frugiperda* (substrato sintético = S(Ala)₂ProPhe pNa)

4.1.3 - Determinação da inibição *in vitro* da atividade proteolítica intestinal de lagartas de *S.frugiperda* pelos inibidores SBBI (Bowman-Birk) e SBTI (Kunitz) purificados (Sigma) e inibidores de proteinase extraídos de sementes de soja.

Os resultados indicam que o inibidor de proteinase do tipo Kunitz é mais eficiente que o inibidor de proteinase do tipo Bowman-Birk, principalmente na concentração de 0,5 μg do inibidor. Devido à grande semelhança entre os percentuais de inibição entre o IP do tipo Kunitz e o inibidor semi-purificado de soja, o ensaio sugere que o maior percentual de IPs no inibidor semi-purificado de soja seja do tipo Kunitz (Figura 6).

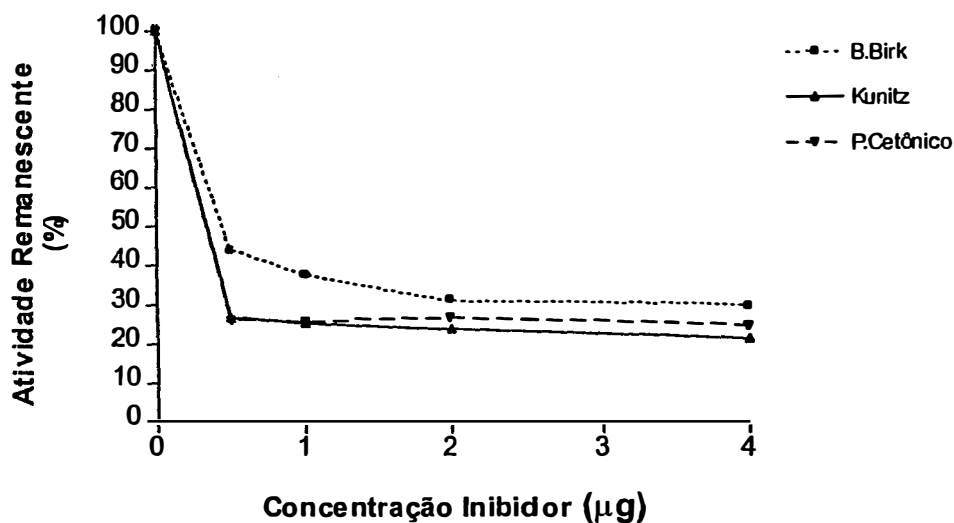


Figura 6: Efeito da concentração de diferentes inibidores de proteinase de soja sobre a atividade de enzimas do tipo tripsina de lagartas de *S. frugiperda*.

4.1.4 - Determinação da inibição *in vitro* da atividade proteolítica intestinal de lagartas de *S. frugiperda* pelo inibidor de soja semi-purificado.

O efeito do IP semi-purificado de soja sobre as proteinases do tipo das tripsinas e quimotripsinas é mostrado na Figura 7. Os resultados indicam que houve uma variação na atividade inibitória sobre as principais enzimas digestivas das lagartas. A atividade de tripsinas provenientes de lagartas de *S. frugiperda* foi significativamente afetada pelo inibidor de proteinase de soja semi-purificado (i.e. 85% de inibição), enquanto a atividade da quimotripsina foi moderadamente inibida (i.e. 54% de inibição) (Figura 7).

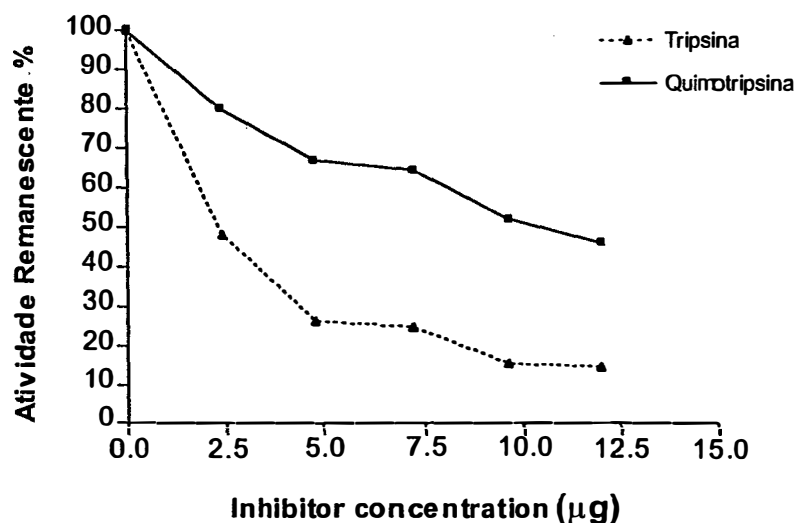


Figura 7: Efeito do inibidor de soja semi-purificado sobre enzimas do tipo tripsina (linha pontilhada) e quimotripsina (linha cheia) de lagartas de *S. frugiperda*.

4.2) Ensaios Biológicos

4.2.1) Fase larval

4.2.1.1) Mortalidade Inicial

Não houve variação significativa quanto à mortalidade inicial entre os tratamentos analisados. (Figura 8)

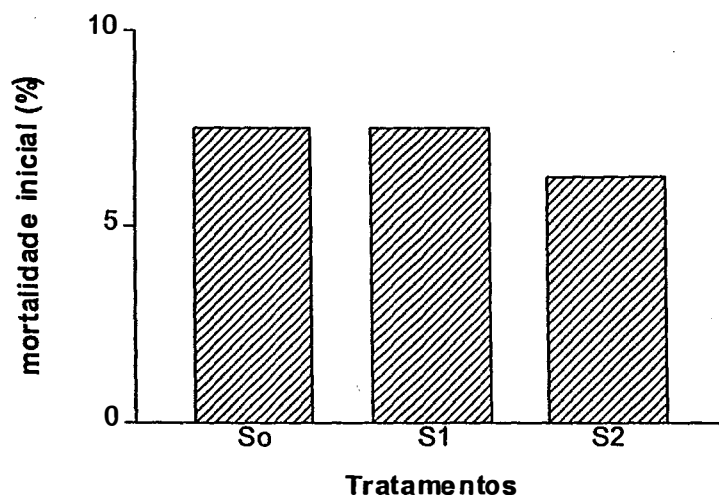


Figura 8: Mortalidade inicial de lagartas (5º dia) de *S. frugiperda* nos tratamentos com e sem adição de inibidor de soja em dieta artificial. S₀: 0% inibidor, S₁: 0,25% inibidor, S₂: 0,50% inibidor. Temp. 25 °C, UR 60 ± 10% e fotofase de 14 h.

4.2.1.2) Duração e viabilidade

Não ocorreu diferença significativa entre os períodos médios de desenvolvimento larval e viabilidade com relação aos diferentes tratamentos a que foram submetidas as lagartas de *S. frugiperda* (Figura 9). Os valores observados na presente pesquisa estão dentro da faixa de resultados obtidos por outros autores como: Bailey & Chada (1968); Ferraz (1982) e Marquez et al. (1963-1964).

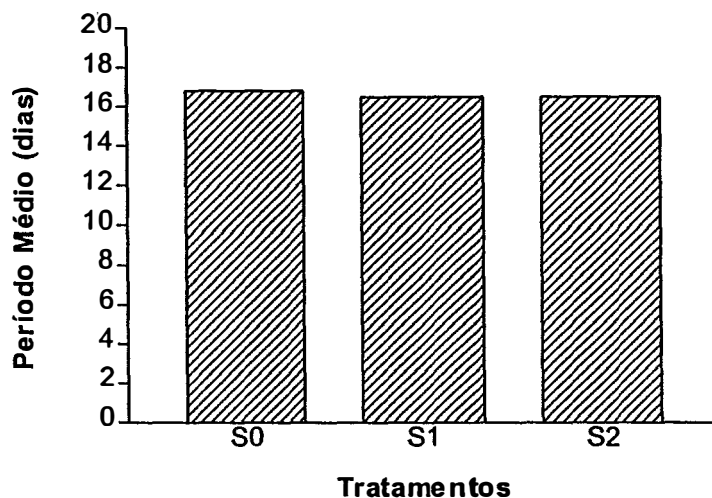


Figura 9: Duração do período larval de lagartas de *S. frugiperda* nos tratamentos com e sem adição de inibidor de soja. S₀: 0% inibidor, S₁: 0,25% inibidor, S₂: 0,50% inibidor. Temp. 25 °C, UR 60 ± 10% e fotofase de 14 h.

4.2.2) Fase Pupal

4.2.2.1) Mortalidade Pupal

Não houve diferença significativa quanto a mortalidade pupal entre os tratamentos analisados. (Figura 10)

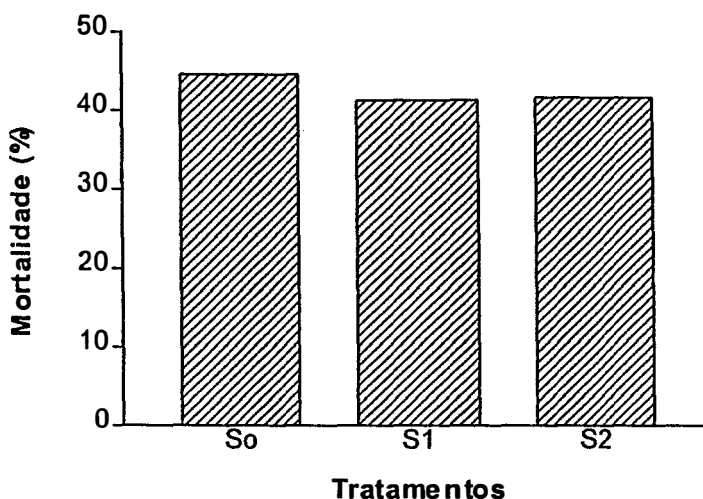


Figura 10: Mortalidade de pupas de *S. frugiperda* nos tratamentos com e sem adição de inibidor de soja. S₀: 0% inibidor, S₁: 0,25% inibidor, S₂: 0,50% inibidor. Temp. 25 °C, UR 60 ± 10% e fotofase de 14 h.

4.2.2.2) Duração, Peso e Viabilidade

A duração do período pupal, considerando-se a média de machos e fêmeas, não foi afetada pelo alimento fornecido às lagartas de *S. frugiperda* contendo ou não inibidor de soja, não havendo diferença na duração entre os diferentes tratamentos. (Figura 11). A redução da fase pupal por fatores ambientais em *S. frugiperda* já foi reportada em trabalhos prévios. Marquez et al. (1963-1964); Kasten Jr. et al. (1978); Ferraz (1982) e Parra & Carvalho (1984), o que sugere que os inibidores de proteinase de soja tenham um pequeno efeito no metabolismo das lagartas.

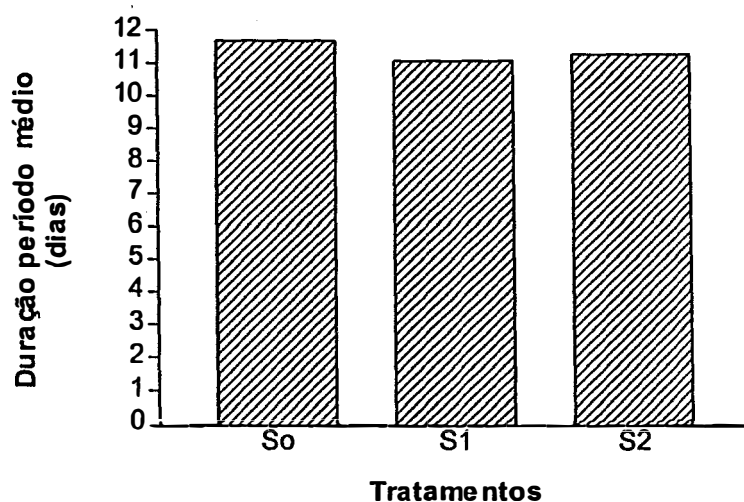


Figura 11: Duração do período pupal médio de *S. frugiperda* nos tratamentos com e sem adição de inibidor de soja. S₀: 0% inibidor, S₁: 0,25% inibidor, S₂: 0,50% inibidor. Temp. 25 °C, UR 60 ± 10% e fotofase de 14 h.

O peso médio de pupas considerado conjuntamente (média de machos e fêmeas) não foi afetado significativamente pelos diferentes tratamentos (Figura 12). A mortalidade de pupas analisadas (machos e fêmeas) também não foi afetada significativamente pelos diferentes tratamentos analisados.(Figura 13).

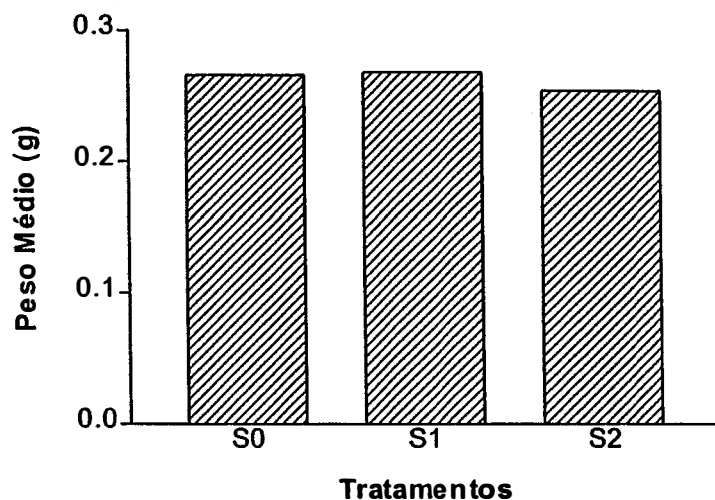


Figura 12: Peso médio de pupas de *S. frugiperda* nos tratamentos com e sem adição de inibidor de soja. S₀: 0% inibidor, S₁: 0,25% inibidor, S₂: 0,50% inibidor. Temp. 25 °C, UR 60 ± 10% e fotofase de 14 h.

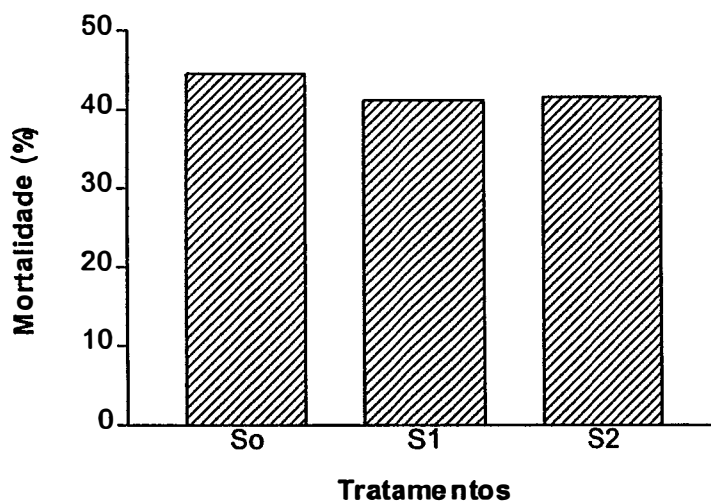


Figura 13: Mortalidade de pupas de *S. frugiperda* nos tratamentos com e sem adição de inibidor de soja. S₀: 0% inibidor, S₁: 0,25% inibidor, S₂: 0,50% inibidor. Temp. 25 °C, UR 60 ± 10% e fotofase de 14 h.

4.3 - Ensaio bioquímicos seguintes aos ensaios biológicos

4.3.1 - Inibição *in vitro* da atividade trípica larval de *S. frugiperda* posteriormente à ingestão de inibidores de proteinase de soja

Extratos intestinais obtidos de lagartas alimentadas à base de dieta artificial sem inibidor, quando ensaiados com concentrações crescentes de inibidores de proteinase de soja semi-purificados, apresentaram uma significativa redução na atividade trípica. Um resultado interessante é que a porcentagem de inibição em extratos obtidos de lagartas alimentadas com dieta contendo 0,5% de IPs de soja, foi significativamente inferior (Fig. 14).

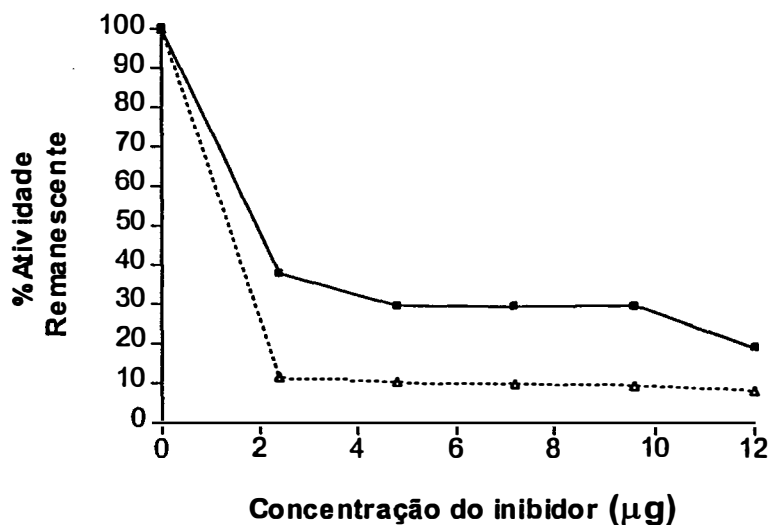
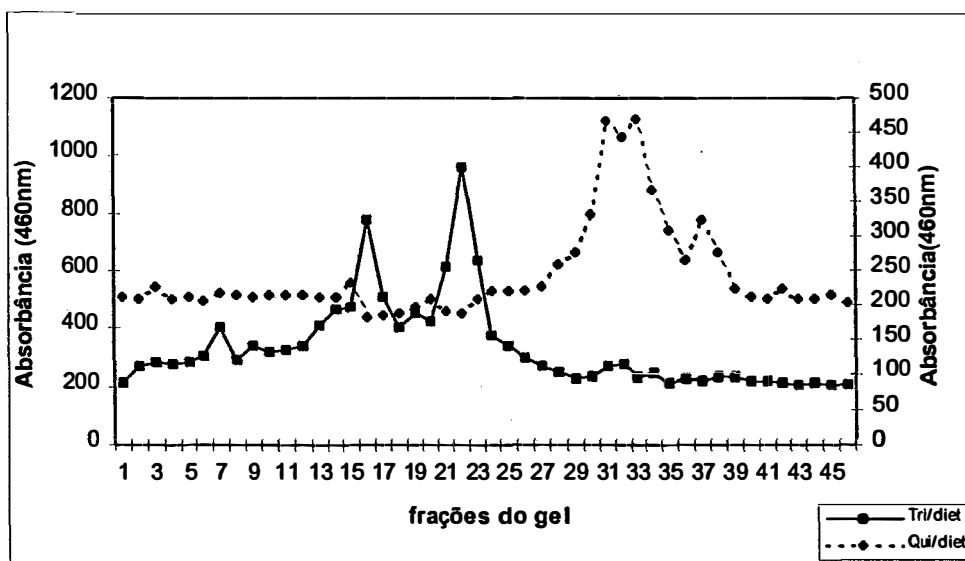


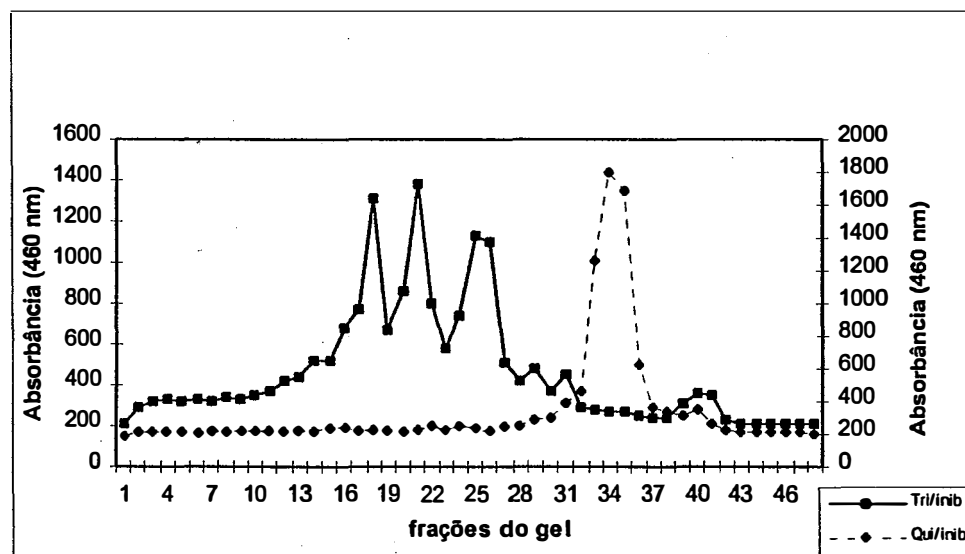
Fig. 14: Efeito de diferentes concentrações de inibidores de proteinase de soja parcialmente purificados sobre a atividade trípica de extratos intestinais de lagartas cultivadas em dieta artificial em presença (linha cheia) ou ausência (linha pontilhada) de IPs.

4.3.2 - Atividade tríptica e quimotríptica de lagartas de *S. frugiperda* seguinte à ingestão de IP de soja.

Os resultados obtidos revelam a existência de um terceiro pico de atividade semelhante às tripsinas (Fig. 15 A). Por outro lado, extratos de lagartas alimentadas na ausência de inibidores apresentam apenas dois picos de atividade. Uma outra observação interessante está relacionada à atividade das quimotripsinas. Lagartas que alimentaram-se de dietas contendo inibidores de proteinase de soja apresentam um significativo aumento da atividade quimotríptica (Fig. 15 B).



A



B

Figura 15: a) Separação das tripsinas e quimotripsinas de *S. frugiperda* provenientes de lagartas alimentadas com dieta artificial (S₀). b) Separação das tripsinas e quimotripsinas de *S. frugiperda* provenientes de lagartas alimentadas com dieta artificial acrescida de 0,50% (p/v) de IPs de soja (S₂).

V - DISCUSSÃO

5.1 – Caracterização das principais proteinases intestinais de lagartas de *S. frugiperda* e ensaios de inibição com inibidores de proteinase de soja

O presente trabalho foi iniciado com a caracterização das principais proteinases digestivas de lagartas de *S. frugiperda*. Os tipos principais de proteinases do tipo das serinas foram determinados usando-se substratos e inibidores específicos. Os resultados confirmaram dados previamente observados os quais sugeriam a presença de três atividades proteolíticas principais: duas semelhantes às tripsinas e uma atividade quimotríptica (Ferreira *et al.*, 1994a). As tripsinas atacam ligações peptídicas seguindo uma arginina ou lisina e desta forma, o substrato BAPA é específico para esta enzima (Terra & Ferreira, 1994)). Por outro lado, a quimotripsina hidrolisa ligações peptídicas seguindo uma cadeia lateral aromática, de forma que o substrato S(Ala)₂ProPhe-pNA é um ótimo substrato para esta enzima (Kraut, 1977). Além disso, os pH ótimos para as tripsinas foram de 8,0 e 10,5, respectivamente. A presença de atividades proteolíticas alcalinas têm sido amplamente reportados (ver revisão de Terra & Ferreira, 1994), sendo que em muitos casos são encontradas atividades trípticas em pHs altamente alcalinos (Houseman & Philogéne, 1988; Galgaro *et al.*, 1999). Estes resultados estão de acordo com as condições alcalinas encontradas no intestino médio dos insetos (Johnston *et al.*, 1991). As análises indicaram ainda que lagartas de *S.*

frugiperda dependem de enzimas do tipo das tripsinas em uma maior extensão do que enzimas do tipo das quimotripsinas. Estes dados sugerem que inibidores de tripsina podem ser mais efetivos do que inibidores de quimotripsina nesta espécie. A presença de uma atividade quimotríptica inferior às atividades trípticas é comumente encontrada em insetos da ordem Lepidoptera (Christeller et al., 1992), apesar de poucos insetos terem sido caracterizados até 1990 (Bauman, 1990). Por exemplo, nenhuma atividade quimotríptica foi encontrada em *Helicoverpa armigera* usando-se substratos específicos (Johnston et al., 1991) ou lagartas de *Spodoptera litura* (Ahmad et al., 1980). Além disso, o pH ótimo de 8,0 para a quimotripsina está dentro da faixa normalmente encontrada para esta ordem de insetos, ou seja, entre 8,0 e 9,0. A partir da caracterização das proteinases digestivas, foram iniciados os ensaios de inibição usando-se primeiramente, os seguintes inibidores provenientes da soja: Kunitz (SBTI) e Bowman-Birk (SBBI). Conforme resultados prévios, o inibidor de proteinase de soja foi capaz de inibir totalmente a ação das tripsinas de *S. frugiperda* (com os substratos BAPA ou albumina) (Ferreira et al., 1994b). Os ensaios de inibição de proteinases digestivas *in vitro* são importantes pois permitem avaliar, ainda que com algumas restrições, o potencial dos diferentes inibidores. Consequentemente, podem ser desenvolvidas novas estratégias de controle visando reduzir os danos causados pelos insetos herbívoros (Christeller & Shaw 1989). Assim sendo, os resultados mostraram que o IP do tipo SBTI foi mais eficiente contra a atividade proteolítica das tripsinas das lagartas em relação ao SBBI. A inibição observada foi cerca de 75%. Resultados semelhantes com outros insetos foram observados por Purcell et al. (1992), quando os níveis de inibição pôr SBTI variaram entre 63-72%. Paralelamente aos ensaios com os inibidores de soja SBTI e SBBI purificados, foi obtido um extrato protéico parcialmente purificado a partir de sementes de soja. Esta etapa foi realizada com o objetivo de incorporar os IPs em dietas artificiais de *S. frugiperda*, uma vez que são necessárias quantidades expressivas de inibidores. A quantificação dos IPs no extrato protéico foi de

cerca de 12%. Grãos de soja secos apresentam cerca de 20-36% de proteína (p/p), com cerca de 6% de IPs da proteína total. (Jongsma & Bolter, 1997). Portanto, pragas de grãos armazenados de soja encontram cerca de 1-2 mM IPs nas sementes (Jongsma & Bolter, 1997). Nas folhas, entretanto, a concentração de IPs é muito inferior, cerca de 10-50 μ M (Jongsma *et al.*, 1994). Os ensaios de inibição com este extrato de inibidores semi-purificado mostraram que a maior parte dos IPs encontrados nas sementes é do tipo do SBTI. Portanto, a presença do IP do tipo SBBI na variedade de soja utilizada é bastante inferior à concentração do SBTI.

5.2 - Ensaio biológicos

Diversos trabalhos na literatura mostram os efeitos, *in vivo*, dos inibidores de proteinase do tipo Kunitz e Bowman-Birk sobre o desenvolvimento larval (Shade *et al.*, 1986), peso de pupas (Duan *et al.*, 1996), emergência de adultos (Thomas *et al.*, 1995), fecundidade (Spates, 1979, Deloach & Spates, 1980) e viabilidade total do ciclo dos insetos (Gatehouse *et al.*, 1979; Gatehouse & Boulter, 1983; Shade *et al.*, 1986), entre outros, quando incorporados em dieta artificial ou expressos em plantas.

Baseados nos ensaios de inibição *in vitro*, foram iniciados ensaios biológicos a partir da incorporação do IP semi-purificado de soja em dietas artificiais de *S. frugiperda*. Normalmente, são usadas concentrações de IPs nas dietas que variam de 0,02-20% (p/v), ou seja, 0,01-13 mM, largamente superiores aos níveis encontrados nas plantas. No presente trabalho, foram usadas três concentrações de IPs semi-purificados de soja nas dietas artificiais de *S. frugiperda*: 0, 0,2 e 0,5%. Apesar de uma efetiva inibição das atividade proteolíticas *in vitro*, nenhum dos parâmetros biológicos analisados (mortalidade inicial e duração do período larval, mortalidade, duração e peso pupal) mostrou uma variação em relação ao controle. Estas observações dos ensaios *in vivo*

frequentemente não correspondem aos dados de inibição obtidos *in vitro* (ver revisão de Jongsma & Bolter, 1997).

Considerando-se os resultados obtidos nos bioensaios, observa-se que as lagartas de *S. frugiperda* foram capazes de adaptar-se à uma dieta contendo inibidores de proteinase de soja. Esta adaptação de *S. frugiperda* reforça sua condição de inseto polífago. Portanto, sua capacidade de atacar diferentes hospedeiros pode estar relacionada à sua capacidade adaptativa à diferentes hospedeiros.

A partir dos resultados obtidos com os bioensaios, investigamos o mecanismo das lagartas responsável pela adaptação do inseto ao IP presente na dieta. Assim, foram analisados extratos intestinais de lagartas alimentadas com as dietas contendo inibidores.

5.3 - Ensaio bioquímicos seguintes à ingestão de IPs pelas lagartas de *S. frugiperda*

Vários trabalhos na literatura têm demonstrado que os insetos apresentam a capacidade de adaptarem-se a plantas transgênicas ou dietas artificiais contendo inibidores de proteinase. Basicamente são três os mecanismos empregados. Primeiramente, a síntese de proteinases insensíveis ao inibidor. Resultados recentes têm demonstrado que alguns insetos polípagos apresentam uma grande família multigênica responsável pela síntese de dezenas de proteinases do tipo das tripsinas e quimotripsinas (Jongsma et al., 1995; Gatehouse et al., 1997; Broadway, 1997).

O segundo mecanismo adaptativo foi observado em larvas de coleópteros (Girard et al., 1998), e em lagartas de *Helicoverpa armigera* (Giri et al., 1998) as quais desenvolveram a capacidade de clivar os inibidores via proteinases digestivas.

Finalmente, um terceiro mecanismo foi recentemente observado em lagartas de *Heliothis virescens* alimentadas com discos foliares de plantas

transgênicas ou não transformadas de fumo. Neste caso, os resultados indicam que as lagartas são capazes de formar complexos de alto peso molecular (oligômeros) com as proteinases do tipo das tripsinas, o que impediria o acesso do inibidor (Brito et al, manuscrito em preparação).

No presente trabalho, o mecanismo adaptativo desenvolvido pelas lagartas de *S. frugiperda* está provavelmente relacionado à alteração na expressão das proteinases do tipo das serinas. Os resultados mostram o aparecimento de uma nova atividade trípica, além de uma aumento de 2,5 vezes na atividade da quimotripsina. Reforçando estes dados, são os resultados de inibição *in vitro* a partir dos extratos intestinais das lagartas que alimentaram de dieta contendo 0,5% do IP semi-purificado de soja. A inibição das proteinases foi significativamente inferior em relação às lagartas que não foram alimentadas com dieta contendo inibidor.

Os inibidores de proteinase têm sido considerados como agentes naturais de controle contra insetos herbívoros. Experimentos *in vivo* têm mostrado uma redução da atividade proteolítica de enzimas digestivas e alterações no desenvolvimento larval de um número de diferentes espécies de coleópteros e lepidópteros (Broadway et al., 1986; Christeller & Shaw, 1989; Hilder et al., 1989; Johnson et al., 1989; Johnston et al., 1993; Oppert et al., 1993). Por outro lado, um número crescente de trabalhos tem demonstrado que os insetos são capazes de adaptarem-se a presença de IPs em suas dietas (Jongsma & Bolter 1997; Gatehouse et al., 1997; Broadway 1997). Sustentando estes estudos, foi demonstrado neste trabalho que lagartas de *S. frugiperda* possuem pH alcalino em seus extratos digestivos, os quais apresentam atividade proteolítica que foram inibidas, *in vitro*, com inibidores de proteinase de soja.

Comparando os resultados para a espécie que foi testada nos bioensaios, a ingestão de inibidor de soja semi-purificado não resultou em uma redução significativa do crescimento e desenvolvimento de lagartas de *S. frugiperda*. A atividade de enzimas semelhantes à tripsinas e quimotripsinas provenientes de

larvas de *S. frugiperda* não foi significativamente inibida *in vivo* por inibidores de tripsina/quimotripsina de soja. Lagartas de *S. frugiperda* são polípagas, ou seja, alimentam-se de um grande número de plantas hospedeiras, e podem ter desenvolvido proteinases que possuem reduzida afinidade por inibidores de serina proteinases de plantas de soja. Para entender o mecanismo adaptativo das lagartas, é necessário entender a interação entre o inibidor e a enzima. Os IPs ligam-se ao sítio ativo do substrato das enzimas proteolíticas. Por exemplo, enzimas semelhantes à tripsinas reconhecem os resíduos de aminoácidos arginil e lisil. Entretanto, o sítio de inibição de um inibidor de tripsina inclui também um resíduo arginil ou lisil. Em adição a este sítio, existe contato entre os aminoácidos que circundam o sítio de inibição do inibidor e da enzima. A força da interação enzima-inibidor é determinada pela compatibilidade de todos os resíduos de aminoácidos em contato.(Laskowski, 1985). Por isso, embora os inibidores de serina proteinase, em geral, possam contribuir para a defesa das plantas contra organismos invasores, a eficiência de um inibidor específico é dependente da compatibilidade estrutural do sítio reativo do inibidor de proteinase de planta com o sítio de ligação do substrato da proteinase no organismo alvo. Enzimas semelhantes à tripsinas e quimotripsinas provenientes de intestinos de lagartas de *S. frugiperda* podem ter passado por substituições nos aminoácidos que circundam o sítio de ligação do substrato, resultando em fraca interação envolvendo as enzimas digestivas larvais e o inibidor de proteinase de soja.

VI - CONCLUSÕES

Tendo como base os resultados obtidos podemos inferir que:

As lagartas de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) possuem atividade ótima de proteinases intestinais em pH alcalino, que são inibidas *in vitro* por IPs de soja semi-purificados. No entanto, os IPs de soja quando incorporados em dietas artificiais, não possuem efeitos significativos sobre o desenvolvimento e metabolismo de lagartas de *S.frugiperda*. Tal mecanismo adaptativo está provavelmente relacionado à expressão diferencial de proteinases pelas lagartas, traduzida na expressão de uma terceira enzima semelhante à tripsina e à maior atividade de enzimas semelhantes à quimotripsinas.

Estas inferências estão restritas às condições do presente experimento onde a dieta artificial fornecida às lagartas apresentava todos os componentes essenciais ao desenvolvimento das lagartas em condições de laboratório.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, Z.; SALEEMUDDIN, M.; SIDDI, M. Purification and characterization of three alkaline proteases from the gut of the larvae of armyworm, *Spodoptera litura*. **Insect Biochemistry**, v.10, p.667-673, 1980.
- BAILEY, D.L.; CHADA, H.L. Effects of natural (sorghum) and artificial (wheat germ) diets on development of the corn earworm, fall armyworm, and southwestern corn borer. **Journal of Economic Entomology**, v.61(1), p.257-260, 1968.
- BAUMANN, E. Isolation and partial characterization of a chymotrypsin-like endoprotease from cockroach intestinal system. **Insect Biochemistry**. v.20, p.761-768, 1990.
- BIRK, Y.; APPLEBAUM, S.W. Effect of soybean trypsin inhibitors on the development and midgut proteolytic activity of *Tribolium castaneum* larvae. **Enzymologia** , v.22, p.318-326, 1960.
- BOLTER, C.; JONGSMA, A.M. Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. **Journal of Insect Physiology**, v.41, p.1071-1078, 1995.
- BRADFORD, M. M. Interaction of partially purified amylases from *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) with amylase inhibitors from wheat. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.93B, p.239-246, 1976.
- BROADWAY, R. M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitor? **Journal of Insect Physiology**, v.41, p.107 –116, 1995.

- BROADWAY, R. M. Resistance of plants to herbivorous insects: Can this resistance fail? **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.18, p.476-481, 1996.
- BROADWAY, R. M. Dietary Regulation of Serine that are Resistant to Serine Proteinase Inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v.43, p.855-874, 1997.
- BROADWAY, R.M.; DUFFEY, S.S.; PEARCE, G.; RYAN, C.A. Plant proteinase inhibitors: A defense against herbivorous insects? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.41, p.33-38, 1986.
- 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**, v.32, p.827-833, 1986.
- BROADWAY, R.M.; DUFFEY, S.S. The effect of plant protein quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v.34, p.1111-1117, 1988.
- BROADWAY, R. M.; VILLANI, M.G. Does host range influence susceptibility of herbivorous to non-host plant proteinase inhibitors? **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.76, p.303-312, 1995.
- CARVALHO, R.P.L. Danos, flutuação da população, controle e comportamento de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith) e susceptibilidade de diferentes genótipos de milho, em condições de campo. Piracicaba, 1970. 170p.

Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura " Luiz de Queiroz ",
Universidade de São Paulo.

CHRISTELLER, J.T.; LAING, W.A.; MARKWICK, N.P.; BURGESS, E.P.J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.22, p.735-746, 1992.

DELOACH, J.R.; SPATES, G.E. Effect of soybean trypsin inhibitor-loaded erythrocytes on fecundity and midgut protease and hemolysis activity of stable flies. **Journal of Economic Entomology**, v.73, p.590-594, 1980.

DUAN, X.; LI, X.; XUE, Q.; ABO-EL-SAAD, M.; XU, D.; WU, R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitors II gene are insect resistant. **Nature**, v.14, p.494-498, 1996.

ELDEN, T. C. Selected proteinase inhibitors. Effects on Alfafa weevil (Coleoptera: Curculionidae) growth and development. **Journal of Economic Entomology**, v.88, p.1586-1590, 1995.

FERRAZ, M.C.V.D. Determinação das exigências térmicas de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em cultura de milho. Piracicaba, 1982. 81p. Dissertação (M.S.) - Escola Superior de Agricultura " Luiz de Queiroz ", Universidade de São Paulo.

FERREIRA, C.; CAPELLA, A.; SITNIK, R.; TERRA, W.R. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.107A, p.631-641, 1994 a.

FOARD, D. E.; MURDOCK, L.L.; DUNN, P.E. Engineering of crop plants with resistance to herbivores and pathogens: An approach using primary gene products. **Plant Molecular Biology**, v.2, p.223-233, 1983.

GATEHOUSE, A.M.R.; GATEHOUSE, J.A.; DOBIE, P.; KILMINSTER, A.M.; BOULTER, D. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.30, p.948-958, 1979.

GATEHOUSE, A.M.R.; BOULTER, D. Assessment of the antimetabolic effects of trypsin inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*) and other legumes on development of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.34, p.345-350, 1983.

GATEHOUSE, A.M.R.; DAVISON, G.M.; NEWELL, C.A.; MERRYWEATHER, A.; HAMILTON, W.D.O.; BURGESS, E.P.J.; GILBERT, R.J.C.; GATEHOUSE, J.A. Transgenic potato plants with enhanced resistance to tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trials. **Molecular Breeding**, v.31, p.49-63, 1997.

GIRARD, C.; METAYER, M.LE.; BONADÉR-BOTTINO.; PHAM-DELEGUE, M-H.; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 28, p.229-237, 1998.

GIRI, A.P.; HARSULKAR, A.M.; DESHPANDE, V.V.; SAINANI, M.N.; GUPTA V.S.; RANJEKAR, P.K. Chickpea defensive proteinase inhibitors can be inactivated by podborer gut proteinases. **Plant Physiology**, v.116, p.393-401, 1998.

HILDER, V. A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v.330, p.161-163, 1987.

HOUSEMAN, J. G.; PHILOGÈNE, B.J.R. Partial characterization of proteinase activity in the larval midgut of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae). **Canadian Journal of Zoology**, v.67, p.864-868, 1988.

JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; AN, G.; RYAN, C. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. **Proceedings of the National Academy of Science. USA**, v.86, p.9871-9875, 1989.

JOHNSTON, K. A.; LEE, M.J.; GATEHOUSE, J. A.; ANSTEE, J.H. The partial characterization of serine protease activity in midgut of larval *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry**, v.21, p.389-397, 1991.

JOHNSTON, K. A.; GATEHOUSE, J.A.; ANSTEE, J.H. Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Physiology**, v.39, p.657-664, 1993.

JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMÁ, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of proteinase activity insensitive of inhibition. **Proceedings of the National Academy of Science. USA**, v.92, p.8041-8045, 1995.

- JONGSMA, M.A.; BOLTER, C.. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v.43, p.885-895. 1997.
- JONGSMA, M. A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; STIEKEMA, W.J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Science**. USA, v.92, p.8041-8045, 1995.
- KASTEN JUNIOR, P.; PRECETTI, A.A.C.M.; PARRA, J.P.P. Dados biológicos comparativos de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) em duas dietas artificiais e substrato natural. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v.53(1/2), p.68-78, 1978.
- KRAUT, J. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. **Annual Review of Biochemistry**, v.46, p.331-358, 1997.
- LASKOWSKI, M. Protein inhibitors of serine proteinases: mechanism and classification. In Friedman (ed.), **Nutritional and Toxicological Significance of Enzyme Inhibitors in Foods**, New York, Plenum Press, 1985, p.1-17.
- LAROCQUE, A. M.; HOUSEMAN, J. G. The effect of ingested soybean, ovomucoid and corn trypsin inhibitor on digestive processes of the European corn borer. **Journal of Insect Physiology**, v.36, p.691-697, 1990.
- LIENER, I. E. Implications of Antinutritional Components in Soybean Foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.34, p.31-67, 1994.

- LORITO, M.; BROADWAY, R.M.; HAYES, C.K.; WOO, S.L.; NOVIELLO, C.; WILLIAMS, D.L.; HARMAN, G.E. Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicide. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v.7, p.525-527, 1994.
- MARQUEZ, S.A.; VILARREAL, J.F.; SCHALLENMUELLER, D.E.; VEILARD, J.M. Estudios biológicos del gusano cogollero. **Informe Anual de Investigacion**, Monterrey, v.9, p.27-32, 1963/1964.
- McMANUS, M. T.; WHITE, D.W.R.; MCGREGOR, P.G. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. **Transgenic Research**, v.3, p.50-58, 1994.
- McMANUS, M. T.; BURGESS, E.P.J. Effect of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteinases of larvae of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**, v.41, p.731– 738, 1995.
- NALIM, D.M. Biologia , nutrição quantitativa e controle de qualidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) em duas dietas artificiais. Piracicaba, 1991. 150p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura " Luiz de Queiroz ", Universidade de São Paulo.
- OPPERT, B.; MORGAN,T.D.; CULBERTSON, C.; KRAMER, K.J. Dietary mixtures of cysteine and serine proteinase inhibitors exhibit synergistic toxicity toward the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.105C, p.379-385, 1993.
- OROZCO-CARDENAS, M.; MCGURL, B.; RYAN.; C.A. Expression of an antisense prosystemin gene in tomato plants reduces resistance toward

Manduca sexta larvae. **Proceeding of National Academy of Science**. USA, v.90, p.8273-8276, 1993.

PARRA, J.R.P. Criação de insetos para estudos com patógenos, in S.B.Alves (ed.), **Controle Microbiano de insetos**. Piracicaba, Fealq, 1998. Cap.35, p.1015-1038.

PERKINS, W.D.; JONES, R.L.; SPARKS, A.N.; WISEMAN, D.R.; SHOW, J.W.; McMILLIAN, W.W. Artificial diet for mass rearing of corn earworm (*Heliothis zea*). ARS. USDA, **Production Research Reports**. v.154, p.01-07, 1973.

PURCELL, J. P.; GREENPLATE, J.T.; SAMMONS, R.D. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.22, p.41-47, 1992.

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

SHUKLE, R. H.; MURDOCK, L.L. Lipoxigenase, trypsin inhibitor, and lectin from Soybeans: Effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). **Environmental Entomology**, v.12, p.787-791, 1983.

SOUZA, E. M.; MIZUTA, K.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A.M. Purification and partial characterization of a *Schizobolium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **Phytochemistry**, v.39, p.521-525, 1995.

- SHADE, R.E.; MURDOCK, L.L.; FOARD, D.E.; POMEROY, M.A. Artificial seed system for bioassay of cowpea weevil (Coleoptera: Bruchidae) growth and development. **Environmental Entomology**, v.15, p.1286-1291, 1986.
- SPATES, G.E. Fecundity of the stable fly: Effect of soybean trypsin inhibitor and phospholipase A inhibitor on the fecundity. **Annals of the Entomological Society of America**, v.72, p.845-849, 1979.
- STEFFENS, R.; FOX, F.R.; KASSELL, B. Effect of trypsin inhibitors on growth and metamorphosis of corn borer larvae *Ostrinia nubilalis* (Hubner). **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.26, p.170-174, 1978.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Further evidence that enzymes involved in the final stages of digestion by *Rhynchosciara* do not enter the endoperitrophic space. **Insect Biochemistry**, v.13, p.143-150, 1983.
- TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.109B, p.1-62, 1994.
- THOMAS, J.C.; ADAMS, D.G.; KEPPENE, V.D.; WASMANN, C.C.; BROWN, J.K.; KANOST, M.R.; BOHNERT, H.J. Protease inhibitors of *Manduca Sexta* expressed in transgenic cotton. **Plant Cell Reports**, v.14, p.758-762, 1995.
- TRAN, P.; CHEESBROUGH, T.M.; KEICKHEFER, R.W. Plant proteinase inhibitors are potential anticereal aphid compounds. **Journal of Economic Entomology**, v.90, p.1672-1677, 1997.

WALSH, K. A. Trypsinogens and trypsin of various species. In *Methods in Enzymology* (Eds Perlmann G. E. and Lorand L.) v.XIX, pp.41-44. **Academic Press**, New York, 1970.

ANEXO
(Artigo submetido à publicação)

Marcio C. Silva-Filho

Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Universidade de São Paulo, C.P. 83, 13400-970 Piracicaba, SP, Brazil

Tel: 55 19 4294125 Fax: 55 19 433 6706

E-mail: mdcsilva@carpa.ciagri.usp.br

Journal of Economical Entomology, Resistance Management

Adaptation of *S. frugiperda* to proteinase inhibitors

Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) is responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors

LUIS CESAR M.S.PAULILLO¹, ADRIANA RIOS LOPES², PLÍNIO
T.CRISTOFOLETI² JOSÉ ROBERTO P. PARRA³, WALTER R.TERRA² AND
MÁRCIO C. SILVA-FILHO¹

¹Departamento de Genética, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, C. P. 83, 13400-970 Piracicaba, SP, Brazil

²Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, C.P.
26077, 05599-970, São Paulo, SP, Brazil

³Departamento de Entomologia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, C.P. 9, 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil

ABSTRACT

The development of transgenic maize plants expressing soybean proteinase inhibitors could reduce the economic damage of one of the major maize pests in Brazil, the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). We examined the influence of soybean proteinase inhibitors (Kunitz and Bowman-Birk) on digestive enzymes properties and development of *Spodoptera frugiperda* larvae. The inhibition of trypsin and chymotrypsin activities *in vitro* by soybean proteinase inhibitors suggested that either Kunitz (SBTI) or Bowman-Birk (SBBI) would have a potential antimetabolic effect when ingested by insect larvae. However, chronic ingestion of semi-purified soybean inhibitors did not result in a significant reduction of growth and development of fall armyworm. Therefore, digestive serine proteinase activities (trypsin and chymotrypsin) of fall armyworm larvae were characterized. The results suggest that *S. frugiperda* was able to physiologically adapt to dietary proteinase inhibitors by altering the complement of proteolytic enzymes in the insect midguts.

Key words: soybean proteinase inhibitors, *Spodoptera frugiperda*, fall armyworm, adaptation

INTRODUCTION

Present methods for pest control are based on the use of agrochemicals, which besides increasing production cost, cause environmental damages, contamination of operators during handling period and selection of resistant species. Therefore, the development of an environmentally friendly agriculture is a major goal of research on insect control. The expression of antimetabolic proteins in transgenic plants is a quite attractive strategy to protect crops from insects. The growth and metabolism of several insect larvae are significantly affected following chronic ingestion of proteinase inhibitors (PIs) incorporated into artificial diets (Birk and Applebaum, 1960; Stefens *et al.*, 1978; Shukle and Murdock, 1983; Broadway and Duffey, 1986; Johnston *et al.*, 1993; Oppert *et al.*, 1993; Broadway and Villani, 1995), or when present at high levels in plants (Hilder *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1989; McManus *et al.*, 1994, Duan *et al.*, 1996).

On the other hand, there is evidence showing that some insects are not susceptible to dietary PIs. For example, trypsin and chymotrypsin-like activity from *Pieris rapae* and *Pieris napi* larvae are not significantly inhibited, *in vitro*, by serine proteinase inhibitors from cabbage. Furthermore, ingestion of cabbage PIs has no influence on growth and development of these insect species (Broadway and Villani, 1995). These Lepidoptera species are crucifer specialists and apparently have evolved trypsin and chymotrypsin-like enzymes that function in the presence of the trypsin/chymotrypsin inhibitors in their host plants.

Other insect species secrete midgut endopeptidases that can be inhibited *in vitro* by certain PIs. However, ingestion of these PIs has no effect on the insect larval growth and development (Stefens *et al.*, 1978; Broadway, 1995). The lack of biological activity of PIs in these case results from the alteration of the complement of proteolytic enzymes in the insect midguts following PIs ingestion, so that a significant proportion of proteinase activity is at least partially resistant to inhibition by the dietary PIs (Broadway, 1995, 1996; Bolter and Jongsma, 1995; Jongsma *et al.*, 1995).

Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae), usually known as fall armyworm, has a widespread distribution in tropical regions, and is an important pest of corn plants. Proteolytic activities in the gut of *Spodoptera frugiperda* larvae have been investigated previously and have been shown to be mostly due to serine proteinases with high pH optima (Ferreira *et al.*, 1994a; 1994b).

The current investigation focused on the effects of partially purified soybean serine proteinase inhibitors incorporated into insect artificial diets on the growth and metabolism of *S. frugiperda* larvae. In addition, the effects on gut proteinase activity were determined by analyzing the digestive enzyme properties of larvae fed on artificial diets and fed on artificial diet containing the partially purified soybean inhibitor.

MATERIAL AND METHODS

Insects

A laboratory colony of *S. frugiperda* was maintained under 16 h light: 8 h dark photoperiod at 25°C and 80% relative humidity. For identification and characterization of enzyme proteolytic activities, larvae were reared on an artificial diet adapted from that of Parra (1998).

Extraction and partial purification of proteinase inhibitors

Proteinase inhibitors were extracted according to Broadway (1993) by homogenizing 100g of soybean seeds in 1,000 ml of a 0.15 M NaCl solution, squeezing the homogenate through cheesecloth, centrifuging the filtrate at 3,000g for 20 min at 4°C and collecting the supernatant. The supernatant was adjusted with ice-cold acetone to 70% saturation under stir. The solution was then centrifuged at 6,000g for 20 min at 4°C. The pellet was lyophilized to remove the acetone and to give a semi-purified proteinase inhibitor corresponding to 12% (w/w) of the initial seed protein.

Bioassays

To determine the effect of soybean proteinase inhibitors on larval growth and development, groups of 80 *S. frugiperda* larvae were reared on a high bean-based meridic diet (Parra, 1998) supplemented (0.25, 0.50%, w/w) or not (control) with soybean proteinase inhibitors.

The parameters analyzed were: initial mortality, length of the larval period, pupal mortality and pupal average weight.

Preparation of samples

Midgut extracts were obtained by a slight modification of the method described by Ferreira *et al.* (1994b). Insect midgut contents were removed in 125 mM NaCl solution from last instar larvae previously immobilized on ice. Six guts per ml were homogenized in water and then centrifuged at 20,000 rpm, at 4°C, for 30 minutes. The supernatant was separated and used in biochemical assays.

Hydrolase assays and protein determination

Protein concentration was determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard. Trypsin activity was determined using a colorimetric or a fluorimetric assay. In the colorimetric assays, 0.83 mM BapNa (Erlanger *et al.*, 1961) was used as substrates, whereas in the fluorimetric assays, 0.01mM BAMCA or CBZAMCA in 0.1M Tris/HCl buffer pH 8.5 was employed. The excitation wavelength of MCA is 380 nm and its emission wavelength is 460nm. Chymotrypsin activity was also determined using a fluorimetric (with 0,01mM SAAPMCA as substrate) or a colorimetric (with 0,1mM N(Ala)₂ProPhe-*p*Na as substrate) assay in 100mM Tris/HCl pH 8.5 buffer. All assays were performed at 30°C in media of the indicated pH values. The effect of pH in enzyme activity was studied using the following buffers (0.1M): sodium phosphate, (pH 6.0- 8.0); Tris-HCl (pH 7.0-9.0), Glycine (pH 9.0-11.0). Incubations were carried out for at least four different time periods, and initial rates of hydrolysis were calculated.

Inhibition studies

The ability of soybean proteinase inhibitors to inhibit the larval trypsin and chymotrypsin activity was determined by incubating a mixture of midgut extracts with different concentrations of the semi-purified soybean proteinase inhibitors (1mg/ml) for 30 min at 37°C, then assaying for trypsin and chymotrypsin activity, as previously described.

Polyacrylamide gel electrophoresis

Samples of *S. frugiperda* midgut homogenates from larvae fed on artificial diet with or without adding semi-purified inhibitors were applied to glass tubes of 5mm i.d. and 100 mm length containing a 7.5 to 12% polyacrylamide gel gradient with SDS prepared and run as described by Laemmli (1970) for gel slabs. In order to decrease the concentration of SDS, gel cylinders were washed for 30 minutes with shaking in 0,1M Tris/HCl buffer pH 8.0 containing 2.5% (v/v) Triton X-100. The buffer was changed at intervals of 10 minutes. After this, the gel cylinders were fractionated in an acrylamide gel fractionator with 0,1M Tris/HCl buffer pH 8.0 containing 2.5% (v/v) Triton X-100. Fractions of 30 drops were collected with a fraction collector. Trypsin and chymotrypsin activity was measured using CBZAMCA and SAAPMCA, respectively, as described above.

RESULTS

In vitro enzyme assays

In vitro inhibition of digestive proteases is a simple approach to evaluate proteinase inhibitors for their potential to suppress growth of herbivorous insects (Christeller and Shaw 1989). Since *S. frugiperda* Larvae have more trypsin-like (48.0 U/midgut) than chymotrypsin-like (8.0 U/midgut) enzymes, a trypsin inhibitor is expected to be more effective than a chymotrypsin inhibitor against these species. Furthermore, trypsin activity from larval *S. frugiperda* was more affected by the semi-purified soybean proteinase inhibitors than chymotrypsin activity (Fig. 1).

Bioassays

The addition of semi-purified soybean proteinase inhibitor to the artificial diet did not affect significantly the following biological parameters: initial mortality, length of the larval period and pupal average weight (Fig.2). These results are in contrast with those obtained from *in vitro* experiments, which showed that larval *S. frugiperda* trypsin-like enzymes were clearly inhibited by soybean proteinase inhibitors. These data suggest that *S. frugiperda* is able to adapt to a diet containing proteinase inhibitors.

Characterization of proteinase activity

In vitro trypsin activity assays carried out on *S. frugiperda* caterpillars (fed on artificial diet) revealed two optimal peaks of activity: a lower peak of activity between pHs 7.5 and 8.5 and a higher activity at pH 10.5 (not shown), as observed previously by

Ferreira *et al.* (1994a). Chymotrypsin activity presents a single peak was observed at pH 7.0 (not shown). These results are in agreement with previous reports showing that Lepidoptera insects display higher trypsin and chymotrypsin activity at pH values ranging from 7.0 and 11.0 (Terra and Ferreira 1994).

In vitro inhibition of larval trypsin activity after ingestion of soybean proteinase inhibitors

S.frugiperda larvae fed on artificial diet containing soybean proteinase inhibitors have its trypsin-like activity less affected by those inhibitors *in vitro* assays than the larvae that were not previously exposed to proteinase inhibitors (Fig.3). Furthermore, *S.frugiperda* larvae fed on artificial diet without inhibitors show two trypsin and three chymotrypsin activities (Fig.4A). In contrast, insects that were fed on diets containing the semi-purified inhibitor reveal three trypsin and a single chymotrypsin activity (Fig.4B).

These results suggest that the adaptation of *S.frugiperda* to the presence of proteinase inhibitors consist in changes in the expression of trypsin and chymotrypsin activities.

DISCUSSION

Proteinase inhibitors have been considered as natural control agents against herbivorous insects, because they reduce proteolytic enzyme activity *in vitro* and affect larval development of a number of different species of Coleoptera and Lepidoptera (Broadway *et al.*, 1986; Christeller and Shaw, 1989; Hilder *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1989; Johnston *et al.*, 1993; Oppert *et al.*, 1993). However, the development of not all species are susceptible to proteinase inhibitors, even though they secrete digestive enzymes that can be blocked *in vitro* by those inhibitors (Steffens *et al.*, 1978; Larocque & Houseman, 1990; Broadway, 1995). This seems to be a consequence of the fact that insects may express additional endopeptidases in response to ingestion of proteinase inhibitors, and that these newly synthesized enzymes have differential susceptibility to selected proteinase inhibitors (reviewed by Broadway, 1997; Jongasma and Bolter, 1997).

In agreement with these studies, we demonstrated that *Spodoptera frugiperda* larvae have proteinase activities that were inhibited *in vitro*, by soybean proteinase inhibitors, although chronic ingestion of these inhibitors did not affect significantly the growth and development of *S. frugiperda*. As trypsin activity becomes less susceptible to inhibitors in *S. frugiperda* larvae fed soybean proteinase inhibitors, it is likely that the newly expressed trypsin is less susceptible to the inhibitors. Although there is not direct evidence, the observed change in chymotrypsin expression may correspond to the repression of susceptible enzymes and induction of one that is inhibitor resistant. As far as we are aware, this is the first time that a change in the complement of chymotrypsin enzymes in response to inhibitor feeding is described.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Grant 97/04934-3 and Pronex. L.C.M.S. Paulillo is a graduate fellow from CAPES. A.R. Lopes and P.T. Cristofolletti are graduate fellows from FAPESP. M.C. Silva-Filho, W.R. Terra and J.R.P. Parra are staff members of their respective departments and research fellows of CNPq.

REFERENCES CITED

- Birk, Y., and S. W. Applebaum. 1960.** Effect of soybean trypsin inhibitors on the development and midgut proteolytic activity of *Tribolium castaneum* larvae. *Enzymol.* 22: 318-326.
- Bolter, C., and M. A. Jongsma. 1995.** Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *J. Insect Physiol.* 41: 1071-1078.
- Bradford, M. M. 1976.** A rapid method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Broadway, R. M., S. S. Duffey, G. Pearce, and C. A. Ryan. 1986.** Plant proteinase inhibitors: A defense against herbivorous insects? *Entomol. Exp. Appl.* 41: 33-38.
- Broadway, R. M., and S. S. Duffey .1986.** Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.* 32: 827-833.
- Broadway, R. M. 1993.** Purification and partial characterization of trypsin/chymotrypsin inhibitors from cabbage. *Phytochem.* 33: 21-27
- Broadway, R. M. 1995.** Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *J. Insect Physiol.* 41: 107 –116.
- Broadway, R. M., and M. G. Villani. 1995.** Does host range influence susceptibility of herbivorous to non-host plant proteinase inhibitors? *Entomol. Exp. Appl.* 76: 303-312.

- Broadway, R. M. 1996.** Resistance of plants to herbivorous insects: Can this resistance fail? *Can. J. Plant Pathol.* 18: 476-481.
- Broadway, R. M. 1997.** Dietary Regulation of serine that are resistant to serine proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43: 855-874.
- Christeller, J. T., and B. D. Shaw. 1989.** The interaction of a range of serine proteinase inhibitors with bovine trypsin and *Costelytra zealandica*. *Insect Biochem.* 19: 233-241.
- Duan, X., X. Li, Q. Xue, M. Abo-el-Saad, D. Xu, and R. Wu. 1996.** Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitors II gene are insect resistant. *Nature Biotech* 14: 494-498.
- Erlanger, B.F., N. Kokowsky, and W. Cohen. 1961.** The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochim. Biophys.* 95: 271-278.
- Ferreira, C., A. N. Capella, R. Sitnik, and W. R. Terra. 1994a.** Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* 107A: 631-641.
- Ferreira, C., A. N. Capella, R. Sitnik, and W. R. Terra. 1994b.** Digestive enzymes in midgut cells, endo- and ectoperitrophic contents, and peritrophic membranes of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 26: 299-313
- Hedrick, J. L., and A. J. Smith. 1968.** Size and charge isomer separation and estimation of molecular weights of proteins by disc-gel electrophoresis. *Arch. Biochem. Biophys.* 126: 155-164.

Hilder, V. A., A. M. R. Gatehouse, S. E. Sheerman, R. F. Barker, and D. Boulter.

1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*. 330: 160-163.

Houseman, J. G., and B. J. R. Philogène. 1988. Partial characterization of proteinase

activity in the larval midgut of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae). *Can. J. Zool.* 67: 864-868.

Johnson, R., J. Narvaez, G. An, and C. Ryan .1989. Expression of proteinase

inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 9871-9875

Johnston, K. A., J. A. Gatehouse, and J. H. Anstee. 1993. Effects of soybean protease

inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. *J. Insect Physiol.* 39: 657-664.

Jongsma, M. A., P. L. Bakker, J. Peters, D. Bosch, and W. J. Stiekema. 1995.

Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 8041-8045.

Jongsma, M. A., and C. Bolter. 1997. The adaptation of insects to plant protease

inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43: 885-895.

Laskowski, M. 1985. Protein inhibitors of serine proteinases – mechanism and

classification. In M. Friedman [ed.] *In Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in foods*, pp. 7-71, Academic Press, New York.

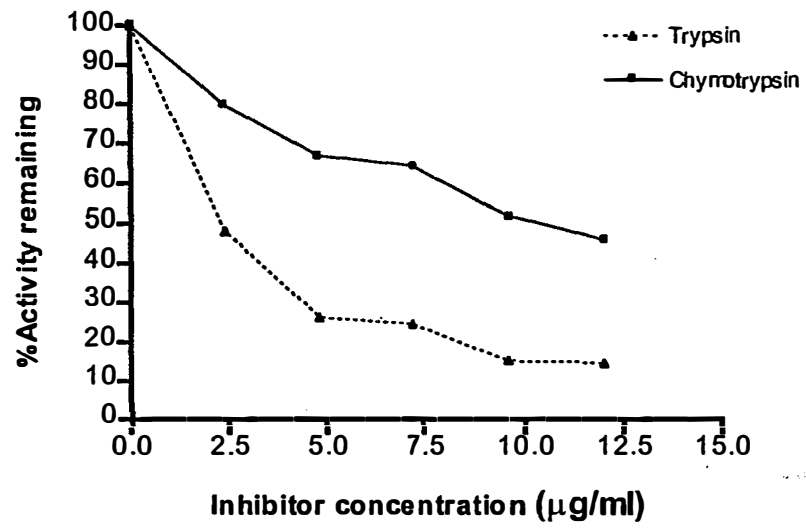
- Larocque, A. M., and J. G. Houseman. 1990.** The effect of ingested soybean, ovomucoid and corn trypsin inhibitor on digestive processes of the European corn borer. *J. Insect Physiol.* 36: 691-697.
- Liener, I. E. 1994.** Implications of antinutritional components in soybean foods. *Crit. Rev Food Sci. Nut.* 34: 31-67.
- McManus, M. T., D. W. R. White, and P. G. McGregor. 1994.** Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. *Transgen. Res.* 3: 50-58.
- McManus, M. T., and E. P. J. Burgess. 1995.** Effect of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteinases of larvae of *Spodoptera litura*. *J. Insect Physiol.* 41: 731 – 738.
- Oppert, B., T. D. Morgan, C. Culbertson, and K. J. Kramer. 1993.** Dietary mixtures of cysteine and serine proteinase inhibitors exhibit synergistic toxicity toward the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Comp. Biochem. Physiol.* 105C: 379-385.
- Parra, J. R. P. 1998.** Criação de insetos para estudos com patógenos. In S.B.Alves [ed.], *Controle Microbiano de insetos*, pp. 1015-1038, Fealq, Piracicaba .
- Shukle, R. H., and L. L. Murdock. 1983.** Lipoyxygenase, trypsin inhibitor, and lectin from soybeans: Effects on larval growth of *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Environ. Ent.* 12: 787-791.
- Steffens, R., F. R. Fox, and B. Kassell. 1978.** Effect of trypsin inhibitors on growth and metamorphosis of corn borer larvae *Ostrinia nubilalis* (Hubner). *J. Agric. Food Chem.* 26: 170-174.

Terra, W. R., and C. Ferreira. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B: 1-62.

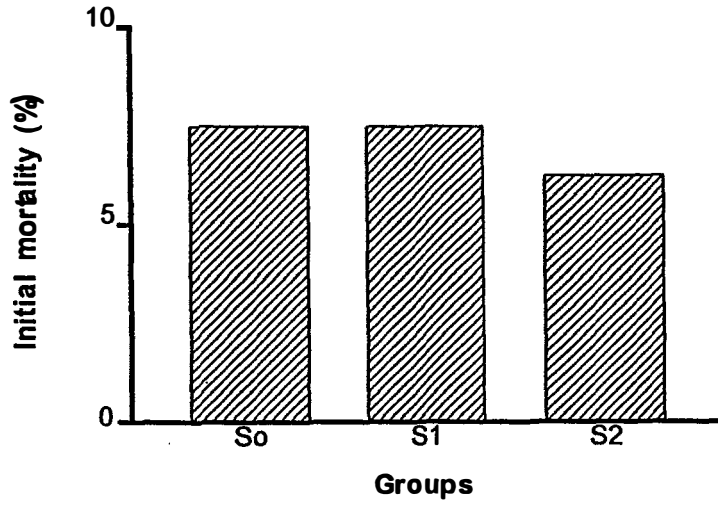
Tran, P., T.M. Cheesbrough, and R. Keickhefer. 1997. Plant proteinase inhibitors are potential anticereal compounds. *J. Econ. Entomol.* 90: 1672-1677.

Footnotes to introduction

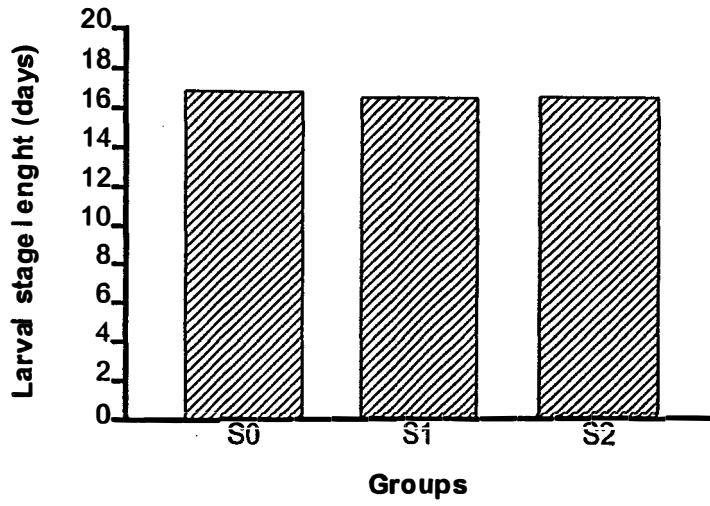
Abbreviations: BAMCA, Benzoyl -Arginine-7-amido 4 methyl coumarin; BapNa, Benzoyl-Arginine *p*-nitroanilide; CBZAMCA, Carbobenzoxy-Arginine-7-amido 4 methyl coumarin; N(Ala)₂ProPhe-pNa, N(Ala)₂ProPhe-*p*-nitroanilide; SAAPMCA, Succinyl-Alanine-Alanine-MCA-7-amido 4-methyl coumarin.



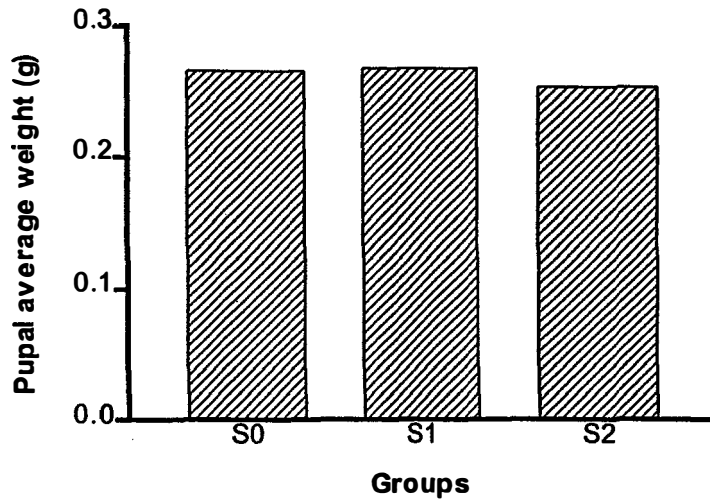
A- Initial mortality

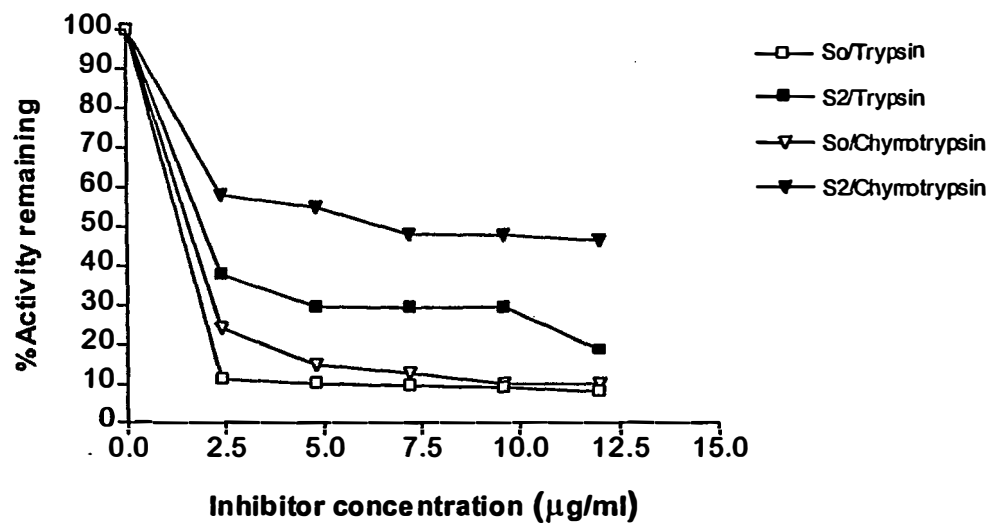


Larval stage length

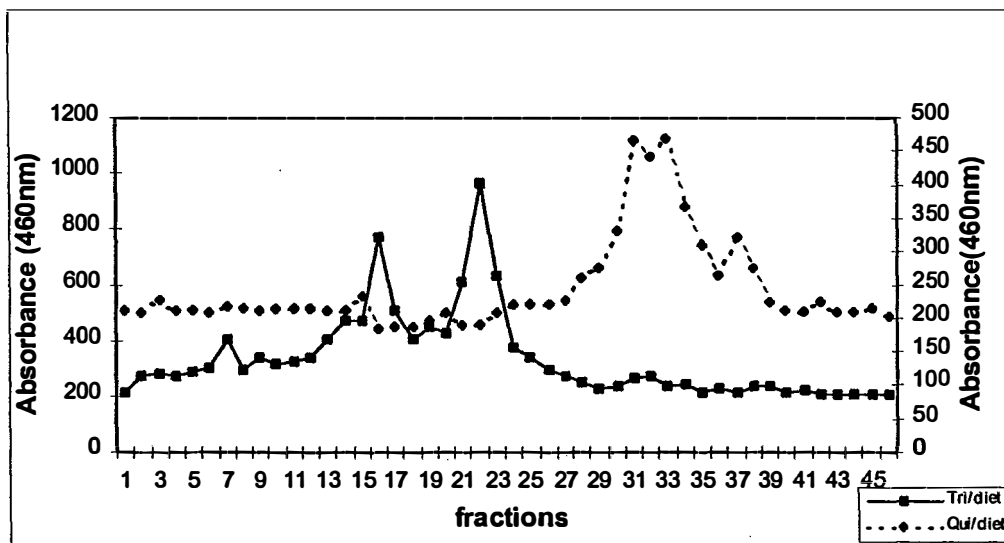


Pupal average weight





A



B

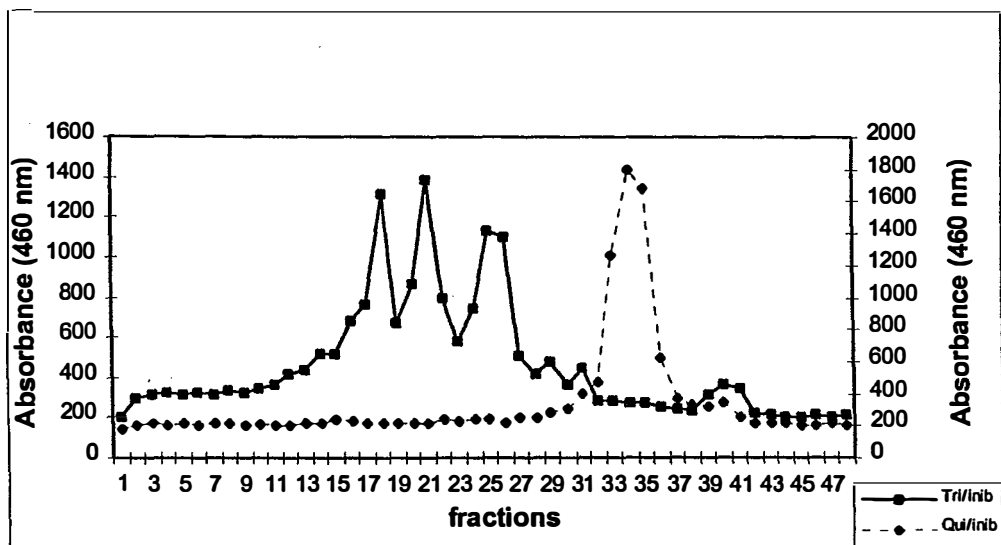


Fig. 1 - - Interaction, *in vitro*, with a range of semi-purified soybean proteinase inhibitor concentrations of a trypsin-like (BapNA-hydrolyzing) activity (dashed line), an chymotrypsin-like (N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-Nitroanilide - hydrolyzing) activity (full line) from the digestive tract of final instar *S. frugiperda* larvae.

Fig. 2 - The *in vivo* effects of semi-purified soybean proteinase inhibitor on initial mortality (A), larvae stage length (B) and pupal average weight (C). The inhibitor was added to artificial diet at 0% (S₀), 0,25% (S₁) and 0,50% (S₂). Statistical analysis showed no significant differences between the treatments.

Fig. 3 - Interaction, *in vitro*, with a range of semi-purified soybean proteinase inhibitor concentrations of a trypsin-like (BapNA-hydrolyzing) activity extracted from the digestive tract of final instar *S. frugiperda* larvae fed on artificial diet (dashed line), and on artificial diet added with semi-purified soybean inhibitors at 0,50% (full line).

Fig. 4A - Activities of trypsin (dashed line) and chymotrypsin (full line) enzymes extracted from midguts of *Spodoptera frugiperda* larvae fed on artificial diet.

Fig. 4B - Activities of trypsin (dashed line) and chymotrypsin (full line) enzymes extracted from midguts of *Spodoptera frugiperda* larvae on artificial diet added with semi-purified soybean inhibitors at 0,50%.