

POTENCIAL BIOINSETICIDA DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE *Capparis flexuosa*

Daniele Yumi Sasaki

Mestranda em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste/UFMS/MS
Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas/UFMS/MS
danieleys@hotmail.com

Alexandre Ferraro Antunes

Mestrando em Biologia Vegetal/UFMS/MS
alxferraro@gmail.com

Maria das Graças Machado Freire

Doutora em Biologia Funcional e Molecular
Laboratório de Química e Biologia/ Institutos Superiores de Ensino do Censa
maria.freire@terra.com.br

Maria Lígia Rodrigues Macedo

Pós-doutora em Fisiologia Vegetal/UNICAMP/SP
Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas/UFMS/MS
bioplant@terra.com.br

Recebido: 13 de maio de 2013. Revisado: 08 de julho de 2013. Aceito: 11 de julho de 2013.
Publicado online: 17 de julho de 2013

RESUMO

Buscando aperfeiçoar a produção agrícola sem o uso excessivo de fertilizantes químicos e agrotóxicos, a biotecnologia trouxe como alternativa a utilização de inibidores de proteinases como bioinseticida no controle de insetos-pragas. Neste trabalho foi avaliado o potencial inseticida de um inibidor extraído de sementes de *Capparis flexuosa*. Além de, sua ação sobre as larvas de *A. kuehniella*, através de ensaios *in vitro* e bioensaios em dietas artificiais. Na eletroforese SDS-PAGE foi visualizada uma banda com peso de 22 kDa em todas as amostras, sugerindo que o inibidor seja da família Kunitz, fato que foi confirmado pela coloração negativa do gel. O efeito do inibidor *in vitro* sobre as enzimas digestivas de larvas de 4º instar de *A. kuehniella*, na presença do substrato BapNA, demonstrou inibição de 77 % na presença de 6 µgP do inibidor. O efeito do inibidor *in vitro* sobre as enzimas do tipo tripsina de larvas de 4º instar de *A. kuehniella*, na presença do substrato BapNA, demonstrou inibição de 77% na presença de 6 µgP do inibidor. No bioensaio, uma dieta contendo inibidor semi-purificado a 1% e 2%, foi oferecida às larvas de lepidópteros. Não foi verificada alteração as sobre a sobrevivência larval em nenhum tratamento. No entanto, houve diferença significativa no peso médio larval, com uma redução de 69% em dieta contendo 2% de CfSP. Também foi verificada alteração nos parâmetros dos índices nutricionais, demonstrando dificuldade do inseto em sobrepujar os efeitos do inibidor. Dessa forma, conclui-se que o inibidor de *C. flexuosa* apresenta capacidade em inibir enzimas do tipo tripsina, apresentado efeito anti-trípico sobre as enzimas de *A. kuehniella*. Adicionalmente, possui propriedades tóxicas sobre as larvas de *A. kuehniella* alimentadas, tendo a capacidade de alterar os índices nutricionais e o peso larval.

Palavras-chave: Inibidores de Proteinases; Purificação de Proteínas; *Anagasta kuehniella*; Interação Inseto-Planta.

ABSTRACT

To aim agricultural production improvement without the overuse of chemical fertilizers and pesticides, biotechnology has brought as an alternative the use of proteinase inhibitors as bioinsecticidal in controlling insect pests. In this study, the insecticidal potential of an inhibitor extracted from of *Capparis flexuosa* seeds was evaluated. Also, the inhibitor activity was evaluated by *in vitro* assay and bioassay with artificial diet. In SDS-PAGE, a band was visualized weight of 22 kDa in all samples, suggesting that inhibitor of the Kunitz family is, a fact was confirmed by negative staining of the gel. The *in vitro* effect of the inhibitor on the trypsin-like enzymes of fourth instar *A. kuehniella* larvae in the presence of BapNA substrate showed an inhibition of 77% by using 6µgP of the inhibitor. For the bioassay, a diet containing inhibitor and 1% and 2% was given to lepidopteran larvae. No change was observed on the larval survival in any treatment. However, there were significant differences in mean larval weight, a reduction of 69% in diet containing 2% CFSP. They also found changes in the parameters of nutritional indices, demonstrating the difficulty in insect overcome the effects of the inhibitor. Thus, it is concluded that the inhibitory *C. flexuosa* has the capacity to inhibit trypsin-like enzymes, anti-tryptic displayed on the enzymes of *A. kuehniella*. In addition, it has toxic properties on larvae of *A. kuehniella* fed, having the ability to change the nutritional indices and larval weight.

Keywords: Proteinase Inhibitors; Purification of Proteins; *Anagasta kuehniella*; Insect-Plant Interaction.

1. INTRODUÇÃO

Anagasta kuehniella (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), conhecida como traça-do-arroz, é uma praga primária de grãos e cereais estocados, mas também pode consumir frutas e nozes. Esta mariposa mede de 15 a 25 mm de envergadura e cada fêmea pode depositar entre 100 a 300 ovos. A presença de insetos-praga em grãos e outros produtos armazenados podem causar prejuízos que acarretam na perda da germinação e do valor nutritivo, além de possibilitar a contaminação por fungos e ácaros (DE MORI & LORINI, 2007). O controle de pragas geralmente requer o uso de inseticidas químicos, podendo ser tóxicos a humanos e animais domésticos e além de serem prejudiciais ao meio-ambiente (MACEDO *et al.*, 2007). Como uma solução alternativa, chama-se a atenção para a biotecnologia de plantas transgênicas resistentes a insetos e outros patógenos e com capacidade bioinseticida por expressarem inibidores de proteinases, visando assim aperfeiçoar a produção agrícola com menor dependência de fertilizantes químicos e agrotóxicos (BABU *et al.*, 2003; OLIVEIRA & MACEDO, 2011).

Os inibidores de proteinases (IPs) fazem parte de um sofisticado mecanismo de defesa protegendo as plantas ao serem atacadas por herbívoros e/ou patógenos (BIRK, 2003). Esses peptídeos ou proteínas podem ser sintetizados constitutivamente ou após uma indução, como um contra-ataque. Estes possuem a capacidade de interagir específica e reversivelmente com diferentes enzimas proteolíticas, isto é, enzimas que rompem as ligações peptídicas entre as proteínas; inibindo-as competitivamente (BODE & HUBER, 1992).

Entre uma grande diversidade de proteínas envolvidas no mecanismo de defesa de plantas está o grupo dos inibidores de serino-proteinases. Este grupo, que leva esta nomenclatura pela capacidade de catalisar os aminoácidos serina e histidina, presentes no centro ativo é composto pelas famílias Kunitz (inibidora de tripsina), Bowman-Birk (inibidora de tripsina e quimotripsina), inibidores da batata tipo I (específica para quimotripsina e subtilisina) e de batata tipo II (específica para tripsina como quimotripsina), inibidores de tripsina de cevada, inibidores *squash* (BODE & HUBER, 1992; MACEDO *et al.*, 2007). Esses inibidores são considerados estáveis por apresentarem em sua composição pontes de dissulfeto que conferem assim, resistência ao calor, estabilidade da temperatura e do pH e proteólise (CHYE *et al.*, 2006; JAMAL *et al.*, 2013).

A tripsina, juntamente com a quimotripsinas, são as principais proteases no sistema digestivo de insetos fitófagos, responsáveis por cerca de 95% da proteólise. Segundo Ryan (1990), insetos das ordens Lepidóptera e Díptera possuem pH entre 8,5 e 10, ótimo para atividade desta classe de enzimas, entre as quais as serino-proteinases são mais ativas. Por isso vários estudos foram feitos a fim de demonstrar os efeitos dos IPs em lepidópteros, como *Spodoptera frugiperda* (BRIOSCHI *et al.*, 2007), *Corcyra cephalonica* e *Diatraea saccharalis* (MACEDO *et al.*, 2011) e dípteros, como *Ceratitis capitata* (GOMES *et al.*, 2005) e *Mayetiola destructor* (ZHU *et al.*, 2005).

O alto conteúdo de IPs em plantas, particularmente em sementes, objetivou vários estudos a fim de elucidar os papéis biológicos destas moléculas vegetais (RYAN, 1990; MORAES *et al.*, 2006; MACEDO *et al.*, 2011). A escolha da espécie vegetal é importante para potencializar a eficiência do inibidor no inseto alvo, visto que os processos co-evolutivos entre inseto e planta levam o inseto ao desenvolvimento de respostas às toxinas presentes nas sementes, gerando um processo de adaptação e contra-adaptação (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002); ou seja, quanto mais distante a interação entre as espécies, mais eficiente poderá ser o efeito do inibidor.

Capparis flexuosa (L.) não faz parte do hábito alimentar de *A. kuehniella*; portanto, seria mais difícil a adaptação desse inseto aos inibidores presentes nesta forrageira. Esta espécie originária do nordeste brasileiro conhecida popularmente por feijão-bravo e feijão-de-boi, pertence à família Capparidaceae. Essa forrageira de porte arbustivo-arbóreo, de folhas perenes, desenvolve-se em grande parte do semiárido e apresenta produção de frutos durante o período seco. Possui grande valor nutricional, principalmente em termos de conteúdo proteico, chegando a apresentar 18 a 20% de proteína bruta na matéria seca das folhas (ALMEIDA NETO *et al.*, 2011).

O objetivo deste trabalho é obter uma fração enriquecida com um inibidor de tripsina presente em sementes de *Capparis flexuosa* e avaliar sua ação inseticida no desenvolvimento larval de *Anagasta kuehniella*.

2. METODOLOGIA

2.1 Inseto

O lepidóptero *Anagasta kuehniella* é mantido pelo Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB) da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil. A criação da colônia ocorre em estufa B.O.D. na temperatura de 28 ± 1 °C e umidade relativa de 65-75%, em período diário de iluminação de 16 horas. A dieta consiste em farinha de trigo integral e gérmen de trigo na proporção 3:2 (p/p).

2.2 Obtenção do extrato bruto de *C. flexuosa*

As sementes de *C. flexuosa* foram moídas e peneiradas, obtendo-se uma farinha fina, a qual foi delipidada com hexano, para a retirada do excesso de gordura. Após seca, esta foi agitada constantemente em tampão fosfato 100 mM, pH 7,6 (1:10, p/v), 4 °C por 12 horas. Em seguida, o material denominado de extrato bruto de *C. flexuosa* (CfEB), foi centrifugado a 7500 x g durante 30 minutos e o sobrenadante foi dialisado por 48 horas a 4 °C e liofilizado.

2.3 Obtenção do material purificado de *C. flexuosa*

Os passos de purificação do inibidor foram feitos a partir do CfEB liofilizado diluído em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e aplicado em uma coluna de troca-iônica, DEAE-Sepharose (8 x 2,5 cm), equilibrada previamente com o mesmo tampão. Um gradiente salino de NaCl (0-1 M) foi utilizado para a eluir as proteínas adsorvidas, sendo coletadas frações em um fluxo de 36 mL/h. O pico contendo atividade inibitória escolhido foi dialisado e liofilizado e reaplicado em uma coluna de afinidade, Sepharose-tripsina (1 x 5 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,6 com 100 mM de NaCl. Frações de 1 mL/tubo foram coletadas e subsequentemente, a eluição do material retido na coluna foi feito com HCl 0,01 M, o pico contendo inibidor foi dialisado, liofilizado e denominado inibidor de tripsina de *C. flexuosa* (CfIT). A

detecção das proteínas foi feita com uma leitura a 280 nm em espectrofotômetro.

2.4 Quantificação de proteínas

As dosagens proteicas foram realizadas segundo o método de Bradford (1976), utilizando a albumina sérica bovina como proteína padrão para determinação da curva.

2.5 Atividade inibitória de tripsina

A determinação da atividade inibitória do material proveniente das cromatografias foi realizado segundo o método de Erlanger *et al.* (1961). Uma mistura pré-incubada por 10 minutos a 37 °C, contendo 0,0133 M de tampão Tris-HCl pH 8,0; 50 µl de uma solução estoque de tripsina (0,3 mg/mL) dissolvida em HCl 0,0025N e 50 µl de amostra foi preparada. Em seguida, foi adicionado 500 µl de uma solução 10 mM de N- α -benzoyl-L-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA) dissolvido em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; prosseguido por mais 20 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v). Em um espectrofotômetro com a leitura a 410 nm, a hidrólise do substrato pela enzima foi avaliada a fim de determinar a capacidade de inibir da amostra.

2.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Para a verificação dos passos de purificação do CfIT, uma eletroforese SDS – PAGE com o gel a 15% de poliacrilamida foi feita segundo o método de Laemmli (1970). As proteínas padrão usadas no marcador molecular foram Albumina (66 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), Pepsina (34,7 kDa), Tripsinagênico (24 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa), Lizonina (14,3 kDa). As placas foram coradas com solução contendo 0,1% de Coomassie Blue R 250.

2.7 Eletroforese em SDS-PAGE com coloração negativa

Segundo Uriel & Berges (1968), foi realizada a técnica de coloração negativa para a detecção da atividade inibitória da enzima por CfIT. Após a corrida, em um gel de poliacrilamida a 15% com 10 µgP de amostra em cada poço, o gel foi submerso em ácido tricloroacético a 12,5% (p/v) por 30 minutos. Retirada a solução fixadora, o gel foi colocado numa solução de tripsina a 0,1 mg/mL diluído em tampão fosfato 100 mM pH 7,4 por 30 minutos. A coloração do gel foi feita com uma solução contendo APNE/TETRA na proporção de 1:9, respectivamente.

2.8 Obtenção das enzimas digestivas de larvas de *A. kuehniella*

A extração do intestino médio de larvas de 4º instar de *A. kuehniella* foi feita com o auxílio de pinças e sob uma lupa estereoscópica. As larvas foram imobilizadas em banho de gelo em um solução de NaCl 150 mM para facilitar a dissecação. Os intestinos retirados foram macerados em um homogeneizador do tipo Potter na mesma solução durante 10 minutos em banho de gelo, obtendo um extrato (10 intestinos/mL) e centrifugado a 6000 x g durante 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi armazenado a -20 °C (MACEDO *et al.*, 2011).

2.9 Efeito *in vitro* de CfSP frente à enzimas digestivas de larvas de *A. kuehniella*

O ensaio *in vitro* foi feito frente às enzimas digestivas obtidas na extração do intestino médio de *A. kuehniella*. Concentrações crescentes de CfSP (2, 4 e 6 µg) foram incubadas a 37 °C com 5 µg de proteína de intestino e tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 por 10 minutos antes da adição de 0,0133 M do substrato BAPNA. A reação ocorreu por mais 20 minutos, seguido pela adição de ácido acético (30%, v/v). A leitura foi feita a 410 nm e a atividade enzimática foi determinada pela concentração de BAPNA hidrolisado/minuto/µg de proteína. Esse experimento foi realizado em triplicatas com seus apropriados brancos.

2.10 Efeito *in vivo* no desenvolvimento larval de *A. kuehniella*

Para verificar o efeito do inibidor no desenvolvimento larval de *A. kuehniella*, dietas artificiais contendo 0% (controle), 1% e 2% de CfEB e CfIT (p/p) foram preparadas. Para cada tratamento, foram oferecidos 120 mg da dieta a 4 larvas neonatas por pote (n=24/ tratamento). As larvas foram mantidas em condições ideais até atingirem o 4º instar, podendo chegar a 20 ± 2 dias, obtendo assim valores quanto ao peso, sobrevivência e consumo da dieta e fezes.

2.11 Índices nutricionais

Os parâmetros fisiológicos foram analisados a partir dos dados obtidos no ensaio biológico, utilizando o peso das larvas (B), das fezes produzidas (F) e da dieta ingerida (I) em um determinado tempo (T); de acordo a metodologia de Waldbauer (1968) e modificada por Busato *et al.* (2002), utilizando os seguintes parâmetros: Digestibilidade aproximada (%) - AD = $(I-F)/I \times 100$; Eficiência de conversão do alimento ingerido (%) - ECI = $B/I \times 100$; Eficiência de conversão do alimento digerido (%); ECD = $B \times I / I-F \times 100$; Custo metabólico (%) = $100 - ECD$.

2.12 Análises estatísticas

Todos os dados examinados foram analisados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey para a comparação das diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários compostos ativos já foram encontrados na família Cappariaceae, tais como: álcool, alcaloides, aminoácidos, amirina, antocianinas, betulina, carboidratos, flavonoides, glicosídeos, saponinas, esteroide, esteróis e terpenos (RAJESH *et al.*, 2009). Na literatura, não há registro de IPs isolados desta família. *C. flexuosa* já demonstrou possuir atividade nematicida (GONÇALVES *et al.*, 2000); eficiência do extrato etanoico no ensaio de células HeLa (CHAVEZ *et al.*, 1997) e glucosianolatos nas folhas (KJAER & SCHUSTER, 1971; MIKKELSEN & HALKIER, 2003).

Para a obtenção do extrato bruto de *C. flexuosa* foi realizado a extração da farinha delipídada das sementes com tampão fosfato 100 mM (pH 7,6). Em seguida, este material liofilizado foi submetido a uma cromatografia de troca iônica em coluna DEAE-Sepharose, o qual apresentou dois picos de proteína com atividade inibitória (Figura 1A). O segundo pico (PII), com maior atividade anti-tríptica, foi eluído após a adição de um gradiente salino de NaCl (com 0,3 M), e reaplicado em uma coluna de Sepharose-tripsina. Nesta cromatografia de afinidade, somente o pico coletado após a adição de HCl 0,01 M apresentou atividade inibitória. Esta fração semi purificada denominada CfSP, contendo inibidor foi dialisada e liofilizada. O inibidor de tripsina presente nesta fração foi denominado CfIT (Figura 1B).

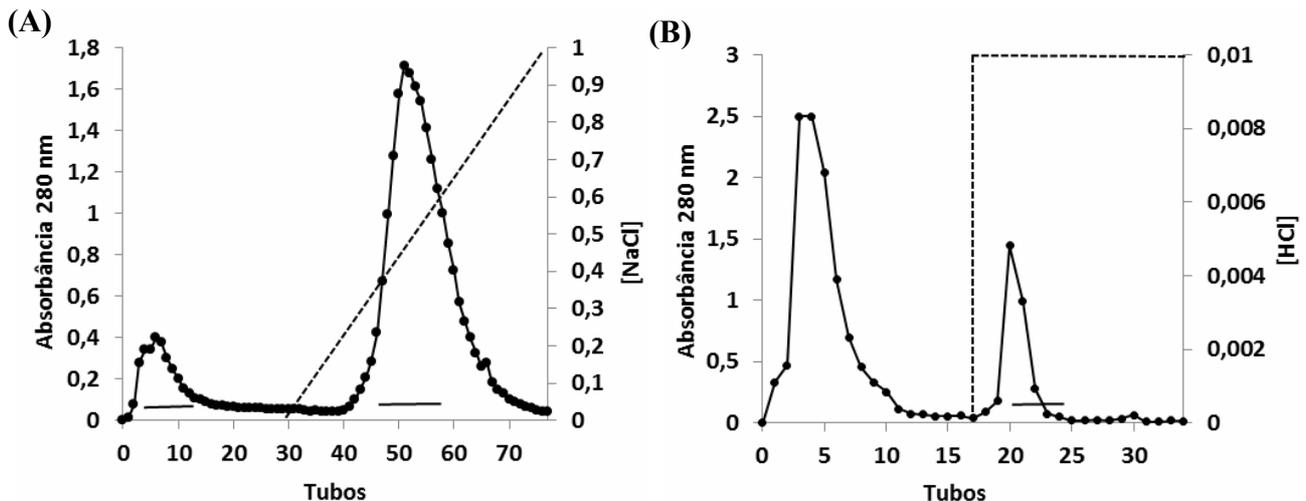


Figura 1: (A) Perfil cromatográfico do EB de *C. flexuosa* aplicado em coluna DEAE- Sepharose (8 x 2,5 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0. A eluição das proteínas foi feita através de um gradiente salino de NaCl (0-1M). (B) Perfil cromatográfico da coluna Sepharose – tripsina (1 x 5 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,6 com 100 nM de NaCl, aplicado material liofilizado da DEAE-Sepharose (PII). A eluição das proteínas ligadas a resina foi feita através da adição de HCl 0,01M. A detecção das proteínas foi feito a 280 nm. Os tubos que apresentaram atividade inibitória estão evidenciados por uma barra.

A eletroforese em SDS-PAGE mostrou uma banda de massa molecular de aproximadamente de 22 kDa em todas as amostras, uma característica típica de inibidor do tipo Kunitz (Figura 2A). Para observar mais claramente a presença de um inibidor de tripsina em amostras de *C. flexuosa* foi usado gel de poliácridamida com coloração negativa (Figura 2B). Sendo que as áreas escuras representam a clivagem do substrato APNE pela tripsina incubada no gel. As áreas brancas mostram a ação inibitória de CfIT, que se liga a tripsina impedindo a quebra do substrato. Lembrando que em todas as amostras havia a mesma quantidade de proteína (10 µg), sendo assim, observou-se a maior concentração de um inibidor no material de Sepharose-tripsina, representado pela maior área clara do gel. A coloração negativa do gel confirma a presença de um inibidor de tripsina com massa molecular aparente de 20kDa nas amostras de *C. flexuosa*.

Os inibidores de plantas do tipo serino-proteinasas possuem diversas famílias que se diferem principalmente, pela massa molecular, estrutura tridimensional, composição de ponte de dissulfeto, estabilidade térmica e agente desnaturante (TELES *et al.*, 2004). Uma das principais famílias de inibidores é a Bowman-Birk, a qual possui a massa molecular em torno de 8 kDa e relativamente com grande conteúdo de cisteína. Outra principal família é a Kunitz, que segundo Bode & Huber (1992), apresenta massa molecular entre 18-24 kDa, poucos resíduos de cisteína em sua constituição e um sítio ativo específico. O CfIT não foi capaz de inibir quimotripsina bovina (dado não mostrado). Essas propriedades (peso molecular, atividade inibitória, coramento negativo) nos levam a sugerir que CfTI trata-se de um inibidor da família Kunitz,

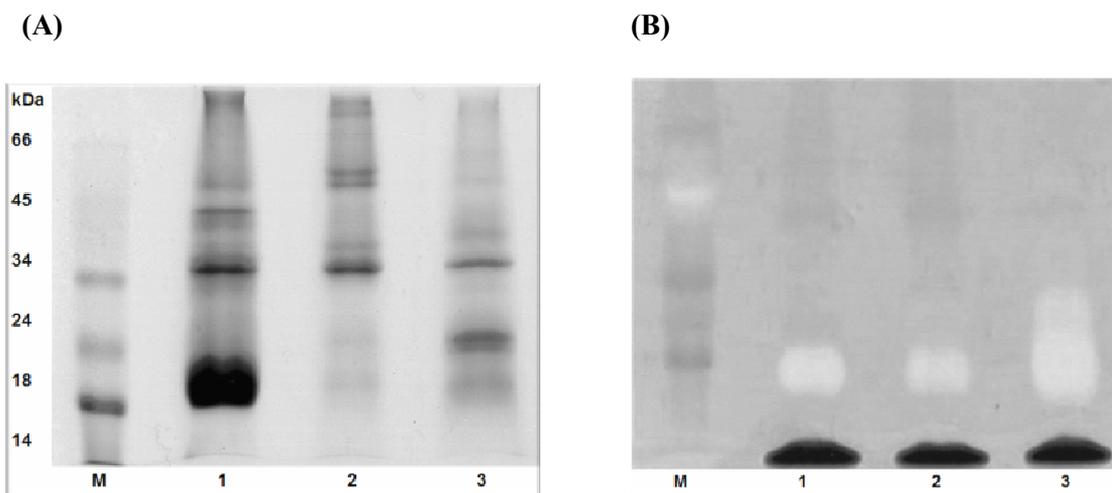


Figura 2: (A) SDS – PAGE a 15% das frações oriundas das etapas de purificação; (B) Coloração negativa contendo 10 μ gP de inibidor de *C. flexuosa* em gel de SDS-PAGE (15%), contendo APNE e incubado com tripsina. Áreas brancas indicam a inibição da tripsina pelo inibidor no substrato incorporado no gel. M- Marcador, 1 – EB, 2-DEAE- Sepharose, 3- Sepharose – tripsina.

O ensaio *in vitro* mostrou que as enzimas digestivas das larvas de *A. kuehniella* são claramente inibidas pela fração CfSP contendo CfIT, evidenciado pela diminuição da hidrólise do substrato BAPNA. A Figura 3, mostra que ao aumentar a quantidade de CfSP ocorre a diminuição da hidrólise de BAPNA, ocorrendo uma redução de aproximadamente 77% em *A. kuehniella* quando comparado ao controle e na presença de 6 μ g de CfSP.

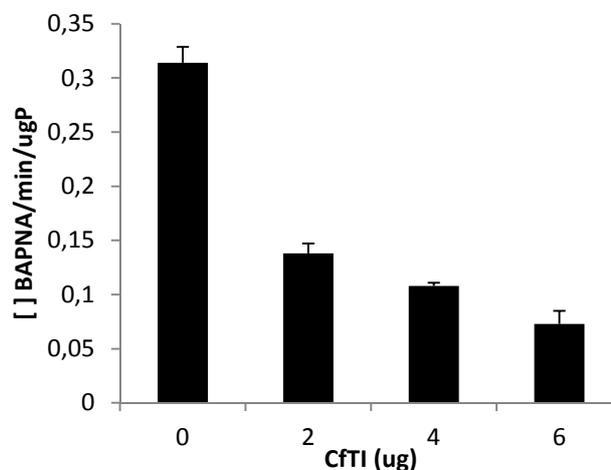


Figura 3: Efeito *in vitro* de concentrações crescentes de CfSP sobre as enzimas digestivas de larvas do 4º instar de *A. kuehniella*, utilizando BAPNA como substrato.

Várias pesquisas têm mostrado a grande eficiência de inibidores de proteinase sobre as enzimas digestivas de lepidópteros *in vitro*. Macedo *et al.* (2011) analisaram o efeito de um inibidor de sementes de *Sapindus saponaria* sobre as enzimas do tipo tripsina de larvas de *A. kuehniella*, *Corcyra cephalonica*, *Anticarsia gemmatalis* e *Diatraea saccharalis*, o qual diminuiu a atividade das enzimas digestivas desses insetos. Estudos têm revelado que a eficiência dos diferentes IPs sobre as larvas de insetos da ordem Lepidoptera *in vitro*, é devido ao fato de seu trato digestivo possuir pH alcalino, ideal para atividade das enzimas proteolíticas do tipo tripsina e quimotripsina, que são as principais classes de enzimas (RYAN, 1990).

Ao ingerir uma dieta artificial contendo IPs específicos para a principal classe de proteases de seus intestinos, os insetos sem a obtenção de aminoácidos essenciais, poderão ter seu crescimento e desenvolvimento retardados, interferindo assim na sua reprodução e sobrevivência (MACEDO *et al.*, 2010b).

Porém os insetos possuem mecanismo para sobrepujar a ação do inibidor. Em consequência, muitas vezes, somente o ensaio *in vitro* não é o suficiente para determinar se o inseto é susceptível aos efeitos do inibidor (MACEDO *et al.*, 2011).

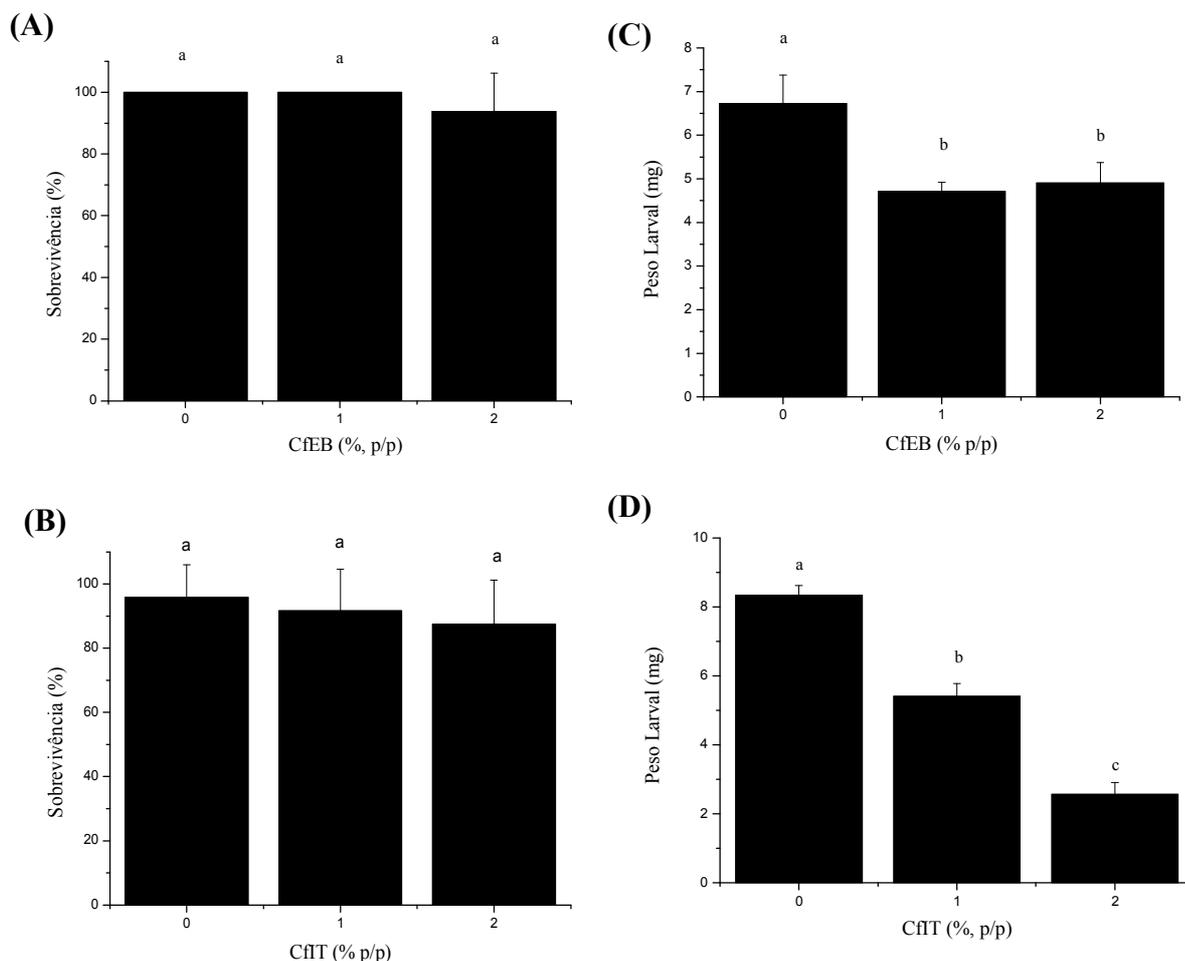


Figura 4: Sobrevivência e peso médio das larvas de 4º instar de *A. kuehniella* alimentadas em dietas artificiais contendo, respectivamente (A e C) CfEB e (B e D) CfSP em concentrações de 1% e 2%. Letras diferentes significam que são estatisticamente diferentes entre si, segundo análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Esses resultados levaram-nos a investigar o potencial de CfEB e do CfSP, respectivamente nas concentrações de 1 e 2% em dieta artificial, sobre o desenvolvimento larval de *A. kuehniella* até o 4º instar. Em relação à sobrevivência, não houve diferenças significativas em nenhum tratamento (Figura 4A e B). No entanto, foram observadas diferenças significativas em relação ao peso médio larval (Figura 4C e D); as larvas de *A. kuehniella* submetidas à dieta contendo 2% de CfSP tiveram seu peso médio larval reduzido em cerca de 69% em relação ao controle. Além disso, observou-se uma redução de 8,34 (controle) para 5,4 mg e 2,57 mg nos tratamentos a 1 e 2% de CfSP, respectivamente. Assim, assume-se que os passos de purificação do inibidor mostraram um aumento do efeito inseticida.

Também foram analisados os índices nutricionais (Tabela 1), onde CfEB e CfSP tiveram efeito sobre o desenvolvimento larval do inseto. Os resultados mostraram uma redução na porcentagem da eficiência do alimento ingerido e do alimento digerido nos tratamentos e um aumento no custo metabólico, quando comparado ao controle. Sugere-se que, a eficiência em transformar alimento em biomassa pode ter sido prejudicada pelo fato do inibidor ter a capacidade de se acoplar às enzimas digestivas do inseto, impedindo assim a proteólise e agindo de forma tóxica ao organismo. Como forma de compensação pela falta da demanda nutricional, o inseto aumenta o custo metabólico a fim de sobrepujar os efeitos do inibidor contido

na dieta, como visto nas larvas alimentadas em uma dieta a 2% de CfSP. Esses resultados, junto ao peso médio, mostram que a fração CfSP contendo o inibidor de *C. flexuosa* possui propriedades tóxicas sobre o desenvolvimento larval de *A. kuehniella*.

Tabela 1. Índices nutricionais (%): Eficiência de Conversão do alimento Ingerido (ECI), Eficiência de Conversão do alimento Digerido (ECD), Digestibilidade Aparente (AD), Custo Metabólico (CM) das larvas de 4º instar de *A. kuehniella* alimentadas com diferentes dietas na presença do extrato bruto e inibidor de tripsina de *C. flexuosa*, respectivamente CfEB e CfIT.

	CfEB			CfIT		
	0%	1%	2%	0%	1%	2%
ECI ⁽¹⁾	9,52 ± 0,08	7,79 ± 1,15*	8,65 ± 0,23*	9,26 ± 0,38	9 ± 0,07 ^{ns}	6,6 ± 1,44*
ECD ⁽¹⁾	10,87 ± 0,44	8,27 ± 1,18*	9,42 ± 0,20*	11,18 ± 0,21	10,23 ± 0,15*	7,52 ± 1,64*
AD ⁽¹⁾	86,46 ± 1,22	94,38 ± 1,57*	91,32 ± 0,96*	82,8 ± 1,83	87,57 ± 0,35*	86,97 ± 0,91*
CM ⁽¹⁾	89,12 ± 0,44	92,03 ± 1,24*	90,58 ± 0,2*	88,8 ± 0,21	89,76 ± 0,15*	92,46 ± 1,64*

⁽¹⁾ Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. ^{ns} Não-significativo. * Significativo, quando comparado ao controle (0%).

Os estudos com inibidores de tripsina de sementes de *Peltophorum dubium* (MACEDO *et al.*, 2003), *Plathymentia foliolosa* (RAMOS *et al.*, 2009) e *Adenantha pavovina* (MACEDO *et al.*, 2010a), também demonstraram atividade tóxica em relação às larvas de *A. kuehniella*, tendo sido observado diminuição no peso médio larval e alteração nos índices nutricionais, ratificando que os inibidores de proteinases são proteínas com propriedades antinutricionais.

4. CONCLUSÕES

1. Após dois passos cromatográficos, foi obtida uma fração rica em inibidor de tripsina das sementes de *C. flexuosa* (CfSP).
2. A fração CfSP apresenta um inibidor que mostra atividade inibitória sobre as enzimas do tipo tripsina de *A. kuehniella*;
3. O efeito inseticida da fração CfSP é evidenciado pela redução do peso médio larval e sobre a alteração dos índices nutricionais, quando esta é oferecida em uma dieta artificial à larvas de *A. kuehniella*.
4. As características bioquímicas (atividade tríptica e quimotríptica, coloração negativa, cromatografia de afinidade) e físico-química (peso molecular) sugerem que CfIT seja um inibidor da família Kunitz.

5. AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve o apoio da FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FINEP.

6. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA NETO, J. X.; ANDRADE, A. P.; LACERDA, A. V.; FELIX, L. P.; DA SILVA, D.S. Crescimento e bromatologia do feijão-bravo (*Capparis flexuosa* L.) em área de Caatinga no Curimataú paraibano, Brasil. *Revista Ciência Agronômica*. v. 42, p. 488-494, 2011.
- BABU, R. M.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M. S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management—an over view. *Crop Protection*. v. 22, p. 1071–1086, 2003.
- BIRK, Y. Plant Protease Inhibitors: Significance in Nutrition, Plant Protection, Cancer Prevention and Genetic Engineering. Springer-Verlag, Berlin, p. 1-170, 2003.
- BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal of Biochemistry*. v. 204, p. 433–451, 1992.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRIOSCHI, D.; NADALINI L. D.; BENGTONSON M. H.; SOGAYAR, M. C.; MOURA, D.S. ; SILVA-FILHO, M. C. General up-regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v. 37, p. 1283-1290, 2007.
- BUSATO, G. R.; GRÜTZMACHER, A. D.; GARCIA, M. S., GIOLO, P. F.; MARTINS, A. F. Consumo e utilização de alimento por *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) originária de diferentes regiões do Rio Grande do Sul, das Culturas do Milho e do Arroz Irrigado. *Neotropical Entomology*. v. 31, p. 525-529, 2002.
- CHAVEZ, P. I.; SÁNCHEZ, I. A.; GONZÁLEZ, F. A.; RODRÍGUEZ, J. L.; AXELROD, F. Cytotoxicity correlations of Puerto Rican plants using a simplified brine shrimp lethality screening procedure. *Pharmaceutical Biology*. v. 35, p. 222-226, 1997.
- CHYE, M.L.; SIN, S.F.; XU, Z.F.; YEUNG, E. C. Serine proteinase inhibitor proteins: exogenous and endogenous functions. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*. v. 42, p. 100–108, 2006.
- DE MORI, C.; LORINI, I. Manejo Integrado de Pragas de Grãos Armazenados (MIPGRÃOS). Passo Fundo: *EMBRAPA Trigo*, 2007.
- ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysic*. v. 95, p. 271–278, 1961.
- GOMES, A. P. G.; DIAS, S. C.; BLOCH JR., C.; MELO, F. R.; FURTADO JR., J. R.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SA, M. F.; FRANCO, O. L. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin

inhibitor from chickpea seeds. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. v. 140, p. 313-319, 2005.

GONCALVES, F. J. T.; FREIRE, F. C. O.; ANDRADE NETO, M. Atividade antagonista do óleo essencial dos frutos de *Capparis flexuosa* em ovos de juvenis de *Meloidogyne incognita*. In: Congresso Brasileiro De Defensivos Agrícolas Naturais. Anais; 2000; Fortaleza: Cobradan, p. 35, 2000.

JAMAL, F.; PANDEY, P. K.; SINGH, D.; KHAN, M.Y. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochemistry*, v. 12, p. 1-34, 2013.

KJAER, A.; SCHUSTER, A. Glucosinolates in *Capparis flexuosa* of Jamaican origin. *Pytochemistry*. v. 10, p. 3155-3160, 1971.

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

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

MACEDO, M. L. R., FREIRE, M. G. M., CABRINI, E. C., TOWAMA, M. H., NOVELLO, J. C., MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochimica et Biophysica Acta*. v. 1621, p. 1-13, 2003.

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

MACEDO, M. L. R.; DURIGAN, R.,A.; SILVA, D. S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M. G. M.; PARRA, J. R. P. *Adenanthera pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. v. 73, p. 213-231, 2010a.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; KUBO, C. B. G.; PARRA, J. R. P. Bioinsecticidal activity of *Talisia esculenta* reserver protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Anticarsia gemmatalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. v. 153, p. 24-33, 2010b.

MACEDO, M. L. R.; DIZ FILHO, E. B.; FREIRE, M. G. M.; OLIVA, M. L.; SUMIKAWA, J. T.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Sapindus saponaria* L. seeds: purification, characterization, and activity towards pest insect digestive enzyme. *Protein Journal*. v. 30, p. 9-19, 2011.

MIKKELSEN, M. D.; HALKIER, B. A Metabolic engineering of valine- and isoleucine- derived glucosinolates in *Arabidopsis* expressing CYP79D2 from Cassava. *Plant Physiology*. v. 131, p. 773-779, 2003.

MORAES, R. M. A., JOSÉ, I. C., RAMOS, F. G., BARROS, E. G., MOREIRA, M. A. Caracterização bioquímica de linhagens de soja com alto teor de proteína. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v. 41, p. 725-

729, 2006.

OLIVEIRA, C. F. R.; MACEDO, M. L. R. Emprego de inibidores de protease vegetais como ferramenta biotecnológica alternativa no controle de pragas. *Perspectiva on line: Biológicas & Saúde*. v. 1, p. 1-11, 2011.

RAJESH, P.; SELVAMANI, P.; LATHA, S.; SARASWATHY, A.; RAJESH KANNAN, V. A review on chemical and medicobiological applications of Capparidaceae family. *Pharmacognosy Review*. v. 3, p. 378-387, 2009.

RAMOS, V. S., FREIRE, M. G. M., PARRA, J. R. P., MACEDO, M. L. R. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology A Molecular Integrative Physiology*. v. 152, p. 255-261, 2009.

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

TELES, R. C.; DE SOUZA, E. M.; CALDERON, L. A.; DE FREITAS, S. M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. *Phytochemistry*. v. 65 (7), p. 793-797, 2004.

URIEL, J.; BERGUES, J. Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. *Nature*. v. 218, p. 578-580, 1968.

WALDBAUER, G. P. The consumption and utilization of food by insects. *Advances in insect Physiology*. v. 5, p. 229-288, 1968.

ZHU, Y. C.; LIU, X.; MADDUR, A. A.; OPPERT, B.; CHEN, M. S. Cloning and characterization of chymotrypsin- and trypsin-like cDNAs from the gut of the Hessian fly [*Mayetiola destructor* (say)]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. v. 35, p. 23-32, 2005.