



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**LÁTEX DE *Plumeria rubra* L. (JASMIM): PERFIL PROTÉICO,
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E AÇÃO CONTRA INSETOS**

ELIANE SILVA ARAÚJO

FORTALEZA-CE

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

**LÁTEX DE *Plumeria rubra* L. (JASMIM): PERFIL PROTÉICO,
CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA E AÇÃO CONTRA INSETOS**

ELIANE SILVA ARAÚJO

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica.
Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

FORTALEZA-CE

2009

Esta dissertação foi apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontrar-se-á à disposição na Biblioteca Central da referida Universidade.

A transcrição ou utilização de qualquer trecho deste trabalho é permitida desde que seja feito de acordo com as normas da ética científica.

Eliane Silva Araújo

Dissertação aprovada em: 19/02/2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC
Orientador

Profª Dra. Ana Lúcia Ponte Freitas
Deptº de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC
Examinadora

Prof. Dr. Renato de Azevedo Moreira
Centro de Ciências da Saúde - Unifor
Examinador

Profª. Dra. Ana Cristina de Oliveira M. Moreira
Centro de Ciências da Saúde - Unifor
Examinadora

Dedico este trabalho a todos
que contribuíram direta ou
indiretamente para a
sua realização.

FINANCIAMENTO

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

- Universidade Federal do Ceará, através do Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais, coordenado pelo Professor Dr. Márcio Viana Ramos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular;
- Universidade Federal do Rio Grande do Norte, através do Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas, coordenado pelo Professor Dr. Maurício Pereira Sales, do Departamento de Bioquímica;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);
- Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP);
- Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO);
- *International Foundation for Science (IFS).*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. **Márcio Viana Ramos**, pela orientação deste trabalho. Por contribuir diretamente para meu crescimento pessoal e profissional. Pela confiança em mim depositada, pelas cobranças, conselhos e incentivos incessantes. Por ser um exemplo de competência e honestidade.

À professora Dra. **Ana Lúcia Ponte Freitas**, por ter aceitado o convite para participar da banca examinadora, pelos excelentes ensinamentos em bioquímica, pela sua valiosa contribuição ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBBM) da UFC como professora, pesquisadora e chefe de departamento. Por ser uma pessoa sempre gentil e agradável.

Ao Professor Dr. **Renato de Azevedo Moreira**, por ter aceitado o convite para participar da banca examinadora, pelas críticas e sugestões que, certamente, foram pertinentes e bem-vindas para o engrandecimento deste trabalho. Pela sua valiosa contribuição ao DBBM, como professor e pesquisador.

À Professora Dra. **Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira**, por ter aceitado o convite para participar da banca examinadora, por todas as críticas e sugestões que também foram muito pertinentes e justas, e contribuíram bastante para o melhoramento deste trabalho.

Ao Professor Dr. **Maurício Pereira Sales**, por cooperar gentilmente para a realização de parte deste trabalho através dos experimentos realizados em seu laboratório, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Pelas sugestões e por toda gentileza dispensada a mim naquele momento.

A todos os professores do DBBM, pelos valiosos ensinamentos em bioquímica. Também aos funcionários e colegas, pelos auxílios e gentilezas durante estes dois anos no departamento de bioquímica.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas, pelos conhecimentos cedidos e pelos ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

Aos colegas do Laboratório de Biologia e Bioquímica de Proteínas Vegetais, **Cléverson Diniz**, **João Vítor** e **Diego de Souza** pelo apoio e companhia diária. Ao **Fabiano Teixeira**, pela agradável hospedagem em sua casa no Rio Grande do Norte, pelos momentos de descontração. Ao **Jefferson Oliveira**, pela ajuda e apoio demonstrados nas horas de necessidade. Ao **Júnior** pela amizade, carinho e disponibilidade sempre demonstrada, por seu jeito alegre de ser, que contagia a todos. Às meninas **Danielle Aragão**, **Carolina Viana**,

Mayara Patrícia e Teresa Cristina, pela ótima convivência no laboratório, companheirismo e pelos grandes momentos de aprendizado e alegria.

À minha amiga **Mariana Giovenardi**, por sua ajuda na parte escrita e experimental da dissertação. Por todo apoio, companheirismo e amizade, pelos conselhos e sugestões. Por compartilhar os momentos de alegria vividos ao lado dos nossos amigos da biologia.

De forma especial, à minha amiga **Raquel Sombra**, pela ajuda impagável na finalização deste trabalho, por todo empenho demonstrado na revisão dessa dissertação. Por seu carinho, amizade e alegria contagiante. Por ter estado sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos do laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais, **Davi Felipe, Nathanna Mateus, Leide Clarissa**. À garotada, **Glauber, Sayonara, Bruno, Martônio, Terezinha, Pedro, Raquel**. Às “agregadas”, **Nara** (minha grande amiga) e **Cecília**. Por todos os nossos momentos de alegria e descontração, pelo apoio, conselhos, incentivos. Por serem meus queridos amigos.

À **minha família**, de um modo geral, pelo apoio, união em todas as horas, pelos momentos felizes convividos.

Finalmente, ao meu noivo, **Igor Ricardo Alves**, por ter sempre estado ao meu lado ao longo desses anos, por todo seu apoio, carinho e preocupação.

Muito Obrigada!

“Vendo Jesus aquela multidão, subiu a um monte e, tendo-se sentado, aproximaram-se dEle os seus discípulos, e Ele se pôs a ensiná-los, dizendo:

Bem aventurados os pobres de espírito, porque deles é o reino dos céus.

Bem aventurados os mansos, porque possuirão a terra.

Bem aventurados os que choram, porque serão consolados.

Bem aventurados os que têm fome e sede de justiça, porque serão saciados.

Bem aventurados os misericordiosos, porque alcançarão misericórdia.

Bem aventurados os puros de coração, porque verão a Deus.

Bem aventurados os pacíficos, porque serão chamados filhos de Deus.

Bem aventurados os que sofrem perseguição por amor à justiça, porque deles é o reino dos céus.”

(Mateus, 5:1-10).

RESUMO

Látex de *Plumeria rubra* L. (Jasmim): Perfil Protéico, Caracterização Enzimática e Ação Contra Insetos

Plumeria rubra L. é uma planta laticífera pertencente à família *Apocynaceae* popularmente conhecida como Jasmim. Por apresentar flores vistosas e perfumadas, essa árvore é comumente vista ornamentando praças e jardins residenciais dos grandes centros urbanos. Plantas laticíferas são assim denominadas por que produzem endogenamente um fluido de aspecto geralmente leitoso - o látex - que é exsudado da planta quando esta sofre algum tipo de ferimento, seja por dano mecânico ou por ataque de predadores. O látex é um material vegetal que tem sido alvo de estudos bioquímicos e farmacológicos que mostram ser ele uma fonte promissora de compostos com potencial aplicação biotecnológica. No presente trabalho o látex de *P. rubra* foi alvo de investigações bioquímicas e biológicas com ênfase na pesquisa de proteínas que pudessem apresentar alguma ação deletéria contra insetos pragas agrícolas. Procedimentos laboratoriais que empregam centrifugações e diálises permitiram o fracionamento do látex em três componentes distintos: borracha (BL), proteínas (PLPr) e moléculas de baixa massa molecular (DL). A fração PLPr foi alvo de caracterização bioquímica e enzimática e foi utilizada em bioensaios com o caruncho do feijão-de-corda, *Callosobruchus maculatus* e com a mosca-das-frutas, *Ceratitis capitata*. O látex íntegro e suas frações foram utilizados em ensaios de repelência da ovoposição de *C. maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*. A fração BL é o componente majoritário do látex, 70 %, enquanto as frações PLPr e DL constituem cerca de 15 % cada uma. O teor de proteínas solúveis na fração PLPr foi de 0,33 mg/mL. Análises eletroforética e espectrométricas revelaram a presença de proteínas com massas moleculares que variaram de 12 a 117 kDa, com um máximo de proteínas com 26 kDa e $pI < 6,0$. A caracterização enzimática mostrou que as enzimas antioxidantes superóxido dismutase e peroxidase foram detectadas na fração protéica, assim como, uma atividade quitinásica. As proteínas do látex foram capazes de degradar azocaseína (substrato inespecífico) e BANA (substrato específico para proteases cisteínicas). As enzimas proteolíticas detectadas foram principalmente do tipo cisteínica, e em menor proporção, serínica. O pH e a temperatura ótimos para esta atividade foram 6,0 e 37 °C, respectivamente, onde valores de temperatura superiores anulam a atividade. Utilizando experimentos de dieta artificial pôde-se observar que a fração protéica do látex a 0,4 % foi capaz de diminuir em 50 % a sobrevivência, e a 0,1 %, diminuir 50 % do ganho de massa das larvas de *C. maculatus*. Quando essas proteínas foram desnaturadas por aquecimento o desenvolvimento larval foi igual ao controle, sugerindo que a manutenção da estrutura protéica é essencial para o efeito observado. As proteínas do látex não foram digeridas pelas proteases endógenas do trato digestório das larvas, sugerindo que as mesmas ficariam livres para causar o efeito deletério. Nenhum efeito no desenvolvimento das larvas de *C. capitata* foi observado quando as proteínas foram adicionadas à dieta, mesmo na concentração de 4 %. O látex íntegro, quando adsorvido em sementes de feijão, apresentou atividade inibitória do tipo repelente sobre a ovoposição de ambos os bruquídeos testados, sendo mais evidente em *Z. subfasciatus*. A ação repelente observada foi dose e tempo dependente. O látex não foi capaz de afetar a viabilidade dos ovos e nem o desenvolvimento larval. As frações PLPr e DL não apresentaram atividade repelente, mostrando que nem proteínas nem moléculas de baixa massa molecular estão envolvidas nessa ação. Os insetos, quando expostos diretamente ao látex por longo período de tempo não tiveram sua fecundidade nem ovoposição afetados, sugerindo que o efeito observado não altera a fisiologia do animal.

Palavras-Chave: *Plumeria rubra*, látex, insetos, atividade enzimática, repelência

ABSTRACT

Latex of *Plumeria rubric* L. (Jamie): Protein Profile, Enzymatic Characterization and Action Against Insects

Plumeria rubric L. is a laticífera plant belonging to the family *Apocynaceae* popularly known as Jamie. For spicy and fragrant flowers make this tree is commonly seen ornate squares and gardens of residential urban centers. Laticífera plants are well known for producing a fluid endogenously generally milky in appearance - latex - that exudates from the plant when it undergoes some type of injury, either by mechanical damage or attack by predators. Latex is a material that has been the subject of biochemical and pharmacological studies show that it is a promising source of compounds with potential biotechnological application. In this study the latex of *P. rubric* was the subject of biochemical and biological research with emphasis on the search for proteins that could make any deleterious action against agricultural insect pests. Laboratory procedures that employ centrifugation and dialysis allowed the fractionation of latex into three distinct components: rubber (BL), proteins (PLPr) and low molecular weight molecules (DL). The PLPr fraction was subject to biochemical and enzymatic characterization and was used in bioassays with the bean weevil-of-rope, *Callosobruchus maculatus* and the fruit fly, *Ceratitis capitata*. The full latex and its fractions were used in testing the repellency of oviposition of *C. maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. The BL fraction is the major component of latex, 70 %, while PLPr and DL fractions are about 15 % each one. The content of soluble protein in PLPr fraction was 0.33 mg / mL. Espectrometric and electrophoretic analysis revealed the presence of proteins with molecular weights ranging from 12 to 117 kDa, with a maximum of protein with 26 kDa and pI <6.0. The characterization showed that the enzyme antioxidativas enzymes superoxide dismutase and peroxidase were detected in the protein fraction, as well as activity chitinases. Proteins of latex were able to degrade azocasein (nonspecific substrate) and BANA (specific substrate for cysteine proteases). The proteolytic enzymes were detected mainly of type cysteine and to a lesser extent, serine proteases. The pH and temperature optimum for this activity was 6.0 and 37 °C respectively, where higher values of temperature cancel the activity. Through experiments with artificial diet can be observed that the protein fraction of latex in 0.4 % was able to reduce by 50 % the survival and, in 0.1 %, reduce the by 50 % the weight gain of larvae of *C. maculatus*. When these proteins were denatured by heating the larval development was similar to the control, suggesting that the maintenance of protein structure is essential for the observed effect. Proteins of latex were not digested by endogenous proteases of the digestive tract of larvae, suggesting that they would be free to cause deleterious effects. No effect on the development of the larvae of *C. capitata* was observed when the proteins were added to the diet, even at a concentration of 4 %. Whole latex when adsorbed in bean seeds, showed repellent activity on oviposition of both bruchid, being more evident in *Z. subfasciatus*. The repellent activity was observed time and dose dependent. The latex was unable to affect the viability of eggs or larval development. The PLPr and DL fractions showed no repellent activity, showing that neither protein nor molecules with low molecular weight are involved in this action. The insects, when exposed directly to the latex for a long period of time had not affected their fecundity or oviposition.

Key-words: *Plumeria rubra*, latex, insects, enzymatic activity, repellence

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática e anatomia dos dois tipos de laticíferos.....	5
Figura 2	Aspecto geral da planta <i>Plumeria rubra</i>	7
Figura 3	Aspectos da infestação de <i>Callosobruchus maculatus</i> , <i>Zabrotes subfasciatus</i> e <i>Ceratitis capitata</i> em grãos de feijão e frutas.....	12
Figura 4	Esquema geral do fracionamento do látex de <i>Plumeria rubra</i>	19
Figura 5	Perfil cromatográfico da fração PLPr de <i>Plumeria rubra</i> em coluna de quitina.....	40
Figura 6	Perfil cromatográfico e eletroforese em gel de poliacrilamida das frações sequenciais recuperadas da cromatografia de exclusão molecular.....	41
Figura 7	Eletroforese em gel de poliacrilamida da fração protéica do látex de <i>Plumeria rubra</i> na presença ou ausência de SDS.....	42
Figura 8	Eletroforese bidimensional das proteínas do látex de <i>Plumeria rubra</i>	43
Figura 9	Espectro de massas e eletroforese bidimensional das proteínas do látex de <i>Plumeria rubra</i>	44
Figura 10	Atividade proteolítica das proteínas do látex de <i>Plumeria rubra</i>	47
Figura 11	Atividade proteolítica do látex de <i>Plumeria rubra</i> na presença de diferentes inibidores de proteinases utilizando azocaseína como substrato.....	48
Figura 12	Atividade proteolítica do látex de <i>Plumeria rubra</i> na presença de diferentes inibidores de proteinases utilizando BANA como substrato.....	49
Figura 13	Atividade proteolítica do látex de <i>Plumeria rubra</i> em diferentes valores de pH.....	51
Figura 14	Atividade proteolítica das proteínas do látex de <i>Plumeria rubra</i> aquecidas em diferentes temperaturas.....	52
Figura 15	Deteção de atividade quitinásica, proteinásica e peroxidásica em gel.....	53
Figura 16	Número de ovos depositados por fêmeas de <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i> em sementes de feijão-de-corda cobertas com diferentes diluições do látex de <i>Plumeria rubra</i>	59

Figura 17	Número de ovos depositados por fêmeas de <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i> em sementes de feijão-de-corda tratadas com látex de <i>Plumeria rubra</i> avaliados em diferentes intervalos de tempo.....	60
Figura 18	Número de ovos depositados por fêmeas de <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i> em sementes de feijão-de-corda cobertas com látex íntegro de <i>Plumeria rubra</i> ou sua fração protéica (PLPr) a 1 %.....	61
Figura 19	Número de ovos depositados por fêmeas de <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i> em sementes de feijão-de-corda cobertas com látex íntegro de <i>Plumeria rubra</i> ou com a fração FD a 0,5, 1 e 2 %.....	62
Figura 20	Número de ovos depositados por fêmeas de <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i> em sementes de feijão-de-corda tratadas com látex de <i>Plumeria rubra</i> mantido sob agitação por diferentes intervalos de tempo.....	63
Figura 21	Número de ovos depositados em sementes de feijão-de-corda por fêmeas de <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i> expostos diretamente ao látex de <i>Plumeria rubra</i> por diferentes intervalos de tempo.....	64
Figura 22	Percentual de sobrevivência e massa das larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> alimentadas com diferentes concentrações da fração PLPr do látex de <i>Plumeria rubra</i>	66
Figura 23	Percentual de sobrevivência e massa das larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> alimentadas com diferentes concentrações da fração FD do látex de <i>Plumeria rubra</i>	67
Figura 24	Percentual de sobrevivência e massa das larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> alimentadas com a fração protéica do látex de <i>Plumeria rubra</i> íntegra ou aquecida, e com o pico I da cromatografia de exclusão molecular.....	68
Figura 25	Eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas do látex de <i>Plumeria rubra</i> incubadas a 37 °C com o homogenato intestinal das larvas de <i>C. maculatus</i> por diferentes intervalos de tempo.....	69
Figura 26	Massa e sobrevivência das larvas de <i>Ceratitidis capitata</i> alimentadas com dieta artificial enriquecida com concentrações crescentes da fração protéica (PrPL) do látex de <i>P. rubra</i>	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação taxonômica de <i>Plumeria rubra</i>	16
Tabela 2	Rendimento do fracionamento do látex de <i>Plumeria rubra</i> e estimativa do teor de proteínas na fração PLPr.....	39
Tabela 3	Enzimas antioxidantes detectadas na fração protéica do látex de <i>Plumeria rubra</i>	46
Tabela 4	Número de ovos depositados por fêmeas de <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i> sobre sementes de feijão-de-corda cobertas com diferentes preparações do látex de <i>Plumeria rubra</i>	57
Tabela 5	Taxa de sobrevivência e massa das larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i> desenvolvidas em sementes de feijão-de-corda cobertas com diferentes preparações do látex de <i>Plumeria rubra</i>	58

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

ANOVA	Análise de Variância
APX	Peroxidase do Ascorbato
BANA	N-benzoil-arginina-naftilamida
BAPNA	Benzoil-arginina-p-nitroanilida
BL	Borracha do Látex
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAT	Catalase
kDa	KiloDalton
DL	Dialisato do Látex
DMACA	4-Dimetil-amino-cinamaldeído
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetra-acético
EPM	Erro Padrão da Média
ESI	<i>Electron Spray Íon</i>
E-64	Trans-epoxisuccinil-L-leucil-amido(4-guanidino)-butano
IAA	Iodoacetamida
IEF	<i>IsoElectric Focalization</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization</i>
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>
PBS	Tampão fosfato de sódio
PLPr	Proteínas do Látex de <i>Plumeria rubra</i>
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-flúor
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SOD	Superóxido dismutase
TCA	Ácido Tricloro Acético
TOF	<i>Time of Fly</i>
Tris	Tris-hidroxi-amino-metano
UA	Unidade de Atividade

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Defesa Vegetal.....	1
1.2	Látex.....	2
1.2.1	Composição bioquímica do látex.....	3
1.3	Plantas laticíferas	4
1.3.1	<i>Plumeria rubra</i> L.....	6
1.4	Pragas agrícolas.....	8
1.4.1	<i>Calosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i>	9
1.4.2	<i>Ceratitis capitata</i>	10
1.5	Estratégias de combate às pragas agrícolas.....	10
II	OBJETIVOS.....	13
III	JUSTIFICATIVA.....	14
IV	MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
	MATERIAIS.....	15
4.1	Reagentes.....	15
4.2.	Material vegetal.....	15
4.3.	Insetos.....	17
4.3.1	<i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i>	17
4.3.2	<i>Ceratitis capitata</i>	17
	MÉTODOS.....	17
4.4	Caracterização bioquímica.....	17
4.4.1	Coleta e fracionamento do látex.....	17
4.4.2	Rendimento.....	18
4.4.3	Dosagem de proteínas.....	20
4.4.4	Ensaio de hemaglutinação.....	20
4.4.5	Cromatografia de afinidade em coluna de quitina.....	21
4.4.6	Cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100).....	21
4.4.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	21
4.4.8	Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida.....	22
4.4.9	Espectrometria de massas.....	24

4.5	Caracterização enzimática.....	24
4.5.1	Detecção quantitativa de enzimas antioxidantes.....	24
4.5.1.1	Peroxidase.....	24
4.5.1.2	Catalase.....	25
4.5.1.3	Superóxido dismutase.....	25
4.5.2	Zimograma para detecção de atividade peroxidásica.....	26
4.5.3	Zimograma para detecção de atividade quitinásica.....	26
4.5.4	Detecção e caracterização de enzimas proteolíticas.....	26
4.5.4.1	Atividade proteolítica total usando Azocaseína como substrato.....	27
4.5.4.2	Atividade proteolítica do tipo cisteínica usando BANA como substrato.....	27
4.5.4.3	Atividade proteolítica do tipo serínica usando BApNA como substrato.....	28
4.5.4.4	Inibição de proteinases utilizando Azocaseína e BANA como substrato.....	28
4.5.4.5	Atividade proteolítica em diferentes faixas de pH.....	28
4.5.4.6	Atividade proteolítica em diferentes faixas de temperatura.....	29
4.5.5	Zimograma para detecção de atividade proteolítica.....	29
4.6	Ensaio biológicos.....	30
4.6.1	Bioensaio com <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i> ...	30
4.6.1.1	Ensaio de repelência.....	30
4.6.1.1.1	Atividade repelente do látex íntegro de <i>Plumeria rubra</i>	30
4.6.1.1.2	Dose-resposta da atividade repelente do látex.....	31
4.6.1.1.3	Determinação do tempo de repelência do látex.....	31
4.6.1.4	Atividade repelente das frações do látex.....	32
4.6.1.5	Atividade repelente do látex desprovido de compostos voláteis.....	32
4.6.1.6	Atividade repelente com os insetos expostos diretamente ao látex.....	33
4.6.1.2	Ensaio com dieta artificial.....	34
4.6.1.2.1	Preparo das sementes.....	34
4.6.1.2.1	Avaliação do efeito das frações do látex no desenvolvimento de <i>Callosobruchus maculatus</i>	34
4.6.1.3	Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> da fração PLPr frente às enzimas intestinais de <i>Callosobruchus maculatus</i>	35

4.6.2	Bioensaio com <i>Ceratitis capitata</i>	35
4.6.2.1	Manutenção e Cultura.....	35
4.6.2.2	Avaliação do efeito da fração PLPr no desenvolvimento de larvas de <i>Ceratitis capitata</i>	36
4.6.3	Análise estatística.....	36
V	RESULTADOS	37
5.1	Caracterização bioquímica	37
5.2	Caracterização enzimática	45
5.3	Ensaio biológico	54
5.3.1	Bioensaio com <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i> ...	54
5.3.1.1	Ensaio de repelência.....	54
5.3.1.2	Ensaio com dieta artificial.....	65
5.3.2	Bioensaio com <i>Ceratitis capitata</i>	70
VI	DISCUSSÃO	71
VII	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

I – INTRODUÇÃO

1.1 Defesa Vegetal

Devido ao fato de estarem ancoradas no solo e não apresentarem sistema circulatório imune, as plantas estão expostas a uma variedade de estresse ambiental. Em contrapartida, estas apresentam um grande número de estratégias de defesa que são utilizadas quando são atacadas por patógenos, herbívoros ou quando são submetidas a condições ambientais adversas (KOGAN, 1986).

As defesas da planta podem ser induzidas ou constitutivas. Os mecanismos naturais de proteção contra patógenos e predadores que fazem parte do programa de desenvolvimento normal da planta são referidos como resistência constitutiva. Além disso, os vegetais podem ativar mecanismos protetores em resposta a alguma agressão ou infecção, esse tipo de defesa é denominada induzida ou adquirida (CHESIN; ZIPF, 1990). Essa resposta induzida pode resultar em efetivos mecanismos de resistência a doenças quando ela é expressa pela planta sistematicamente (KUC; HAMMERSCHMIDT, 1995). Nesse caso, os agentes envolvidos induzem uma resposta do hospedeiro, não apenas em torno das partes atingidas, como também em partes da planta distantes da área onde ocorreu à injúria, sendo este processo denominado imunização sistêmica (DEAN; KUC, 1986; GOTTSTEIN; KUC, 1989).

Os mecanismos de defesa apresentados pelas plantas podem ser físicos ou químicos. A defesa física envolve a formação de estruturas como espinhos, acúleos, tricomas, tegumento resistente e outros. A defesa química envolve a produção de compostos químicos como flavonóides, inibidores de proteinases, vicilinas, lectinas, compostos fenólicos, alcalóides, terpenóides, proteínas inativadoras de ribossomos e quitinases (PAES *et al.*, 2000; ELDEN, 2000; HUESING *et al.*, 1991; XAVIER-FILHO, 1993).

A síntese de novas proteínas pode ocorrer durante um processo de estresse biótico, podendo estas ter uma ação direta ou indireta no decorrer da patogênese. As proteínas sintetizadas incluem proteínas da parede celular, enzimas envolvidas no metabolismo de flavonóides ou metabolismo oxidativo, proteínas tóxicas, proteínas com propriedades antimicrobianas, enzimas líticas, inibidores de amilases e de proteases e um grupo heterogêneo de proteínas conhecidas coletivamente como PR-Proteínas (proteínas

relacionadas à patogênese). Esse grupo de proteínas inclui quitinases e β -1,3 glucanases, que juntas impedem o crescimento de hifas, lectinas e vicilinas que se ligam à quitina de fungos e peroxidases envolvidas na fortificação da parede celular (GOMES *et al.*, 1997).

As quitinases são enzimas hidrolíticas envolvidas no reconhecimento e processamento dos mecanismos de resistência de plantas contra patógenos (BOWLES, 1990). Elas podem desempenhar papéis de defesa e funções biológicas na regulação e desenvolvimento de plantas (SELA-BUURLAGE *et al.*, 1993; MELO *et al.*, 1999).

Inibidores de enzimas digestivas encontrados em plantas são importantes devido ao potencial efeito deletério na nutrição animal e humana, bem como por seu possível papel de defesa em plantas contra microrganismos e insetos. Esses inibidores são divididos em quatro classes, de acordo com suas atividades específicas: inibidores de proteinases serínicas; cisteínicas, também chamados cistatinas; aspárticas e de metalo-proteinases (RYAN, 1990).

Inibidores específicos para enzimas proteolíticas de microrganismos são comuns em plantas, especialmente em sementes de leguminosas, dentre os quais se destacam os inibidores de subtilisinas (proteinases secretadas por *Bacillus subtilis*), pertencentes à classe dos inibidores de proteases serínicas. Tais inibidores são encontrados em muitos tubérculos, cereais e leguminosas (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1987) e podem ser ativos, também, contra várias proteases de outros microrganismos fitopatogênicos (RYAN, 1990).

As plantas possuem também inibidores de α -amilase que constituem uma importante família de proteínas de defesa, sendo encontrados em cereais como trigo, centeio (GARCIA-MAROTO *et al.*, 1991; FENG *et al.*, 1996), cevada (ABE *et al.*, 1993) e leguminosas, como o feijão comum (ISHIMOTO *et al.*, 1996) e o feijão-de-corda (MELO *et al.*, 1999).

1.2 Látex

Outra forma de defesa contra a invasão de patógenos e insetos encontrada pelas plantas são os sistemas de canais que contêm várias secreções, tal como os laticíferos, resinas e mucilagens (FARRELL *et al.*, 1991). O látex pode ser exsudado da planta quando esta sofre algum tipo de injúria, seja por dano mecânico ou por ataque de predadores. Após sofrer uma lesão, a planta libera o látex que protege a área injuriada contra patógenos e também possui uma propriedade colante que pode imobilizar alguns insetos (MOURSY, 1997).

A capacidade de produzir látex é encontrada em plantas de diferentes portes como ervas, arbustos e árvores. Embora o látex, na maioria das vezes, apresente aspecto leitoso, este pode apresentar coloração amarelada ou alaranjada como em plantas pertencentes à família Papaveraceae, marrom-amarelado em plantas do gênero *Cannabis*, ou pode ser límpido como em *Nerium oleander* (KEKWICK, 2001).

Várias funções biológicas têm sido atribuídas aos laticíferos. Tem-se sugerido há 100 anos, desde que o látex foi encontrado em plantas do semi-árido, que os laticíferos podem ser uma reserva de água, mas nem todas as plantas que contêm látex estão restritas a regiões secas. Possivelmente, a justificativa mais aceita da presença de látex é seu envolvimento na defesa da planta (RUDALL, 1987), que é evidenciada, principalmente, pelos tipos de compostos identificados nesse fluido. A presença de proteínas relacionadas à defesa contra patógenos (PR-Proteínas), como glucanases e quitinases (VAN LOON; VAN STTRIEN, 1999), proteinases (DUBEY; JAGANADHAM, 2002) e inibidores de proteinases (SRITANYARAT *et al.*, 2006) no látex de várias espécies sugere que essa secreção poderia agir como uma defesa da planta contra o ataque de insetos e patógenos.

1.2.1 Composição bioquímica do látex

O látex pode ser constituído por diversas substâncias, como polímeros de hidrocarbonetos, poliisopreno e proteínas (YEANG *et al.*, 2002). Neste fluido já foram encontrados terpenos, polifenóis, carbonatos, alcalóides, vitaminas, lipídeos e aminoácidos, além de uma diversidade de componentes celulares (MORCELLE *et al.*, 2004).

A substância presente no látex que apresenta a característica de elasticidade da borracha é um polímero de isopreno. O poli *cis*-isopreno é formado pela ação combinada de várias atividades enzimáticas presentes no fluido laticífero.

O látex possui uma grande diversidade de proteínas, sendo especialmente rico em enzimas com atividades proteolíticas. Relata-se a ocorrência de inúmeras proteinases no látex de diversas espécies do gênero *Euphorbia*. Denominadas de euphorbaínas, estas proteinases são classificadas como sendo do tipo serínicas (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987b). No látex de *Hevea brasiliensis*, relata-se também a ocorrência de proteases similares que foram denominadas de heveínas (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1986), o mesmo constata-se no látex de *Carica papaya*, também estudada pelo seu conteúdo de proteinases do tipo cisteínicas, tais como: papaína e quimopapaínas (MCKEE; SMITH, 1986; JACQUET *et al.*,

1989). Outros tipos de proteínas também têm sido estudadas no látex de plantas, especialmente em *H. brasiliensis*, como: quitinases (JEKEL *et al.*, 1991), beta-1,3-glucanases (CHEYE; CHEUNG, 1995), lisozimas, Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs), glicosidases (GIORDANI; LAFON, 1993), amilases (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987a), inibidores de proteinases (ARCHER, 1983; LIN; LU, 1994).

1.3 Plantas laticíferas

Dentre a grande variedade de plantas que compõem o Reino Vegetal, cerca de 12.500 espécies, pertencentes a 22 famílias, são consideradas plantas laticíferas (HAGEL *et al.*, 2008). Mas não somente as plantas produzem látex, além destas, algumas espécies de fungos dos gêneros *Lactarium* e *Peziza* também têm esta capacidade.

Entre as famílias de plantas produtoras de látex destacam-se Euphorbiaceae (LYNN; CLEVETTE-RADFORD, 1987b) e Apocynaceae (BROCKBANK; LYNN, 1979), embora outras famílias como Moraceae, Compositae, Anarcadiaceae e Sapotaceae também produzam esta substância (DELTA, 1982).

Plantas comuns como Jasmim (*Plumeria rubra* L.), Aveloz (*Euphorbia tirucalli*) e Sapoti (*Achras sapota*) são plantas laticíferas. Entretanto, sem qualquer dúvida, a planta laticífera mais conhecida em todo o mundo é a Seringueira (*Hevea brasiliensis*), espécie da região amazônica também conhecida como “árvore da borracha”. A borracha, matéria-prima extraída da seringueira, é oriunda de seu fluido laticífero e revolucionou a indústria no século XIX. A partir desta foi gerado uma considerável gama de produtos industrializados dos quais se destacam o pneu para automotivos e as luvas descartáveis utilizadas por profissionais da área de saúde e outros (SUSSMAN *et al.*, 2002). A importância comercial desta planta é o principal motivo de seu látex ser o mais estudado entre os já conhecidos.

Nas plantas, o látex encontra-se dentro de um sistema de canais denominados de laticíferos. Estes canais são células ou fileiras de células altamente especializadas que apresentam características morfológicas bastante peculiares. Assim, considerando seus aspectos anatômicos, dois tipos distintos de laticíferos são observados: os articulados, que são formados por células sequenciais interrompidas pela parede celular, mas interconectadas; e os não articulados, que são formados por uma única célula que cresce nos espaços intercelulares e eventualmente se ramificam nos tecidos das plantas de um modo similar às hifas de fungos (KEKWICK, 2001) (FIGURA 1).

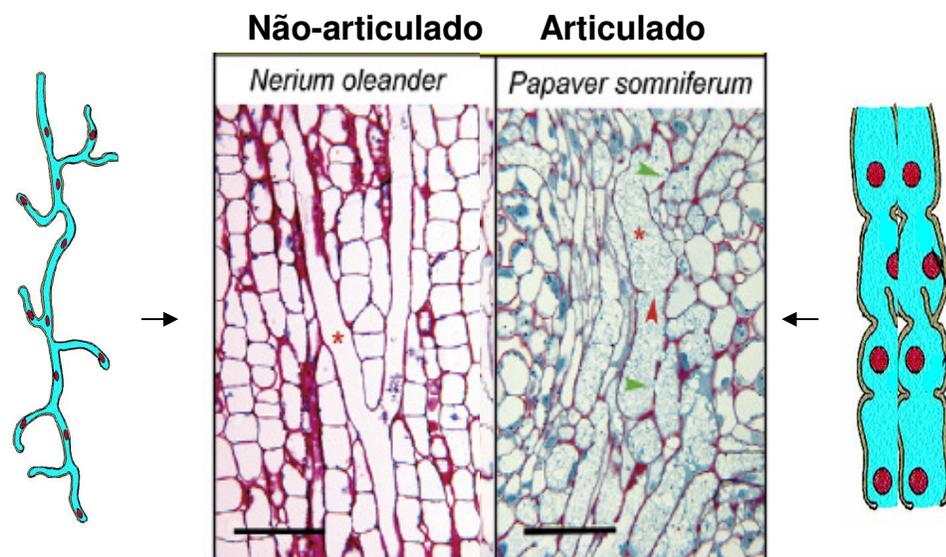


Figura 1 – Representação esquemática e anatomia dos dois tipos de laticíferos mostrada através de cortes longitudinais do caule de *Nerium oleander* (não-articulado) e *Papaver somniferum* (articulado). O canal laticífero está indicado pelo asterisco vermelho. Adaptado de HAGEL *et al.*, 2008.

Os canais laticíferos podem estar presentes em todas as partes da planta ou, apenas, em tecidos ou órgãos restritos. O látex poder ser extraído a partir do caule (*Hevea brasiliensis*), tubérculos (*Manihot glaziovii*), folhas (*Calotropis procera*), galhos (*Plumeria rubra*) ou do fruto (*Achras sapota*, *Carica papaya*). A extração de látex de *Hevea brasiliensis* ocorre através de incisões realizadas em seu tronco, mas o processo de coleta não é igual para todas as plantas. Por exemplo, o látex de *Calotropis procera* é coletado a partir de extremidades foliares, enquanto que em *Plumeria rubra* este fluido é abundante apenas nas extremidades dos seus galhos, não sendo possível coletar látex a partir de sua porção lenhosa.

1.3.1 *Plumeria rubra* L.

Plumeria rubra L. é uma planta laticífera que pertence à família *Apocynaceae*. Conhecida popularmente como jasmim, jasmim-manga, *frangipani* ou árvore-pagode, esta planta é originária da América Central e encontra-se amplamente distribuída pelas regiões de clima tropical do mundo, inclusive no Brasil (BROWN, 2008). Devido à beleza e perfume de suas flores, Jasmim é facilmente encontrada como planta ornamental em praças e jardins de muitas regiões metropolitanas (FIGURA 2).

O nome do gênero, *Plumeria*, é uma homenagem ao botânico que a descreveu, Charles Plumier. Trata-se de uma árvore, com ramificações bifurcadas, espessas de aspecto suculento, de 6-8 metros de altura. Com folhas decíduas, aglomeradas no ápice dos ramos. Possui inflorescência terminal, com numerosas flores sucessivas, perfumadas na espécie típica, vermelhas ou róseas com o centro amarelo (BROWN, 2008). Quanto ao seu cultivo, apresenta fácil multiplicação por estacas (LORENZI; SOUZA, 1999).

Estudos fitoquímicos desta planta demonstraram que ela possui muitos iridoides, um metabólito secundário monoterpênico. Estes iridoides demonstraram possuir atividade algicida, antibacteriana e citotóxica. Popularmente, esta planta é utilizada para combater a sífilis, como purgativo e no combate da febre (KARNODO *et al.*, 1990). No que se refere à atividade enzimática, o látex de *P. rubra* é uma fonte de atividade lipolítica (CAMBON *et al.*, 2006). Apesar desses relatos, *P. rubra* é pouco estudada quando considerado seus aspectos bioquímicos. Não existem, de acordo com pesquisa bibliográfica realizada, estudos relacionados ao uso desse látex com propósitos aplicados. No entanto, em algumas espécies de plantas laticíferas, como em *Calotropis procera* (RAMOS *et al.*, 2007) e em *Manihot glaziovii* (PEREIRA *et al.*, 1999), já foram detectadas atividades contra pragas agrícolas.



Figura 2 - Aspecto geral da planta *Plumeria rubra*. A: Árvore; B: Inflorescência; C: Flor; D: Ápice Caulinar (BROWN, 2008).

1.4 Pragas agrícolas

No ano de 2007, a população mundial ultrapassou os 6,6 bilhões e em 2025 é esperado que a população se aproxime dos 8,5 bilhões. O crescente aumento nas demandas alimentares como consequência do aumento da população humana e a intensificação das práticas agrícolas têm aumentado os problemas causados pelas pragas e, conseqüentemente, prejudicado o seu controle. As perdas nas produções agrícolas devido às pragas e doenças têm sido estimadas em 37 % do total da produção agrícola de todo o mundo, com 13 % destes sendo devido ao ataque de insetos (BABU *et al.*, 2003; GATEHOUSE *et al.*, 1992).

Na América do Sul, as larvas de algumas espécies de bruquídeos, como o *Acanthoscelides obtectus*, *Callosobruchus maculatus*, *Callosobruchus chinensis* ou *Zabrotes subfasciatus* são consideradas os principais predadores de sementes de feijões, responsáveis por enormes perdas, no período pré-colheita, bem como no período pós-colheita (GATEHOUSE *et al.*, 1995; LE BERRE-ANTON *et al.*, 2000).

No Brasil, os dados divulgados pelo Ministério da Agricultura indicam que as perdas por ataque de pragas durante o armazenamento dos produtos agrícolas chegam a 10% do total colhido, o que representa cerca de 10 milhões de toneladas de grãos.

Praticamente todas as espécies de plantas possuem predadores naturais, e com as plantas cultivadas de interesse comercial não é diferente. Culturas como feijão, milho, cana-de-açúcar e frutas tropicais, dentre outras, são de grande importância econômica e formam a base da agricultura da região Nordeste. Contudo, o ataque de pragas é um dos principais problemas enfrentados pelos produtores agrícolas, sendo um dos principais fatores de perda de produção em áreas de agricultura.

As pragas que infestam os grãos armazenados são provenientes do campo, isto é o que se chama de infestação cruzada. A infestação pode ser feita por meio de ovos, larvas ou adultos, que juntamente com as vagens, grãos ou sacarias, chegam aos armazéns, infestando também os grãos já existentes. Por outro lado, grãos sadios provenientes do campo podem ser infestados nos armazéns quando medidas preventivas não são tomadas. Portanto, a contaminação inicial pode ocorrer tanto no campo como nos armazéns. As principais pragas que atacam o feijão Caupi em condições de armazenamento são: os bruquídeos como *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*, e a traça *Plodia interpunctella* (FREIRE FILHO *et al.*, 2005).

1.4.1 *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*

Dentre as diversas espécies de leguminosas, o feijão é considerado produto básico na alimentação humana, sendo uma das mais importantes fontes de proteínas, calorias, vitaminas do complexo B e minerais na América Latina (GUZMÀN-MALDONADO *et al.*, 1996; ISHIMOTO; CHRISPEELS, 1996). Cultivos de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) podem ser severamente danificados quando infestados por *Acanthoscelides obtectus* e/ou *Z. subfasciatus*, dois bruquídeos do novo mundo (DOBIE *et al.*, 1990). Outros cultivos de leguminosas, tais como ervilhas (*Pisum sativum*) e feijões do gênero *Vigna* também sofrem extensivos danos se infestados pelo *Bruchus pisorum* e *C. maculatus* (CHRISPEELS *et al.*, 1998).

Uma das principais pragas do feijão de corda (*Vigna unguiculata*) é o *C. maculatus* (Coleoptera: Bruchidae), que ataca, principalmente, as sementes estocadas, afetando severamente a qualidade, a massa e a capacidade de germinação (HALL *et al.*, 1997; DONGRE *et al.*, 1996). Este caruncho pode ocasionar perda de massa dos grãos na ordem de 60 % em seis meses de armazenamento (TANZUBIL, 1991).

O *Z. subfasciatus* (Both.) (Coleoptera) está largamente distribuído entre os trópicos como uma das principais pragas de sementes de leguminosas tais como de *Phaseolus vulgaris* (L.), *P. lunatus* (L.) (MEIK *et al.*, 1986) e *V. unguiculata* (LEMOS *et al.*, 1990). Semelhante ao *C. maculatus* este inseto também causa severos danos nas sementes como perda de massa, redução do poder germinativo, do valor nutritivo e, conseqüentemente, desvalorização comercial dos grãos devido à presença de insetos mortos, furos, ovos e excrementos (GALLO *et al.*, 1988).

Os insetos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* apresentam características físicas e ciclos de vida bem semelhantes, podendo ser identificados pelas características apresentadas nas pernas posteriores dos adultos. Os ovos são colocados sobre as vagens ou diretamente sobre as sementes das leguminosas. A duração completa do ciclo de vida é de 26 dias a 30 °C. Os ovos são colocados em um líquido claro e pegajoso expelido pela fêmea servindo de apoio para a penetração da larva para o interior do grão. As larvas são do tipo curculioniforme, passando diretamente do ovo para o interior da semente. As pupas apresentam coloração branca-leitosa e medem cerca de 3 mm de comprimento. Os adultos são besouros pequenos com 1,8 a 2,5 mm de comprimento e coloração castanho escura. As fêmeas são maiores que os machos e

apresentam manchas claras bem definidas em sua superfície superior, contrastando com a cor escura do seu corpo (COUTINHO *et al.*, 2000).

1.4.2 *Ceratitidis capitata*

O Brasil é um dos três maiores produtores mundiais de frutas, com uma produção que supera os 34 milhões de toneladas. A base agrícola da cadeia produtiva das frutas abrange 2,2 milhões de hectares, gerando 4 milhões de empregos diretos e um PIB agrícola de US\$ 11 bilhões (IBRAF, 2008).

A mosca-das-frutas, também conhecida como mosca-do-mediterrâneo, *Ceratitidis capitata* pertence à ordem Diptera, família *Tephritidae*. Ela é originária da África e sua introdução no continente Americano ocorreu pelo Brasil em 1901 (NUNEZ-BUENO, 1987). Este inseto encontra-se bastante distribuído pelo referido continente, infestando hospedeiros nativos e exóticos (MATIOLI, 1985), e configura-se como uma das mais importantes pestes que provoca perdas de economia agrícola do mundo, capaz de atacar mais de 300 espécies de frutas (LIQUIDO *et al.*, 1991). No Brasil, ataca o pêssego, citros, maçã, manga, entre outras, causando grandes perdas na produção dessas frutas comercialmente importantes (MALAVASI; ZUCCHI, 1999).

C. capitata juntamente com os bruquídeos, *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, foram as espécies eleitas para serem usadas como modelo no estudo das propriedades anti-insetos do látex de *Plumeria rubra* (FIGURA 3).

1.5 Estratégias de combate às pragas agrícolas

O manejo do controle de pragas de grãos armazenados envolve, principalmente, as boas condições de armazenamento e o uso de agentes químicos que trazem benefícios mínimos com custo elevado, na ordem de bilhões de dólares. Estima-se que mais de 10 milhões de dólares sejam gastos todos os anos para o controle químico dos danos causados pelos insetos (KRUSH, 1999), resultando em redução de apenas 7 % nas perdas causadas por estes nas culturas (OERKE *et al.*, 1994). Este tipo de controle vem gerando problemas ambientais graves, como a contaminação do solo e da água, a toxicidade sobre organismos não-alvo, o acúmulo em cadeias alimentares e problemas de saúde pública humana.

O uso de inseticidas é um dos métodos de controle mais empregado na atualidade. O controle químico pode ser aplicado de forma preventiva ou curativa. Esse tratamento tem sido eficaz no controle dos carunchos, porém, sua utilização é dificultada pelo custo dos produtos e problemas de toxicidade decorrentes da natureza química dos inseticidas, havendo também o problema de resistência dos insetos a esses agentes (LORINI, 2001).

Uma das alternativas ao uso de agrotóxico são os biopesticidas, que faz uso de predadores, parasitas e patógenos naturais de insetos-praga. Formulações baseadas na bactéria *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria gram-positiva que sintetiza cristais de proteínas inseticidas durante a esporulação, representa o bioinseticida mais vendido no mundo, sendo usado há mais de 50 anos no controle de insetos, principalmente lepdópteros (MUSSER; SHELTON, 2003; FERRE; VAN RIE, 2002).

Devido aos custos dos produtos químicos, pequenos agricultores têm utilizado várias práticas, como: mistura dos grãos de feijão com areia, cal, cinza de madeira, terra de formigueiro, pimenta-do-reino ou óleos (GUTIERREZ; SCHOONHOVEN, 1981; DON-PEDRO, 1989). O efeito repelente do óleo de sementes de Nim (*Azadirachta indica*) sobre *Z. subfasciatus* foi mostrado por OLIVEIRA e VENDRAMIM (1999). HALL e HARMAN (1991) constataram que o tratamento de sementes de *Phaseolus vulgaris* com óleo de soja (*Glycine max*) resultou na redução da ovoposição e da emergência de adultos de *Z. subfasciatus*.

A transferência gênica constitui outro método alternativo ao uso de agrotóxico para o controle de pragas e doenças, com vantagem adicional em termos de custos, bem-estar ambiental e da saúde humana. Com os avanços biotecnológicos, genes de diferentes origens e que conferem resistência a insetos podem ser introduzidos em plantas de interesse econômico para reduzir sua susceptibilidade. Proteínas com atividade inseticida apresentam grande potencial para serem utilizadas em programa de melhoramento genético de plantas. Estas proteínas, quando ingeridas pelos predadores, podem agir diretamente sobre o sistema digestivo dos insetos, interferindo no processo de absorção dos alimentos e retardando conseqüentemente o seu desenvolvimento.

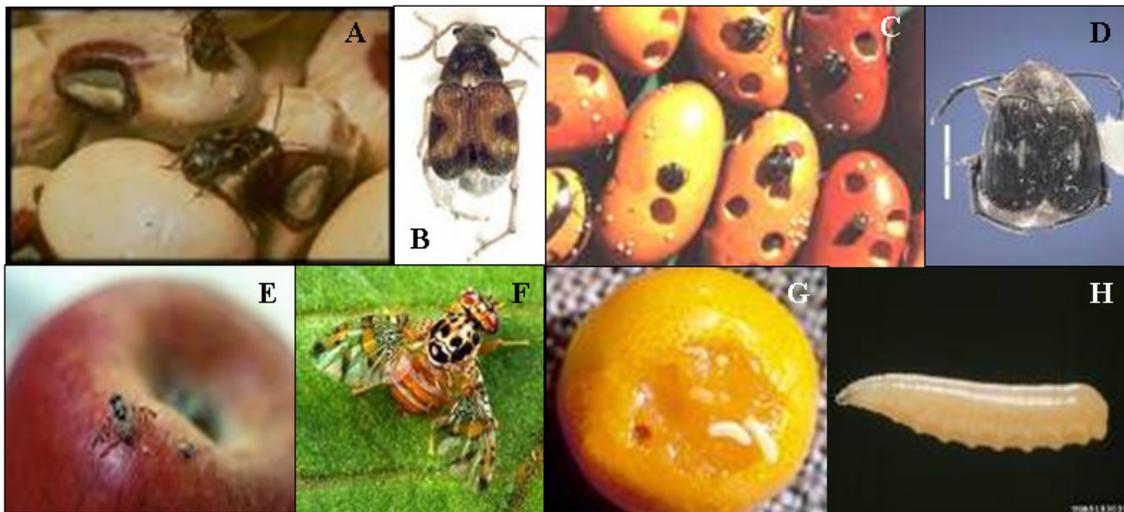


Figura 3 - Aspectos da infestação (A, C e E) e detalhe (B, D e F) de *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus* e *Ceratitits capitata*, em grãos de feijão e frutas, respectivamente. G - Fruta infestada pelas larvas de *C. capitata*. H - Detalhe da larva de *C. capitata* (PADIL, 2009).

II – OBJETIVOS

Esse trabalho tem como objetivo caracterizar o látex de *Plumeria rubra* quanto aos seus aspectos bioquímicos, fisiológicos e biológicos, e avaliar uma possível ação desse fluido e de suas proteínas contra importantes pragas agrícolas, dando ênfase à detecção de componentes bioquímicos que apresentem correlação com um possível papel de defesa na planta. Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram traçados:

- Determinar o perfil protéico do látex utilizando análises eletroforéticas, espectrométricas e cromatográficas;
- Caracterizar o látex quanto às atividades enzimáticas do tipo antioxidantes e proteolíticas;
- Avaliar a ação contra os insetos *Callosobruchus maculatus*, *Zabrotes subfasciatus* e *Ceratitis capitata* através de ensaios biológicos de dieta artificial e de repelência da ovoposição.

III – JUSTIFICATIVA

O ataque de pragas é um dos principais fatores de perda de produção em áreas de agricultura. O uso de agrotóxicos químicos tem várias características negativas que vão desde problemas de contaminação ambiental, mortalidade de espécies não-alvo, resistência e surgimento de novas pragas, além do alto custo econômico para sua aquisição e aplicação.

Muitas alternativas ao uso de agrotóxicos químicos têm sido propostas. Dentre elas, a utilização de produtos naturais tem sido promissora. Dentro desse contexto, é crescente a pesquisa por proteínas vegetais que poderiam ser utilizadas como ferramenta biotecnológica para tal fim.

Com base no problema exposto, *Plumeria rubra* L. foi escolhida para o estudo de sua potencial ação contra pragas agrícolas por representar uma excelente fonte de látex, um fluido rico em proteínas, e por ser facilmente encontrada em uma considerável extensão geográfica da região Nordeste.

IV – MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

4.1 Reagentes

Azocaseína, N-Benzoil-arginina-naftilamida (BANA), Benzoil-arginina-nitroanilida (BApNA), Trans-epoxisuccinil-leucil-amido-3-metil-butano (E-64), Fenil-metil-sulfonil-fluor (PMSF), 4-(dimetilamino)-cinamaldeído (DMACA), *Coomassie Brilliant Blue* R-250 e R-350, Pepstatina, marcadores de massa molecular, Quitina coloidal, persulfato de amônio, membranas de diálise *cut off* 8 kDa foram obtidos de Sigma ou Sigma-Aldrich Co., USA. Acrilamida, Ácido tricloro-acético (TCA), *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT), Ditioneitol (DTT), Dodecil sulfato de sódio (SDS), Ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA), foram obtidos da Amersham Bioscience, USA. Azul de bromofenol, tiosulfato de sódio, carbonato de sódio foram obtidos da Acros Organics, USA. Albumina sérica bovina (BSA) Fração V foi obtida de INLAB, Brasil. Triton X-100 e Tween 20 foram obtidos da USB Corporation, Cleveland, OH USA.

Os demais reagentes, como ácidos, bases, soluções salinas e tampões foram preparados a partir de reagentes de grau analítico.

4.2 Material vegetal

O látex utilizado neste estudo foi coletado de espécimes de *Plumeria rubra* L. (Jasmim) cultivados no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal do Ceará ou de exemplares existentes em praças ou jardins residenciais na cidade de Fortaleza.

P. rubra L. foi identificada pelo Professor Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, onde uma exsiccata (N. 15018) desse material encontra-se depositada. Sua classificação taxonômica encontra-se detalhada na TABELA 1.

Tabela 1 - Classificação taxonômica de *Plumeria rubra*.

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Gentianales
Família	<i>Apocynaceae</i>
Gênero	<i>Plumeria</i>
Espécie	<i>Plumeria rubra</i> Linn.

Fonte: STEVENS, 2001.

4.3 Insetos

4.3.1 *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*

Os insetos da espécie *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) e *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) utilizados nesse trabalho, ambos pertencentes à Ordem Coleoptera e Família *Bruchidae*, foram obtidos de uma colônia mantida no Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC. Os bruquídeos têm sido mantidos em uma incubadora BOD a 27 ± 1 °C, umidade relativa de 65-75 % e fotoperíodo de 12 horas de luz, em sementes de feijão-de-corda obtidas no comércio local. As culturas são mensalmente renovadas através da adição de insetos recém-emergidos em sementes novas.

4.3.2 *Ceratitis capitata*

As larvas de *C. capitata* (Wiedeman, 1824), pertencentes à Ordem Diptera e Família *Tephritidae*, foram obtidas através de insetos mantidos no Laboratório de Mosca-das-Frutas do Departamento de Biologia Celular e Genética da UFRN, gentilmente fornecidas pelo Dr. Maurício Pereira Sales, do Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas do Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências, da mesma Universidade, local onde foram realizados os bioensaios.

MÉTODOS

4.4 Caracterização bioquímica

4.4.1 Coleta e fracionamento do látex

Coletas em campo foram realizadas semanalmente, durante todo o ano e sempre no período da manhã, e preferencialmente antes das nove horas, pois foi observado que, à medida que se aproxima do pico solar, a liberação de látex pela planta é diminuída. O látex foi extraído da planta através da quebra do ápice caulinar. O fluido exsudado foi coletado em tubos do tipo Falcon contendo água destilada, na proporção de 1:2 (v/v). Este procedimento

foi normalmente adotado porque o látex sofre um processo natural de coagulação, adquirindo uma característica colante. A coleta do látex em água tem a finalidade de diminuir este efeito e evitar a formação de flocos de borracha, os quais podem aprisionar substâncias solúveis.

É importante ressaltar que a coleta não causa danos irreversíveis à planta. Os ápices caulinares se regeneram e a planta retoma o seu desenvolvimento normal.

No laboratório, a amostra foi submetida à centrifugação a 5000 x g por 10 min, a 4°C. Este procedimento inicial propiciou a precipitação parcial da parte insolúvel do látex, borracha. Essa fração foi denominada de BL (Borracha do Látex), a qual foi separada. O sobrenadante foi dialisado por 1 hora contra o mesmo volume de água destilada, ou seja, respeitando a relação de 1:1 (v/v). Ao término desse período a fração dialisável (dialisato) foi liofilizada e o saco de diálise com o sobrenadante foi transferido para outro recipiente, onde foi dialisado exaustivamente contra água destilada por 72 horas, a 4°C. O material resultante foi novamente centrifugado e o sobrenadante obtido, contendo a fração protéica do látex, foi liofilizado.

Nas diálises foram utilizadas membranas com capacidade para retenção de moléculas com massa molecular superior a 8 kDa. Dessa maneira, o dialisato era então, constituído de moléculas menores que 8 kDa, provavelmente íons, metabólitos secundários e/ou peptídeos. Esta fração foi denominada de DL (Dialisato do Látex). O sobrenadante final liofilizado resultou em uma fração livre de borracha e rica em proteínas solúveis, e foi por isso denominada de Proteínas do Látex de *Plumeria rubra* - PLPr (FIGURA 4).

4.4.2 Rendimento

A partir do fracionamento do látex, suas frações foram liofilizadas e pesadas. Uma estimativa do rendimento destas foi estabelecida a partir de cinco amostras coletadas separadamente. Cada amostra foi constituída de 5 mL de látex coletados em um tubo contendo 5 mL de água destilada. As cinco amostras independentes foram avaliadas seguindo exatamente o mesmo procedimento para cada uma, seguindo o protocolo descrito no item anterior. A partir da fração protéica (PLPr) o teor de proteínas solúveis de cada amostra foi estimado utilizando o método de BRADFORD (1976).

Coleta do látex em água (1:2; v/v)

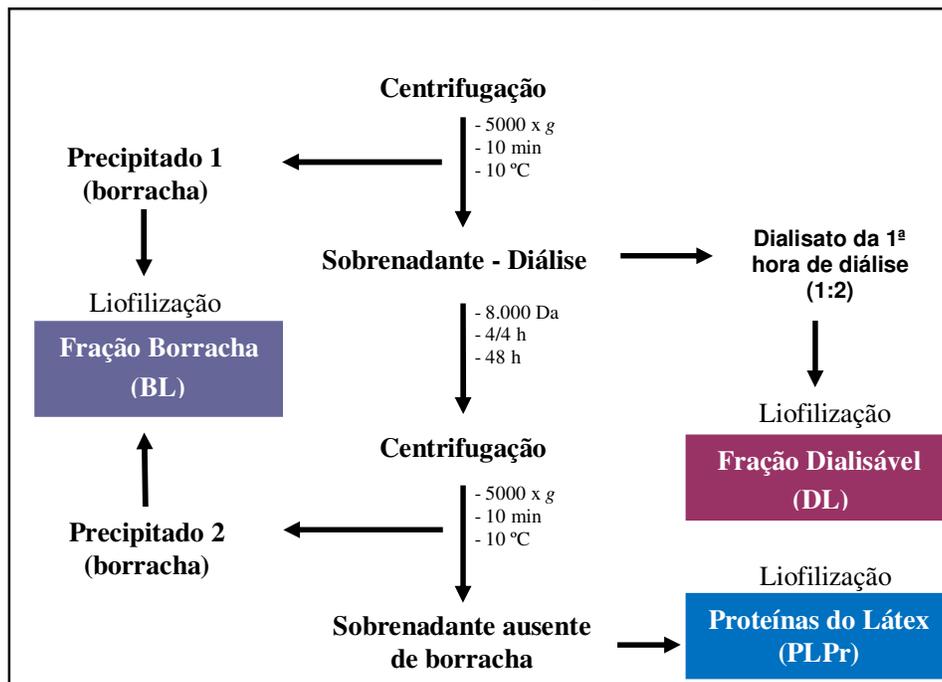


Figura 4 - Esquema geral do fracionamento do látex de *P. rubra*. Esse procedimento resultou em três frações distintas: fração borracha (BL), insolúvel em água; fração dialisável (DL), solúvel em água e constituída por moléculas de baixa massa molecular; e fração protéica (PLPr), constituída pelas proteínas solúveis do látex.

4.4.3 Dosagem de proteínas

A quantidade de proteínas solúveis da fração PLPr foi estimada pelo método colorimétrico descrito por BRADFORD (1976). Para tanto, foi preparada uma solução de 1 mg/mL da amostra, de onde foram retiradas alíquotas de 100 µL e adicionadas a 2,5 mL do reagente de Bradford. As soluções foram levemente agitadas e após 10 minutos procedeu-se a leitura das absorbâncias a 595 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. A quantidade de proteína foi estimada utilizando-se Albumina Sérica Bovina como referência padrão na curva de calibração.

4.4.4 Ensaio de Hemaglutinação

O ensaio de hemaglutinação foi realizado com o intuito de verificar a presença de lectinas no látex de *P. rubra*. A atividade hemaglutinante da fração PLPr foi ensaiada, em temperatura ambiente (25 °C), utilizando placas de micro titulação, nas quais foram feitas diluições seriadas similar ao descrito por MOREIRA e PERRONE (1977).

Inicialmente, 25 µL de tampão Tris - HCl 100 mM pH 7,6 contendo NaCl 150 mM foram adicionados, a partir da segunda fileira, em todos os poços da placa. Em seguida, o mesmo volume de amostra, na concentração de 2 mg/mL, foi acrescentado na segunda fileira e misturado cuidadosamente por pipetagem. Uma alíquota de 25 µL dessa solução foi transferida da segunda para a terceira fileira, foi novamente misturado e o passo de dupla diluição foi repetido até a 11^a fileira; nesta, os 25 µL em excesso foram descartados. A primeira fileira continha 25 µL da solução não diluída.

Em todos os poços foram adicionados 25 µL de uma suspensão de eritrócitos de coelho 2 % em solução salina (NaCl 150 mM), previamente preparada. Posteriormente, as placas foram deixadas em repouso por 3 horas, à temperatura ambiente, e a presença dos aglutinados foi observada visualmente.

Foram utilizados eritrócitos de coelhos adultos e sadios mantidos no Biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

4.4.5 Cromatografia de afinidade em coluna de quitina

Considerando que, a membrana peritrófica dos insetos é formada principalmente por quitina e que a degradação deste polissacarídeo pode afetar o desenvolvimento dos insetos, objetivou-se testar a afinidade de proteínas do látex (PLPr) a uma matriz de quitina.

Para a realização deste ensaio uma coluna cromatográfica (4 x 1,5cm) de afinidade à quitina foi montada e equilibrada com uma solução de NaCl 0,15M. Nesta coluna foram aplicados 5 mL de proteínas do látex ressuspensas em solução salina, obtendo-se uma concentração de 2,5 mg/mL. O pico não retido foi eluído na própria solução de equilíbrio. As proteínas retidas foram eluídas primeiramente com ácido acético 1M e posteriormente com ácido clorídrico 0,1 M. O fluxo da coluna foi ajustado para 0,5 mL/min e foram coletadas frações de 1 mL. Os picos protéicos foram detectados através da leitura espectrofotométrica a 280 nm.

4.4.6 Cromatografia de exclusão molecular (Sephacryl S-100)

Com o intuito de fracionar as proteínas do látex de *P. rubra*, amostras da fração PLPr, 35 mg dissolvidos em 3 mL de água destilada (11,6 mg/mL) foram submetidas a filtração em gel em uma coluna de Sephacryl S-100 (104 x 2 cm), que foi previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,9. As amostras foram previamente separadas de material insolúvel através de centrifugações a 20.000 x g, 10 min, 4 °C, antes de serem submetidas às cromatografias. A eluição das proteínas foi feita com o mesmo tampão, sob um fluxo de 0,5 mL/min. As frações coletadas tinham um volume de 2,5 mL. O perfil protéico foi medido através de leituras espectrofotométricas a 280 nm.

4.4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

O perfil protéico da fração PLPr, assim como o das frações mais expressivas oriundas da cromatografia de exclusão molecular, foi analisado através de eletroforeses em gel de poliacrilamida contendo, ou não, o agente desnaturante Dodecil Sulfato de Sódio (SDS). O método utilizado foi o descrito por LAEMMLI (1970), com algumas adaptações.

Os géis em placa foram montados nas dimensões de 8 x 7,5 x 0,1 cm. O gel de aplicação continha 5 % de acrilamida e 10 % de SDS em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8. O

gel de separação, contendo 12,5% de acrilamida e 1% de SDS, foi montado em tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,8.

Amostras de 1 mg da fração PLPr foram dissolvidas em 1mL de tampão de amostra (Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo 2 % de SDS), sendo posteriormente submetidas à centrifugação a 6000 x g, por 10 min, a 4°C. Aos sobrenadantes obtidos foram adicionados 3 µL de azul de bromofenol 0,02 % e 20 mg de sacarose, preparando-se, assim, as amostras para a corrida eletroforética. Em seguida, foram aplicados de 10 a 25 µL da fração PLPr, ou 5 µL das frações obtidas da cromatografia, nos poços do gel de aplicação. Na eletroforese para peptídeos o gel de aplicação foi preparado na concentração de 16,5 % de acrilamida, nas mesmas condições descritas acima.

A corrida eletroforética foi realizada sob amperagem constante de 40 mA, voltagem inicial de 100 V, a 25 °C, usando-se como tampão de corrida Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3, contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1 %. A corrida ocorreu em 2,5 horas.

Eletroforeses nativas foram realizadas nas mesmas condições, porém sem a adição do agente desnaturante.

Após a corrida o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* R-250, preparado em uma solução de água, ácido acético e metanol, respeitando as proporções de 8:1:3,5 (v/v/v), por um período de 4 horas. Em seguida, descorados com a mesma solução na ausência do corante, permitindo assim a visualização das bandas protéicas.

4.4.8 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida

A fração protéica PLPr também foi caracterizada quanto ao seu perfil de proteínas por eletroforese bidimensional (2-DE).

Esta técnica é realizada pela execução de duas etapas distintas. A primeira, denominada Focalização Isoelétrica (IEF) consiste na migração de proteínas, submetidas à corrente elétrica, em uma matriz de gel que apresenta um gradiente de pH onde estas proteínas migram para seus respectivos pontos isoelétricos. Na segunda etapa, tiras contendo as proteínas foram tratadas com SDS, deitadas sobre géis de poliacrilamida montados em placas verticais e submetidos novamente a uma diferença de potencial. Nesta etapa as proteínas são separadas de acordo com suas massas moleculares.

Para a realização da primeira dimensão, tiras (13 cm de comprimento) de gel linear *Immobiline DryStrip*, adaptadas para conter um gradiente de pH que variou de 3-10 ou de 4-7

foram hidratadas com uma solução contendo as proteínas do látex. A solução de hidratação foi composta de: 8 M uréia; 2 M tiouréia; 2 % de Triton X-100; 0,5 % de tampão IpG apresentando anfólitos com os gradientes de pH supracitados; 2,8 % de DTT; 1 % de glicerol e traços de azul de bromofenol.

A fração PLPr (1 mg) foi dissolvida em 250 μ L de solução de hidratação. Essa alíquota foi depositada em um dos poços do suporte *Immobiline DryStrip Reswelling Tray* onde as tiras de *Immobiline DryStrip* foram gentilmente deitadas sobre a solução, de maneira que, o lado da tira que contém o gel ficasse voltado para baixo, em íntimo contato com a amostra, para que essa fosse incorporada ao gel. As tiras foram, então, cobertas com óleo *DryStrip Cover Fluid*, com o intuito de evitar o ressecamento das tiras e empurrar a amostra para a região da tira que contém o gel. As tiras foram deixadas rehidratando durante 16 horas à temperatura ambiente.

Após esse período foi realizada a focalização isoeétrica das proteínas. As tiras foram rapidamente imersas em água Milli-Q para retirada do excesso do *Cover Fluid*, posicionadas no aparelho focalizador *Multiphor II*, ligado a um sistema refrigerado, e as tiras foram submetidas às seguintes condições de corrida: 1 mA e 5 W a 200-100 V/h, 500-250 V/h, 1000-500 V/h, 2500-2500 V/h e 3500-14000 V/h, de forma não linear (em *steps*). A focalização foi realizada a uma temperatura de 18°C.

Após a etapa de focalização, as tiras foram novamente submersas em água Milli-Q para retirada do excesso de *Cover Fluid* e em seguida tratadas durante 15 minutos em uma solução de Tris-HCl pH 8,8 contendo 2 % de SDS, 6 M de uréia, 30 % de glicerol (v/v) e 0,002 % de azul de bromofenol contendo DTT 0,1 %. Este tratamento preparou as tiras para a realização da segunda etapa eletroforética. Nesta, as tiras foram deitadas sobre géis de poliacrilamida a 12,5 % contendo SDS 0,1 % montado em sistema de placas verticais. O sistema foi selado com agarose 1,5 % contendo azul de bromofenol para facilitar a visualização da frente de migração. A corrida eletroforética foi desenvolvida a 180 V e 25 mA por placa e realizada à temperatura ambiente usando-se como tampão de corrida, Tris 0,025 M pH 8,3 contendo glicina 0,192 M e SDS 0,1 %. O tempo de corrida variou entre 6 e 7 horas.

Ao final do processo, os géis foram fixados durante 1 hora em etanol, ácido acético e água (4:1:5; v/v/v), sendo posteriormente corados com uma solução de *Coomassie Brilliant Blue R-350* 0,1 % em água, ácido acético e metanol (8:1:4; v/v/v) durante 4 horas e

descoloradas com a mesma solução na ausência do corante, permitindo assim a visualização dos *spots* protéicos.

4.4.9 Espectrometria de massas

Um espectro de massas da fração PLPr foi adquirido a partir de um aparelho Espectrômetro de Massas modelo MALDI-TOF (ABI 4700 Proteomics Analyzer - Applied Biosystems). A matriz era do tipo *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) com fonte de ionização do tipo *Electron Spray Ionization* (ESI), analisador tipo *Time of fly* (TOF) e detector do tipo *Multiplier*. Esta análise foi realizada na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e conduzida pelo especialista em espectrometria de massas responsável pela manipulação do aparelho.

4.5 Caracterização enzimática

Ensaio enzimáticos foram realizados com a fração PLPr com o objetivo de caracterizar a presença de enzimas relacionadas à defesa e ao metabolismo oxidativo de plantas. Para tanto foram realizados ensaios *in vitro* para determinar a presença de atividades para as enzimas peroxidase, catalase, superóxido dismutase, bem como, para enzimas proteolíticas. Zimogramas para detecção qualitativa destas enzimas foram realizados em paralelo.

4.5.1 Detecção quantitativa de enzimas antioxidantes

4.5.1.1 Peroxidase

A determinação da atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) na fração PLPr foi investigada através do método espectrofotométrico descrito por NAKANO e ASADA (1981), no qual a enzima APX catalisa a reação em que o H₂O₂ é degradado. Foram dissolvidos 50 mg da fração protéica do látex de *P. rubra* liofilizado em 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, contendo EDTA 0,1 mM, pH 7,0. Em seguida a mistura foi centrifugada em centrífuga de eppendorf modelo 5417 R (Biopharma, New York, USA), na velocidade de 10.000 x g, durante 10 minutos, a 4 °C. A solução reacional foi preparada em

tubos de ensaio com 1.350 μL de tampão fosfato 50 mM, contendo EDTA 0,25 mM, pH 6,0. Foram adicionados 50 μL das alíquotas do sobrenadante obtido após a centrifugação, 50 μL da solução de peróxido de hidrogênio 30 mM e 50 μL de ácido ascórbico 15 mM. As amostras foram mantidas em banho-maria à temperatura de 30 °C durante todo o experimento. A leitura das absorbâncias foi medida a 290 nm e os valores foram utilizados para determinar a atividade enzimática da APX.

4.5.1.2 Catalase

A determinação da atividade da enzima catalase (CAT) na fração PLPr foi investigada através do método descrito por BEERS e SIZER (1952), fundamentada na capacidade da enzima CAT catalisar a reação de degradação do H_2O_2 em água e oxigênio gasoso. Para tanto, foram dissolvidos 50 mg da fração protéica liofilizada em 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, contendo EDTA 0,1 mM, pH 7,0 e centrifugados na centrífuga de eppendorf descrita anteriormente, na velocidade 10.000 x g, 10 min, 4°C. A solução reacional foi preparada em tubos de ensaio com 1.290 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM, com EDTA 0,1 mM e pH 7,0, adicionados de 50 μL das alíquotas do sobrenadante obtido após a centrifugação e 60 μL de solução de peróxido de hidrogênio 500 mM. As amostras foram mantidas em banho-maria à temperatura de 30 °C durante todo o experimento. A leitura das absorbâncias da mistura reacional foi medida a 240 nm e os valores obtidos utilizados para determinar a atividade enzimática da CAT.

4.5.1.3 Superóxido dismutase

A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na fração PLPr foi investigada através do método descrito por GIANNOPOLITIS e RIEIS (1977). A referida enzima é capaz de inibir a formação de Formazana (cor azul), na reação em que o radical superóxido, formado a partir da redução da riboflavina e responsável pela liberação de elétrons para o oxigênio, é reduzido a peróxido de hidrogênio. Assim, foram dissolvidos 50 mg da fração protéica do látex liofilizado em 5 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM, contendo EDTA 0,1 mM, pH 7,0, e centrifugados na centrífuga de eppendorf, velocidade 10.000 x g, 10 min, 4 °C. A solução reacional foi preparada em tubos de ensaio com 1.000 μL de tampão fosfato 50 mM, com EDTA 0,1 mM e metionina 19,5 mM, pH 7,8. Foram

adicionados 50 µL das alíquotas do sobrenadante obtido após a centrifugação e, na ausência de luz, foram adicionados a cada eppendorf 150 µL de solução de NBT 750 mM e 300 µL de riboflavina 10 µM. As amostras foram transferidas para uma caixa iluminada por uma lâmpada fluorescente de 20 W, durante 15 minutos. A leitura das foi feita a 560 m, se resguardando da luminosidade, e os valores obtidos utilizados para determinar a atividade enzimática da SOD.

4.5.2 Zimograma para detecção de atividade peroxidásica

Peroxidases foram também detectadas através de zimograma, seguindo a técnica descrita por JOHRI e colaboradores (2005). Amostras da fração PLPr foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %), na presença ou ausência de SDS. Os géis foram imersos em 100 mL de tampão fosfato pH 7,0 contendo 0,03 % de H₂O₂, 0,2 % de guaiacol e 0,03 % de 3-amino-etil-carbazole. Peroxidases foram observadas como zonas escuras do gel.

4.5.3 Zimograma para detecção de atividade quitinásica

A atividade quitinolítica foi também detectada em gel. As amostras de PLPr foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) contendo 0,04 % de glicol-quitina a 8 ° C. Depois da eletroforese os géis foram imersos em Triton X-100 a 2,5 % e levemente agitados por 30 minutos para eliminar o SDS. Depois desta etapa, os géis foram incubados a 37 °C por 24 horas em tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Os géis foram então incubados em *calcoflur* MR 28 0,01 % a 37 °C por 1 hora. Quitinases foram observadas como zonas claras, através da iluminação dos géis em trans-iluminação UV (UV ITF Labortechnik, Wasserburg, Germany).

4.5.4 Detecção e caracterização de enzimas proteolíticas

Foram determinadas as atividades proteolíticas da fração PLPr de *P. rubra* através de métodos colorimétricos utilizando Azocaseína, BANA e BApNA como substratos em valores de pH específicos. Estes ensaios foram realizados de acordo com a metodologia descrita por XAVIER-FILHO e CAMPOS (1989). Inicialmente foi determinada a melhor alíquota da

fração PLPr para ser usada nos ensaios enzimáticos. Para tanto, foram realizados ensaios proteolíticos preliminares testando as seguintes alíquotas: 100, 200 e 300 µL de uma solução da fração PLPr a 4 mg/mL. A alíquota da solução protéica utilizada nos ensaios subseqüentes foi 200 µL.

4.5.4.1 Atividade proteolítica total usando Azocaseína como substrato

Neste experimento foi determinada a atividade proteolítica total das proteínas do látex sobre a Azocaseína, um substrato inespecífico para proteases. A fração PLPr foi usada na concentração de 4 mg/mL, diluída em tampão fosfato de sódio (PBS) 50 mM pH 6,0. Em eppendorf, 200 µL da amostra foram juntados com 40 µL de DTT e 260 µL de tampão para se obter um volume total de 500 µL para iniciar a reação enzimática.

Os ensaios proteolíticos foram feitos na presença ou ausência de Ditiotreitól 3mM, o DTT, um ativador de proteases que age reduzindo as pontes dissulfeto nas moléculas protéicas. Este permaneceu em contato com a amostra por 10 minutos antes da adição dos outros reagentes. Seguidamente, 200 µL de Azocaseína 1% foram adicionados e esta solução foi incubada a 37 °C por uma hora. A reação foi parada com a adição de 500 µL de ácido tricloroacético (TCA) 20 %. As amostras foram, então, centrifugadas a 10.000 x g por 10 min e o sobrenadante separado foi alcalinizado com 500 µL de NaOH 2M.

Nos ensaios proteolíticos grupos controle foram feitos com os mesmos reagentes, porém, diferindo na ordem de adição da amostra, que só foi introduzida quando as reações foram paradas. Esse procedimento garante que não há reação bioquímica controle negativo. As leituras espectrofotométricas dos produtos da reação foram realizadas a 440 nm. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que incrementa a absorbância de 440 nm em 0,01. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.5.4.2 Atividade proteolítica do tipo cisteínica usando BANA como substrato

Com o intuito de confirmar a presença de atividade proteolítica do tipo cisteínica no látex de *P. rubra* foi realizado um ensaio utilizando como substrato N-benzoil-arginina-naftilamida (BANA), que é específico para este tipo de proteinase. A amostra foi utilizada nas mesmas condições descritas. Após a incubação com o DTT foram adicionados 200 µL de BANA 1 mM e as soluções foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. A reação foi parada com

a adição de 500 µL de uma solução de HCl 2% em etanol e 500 µL de 4-(dimetilamino)-cinamaldeído (DMACA) 0,06% em etanol. Após 40 minutos, os resultados colorimétricos foram mensurados por absorvância a 540 nm. Todos os ensaios ocorreram em triplicata.

4.5.4.3 Atividade proteolítica do tipo serínica usando BApNA como substrato

O Benzoil-arginina-p-nitroanilida (BApNA) é um substrato específico para proteinases do tipo serínica. Para detecção desta atividade na fração PLPr, a amostra foi utilizada na mesma concentração e condições descritas no item 4.2.4.1. Este ensaio foi realizado na ausência de DTT, dessa forma, o volume de tampão utilizado foi 300 µL, que foi somado a 200 µL da solução de amostra. Em seguida, foram adicionados 110 µL de uma solução de HCl 1,25 mM e, depois de incubados por 10 minutos a 37 °C, foi acrescentado o BApNA (1,25 mM). Após nova incubação de 37 °C por 10 min a reação foi parada pela adição de 120 µL de ácido acético a 30 %. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 405 nm. O ensaio foi realizado em triplicata e provas em branco foram feitas.

4.5.4.4 Inibição de proteinases utilizando Azocaseína e BANA como substrato

Para tentar elucidar a natureza do mecanismo de ação das atividades proteolíticas presentes na fração protéica do látex, um grupo de inibidores para os diferentes tipos de proteinases foi testado. Para tanto, antes de iniciar as reações com os substratos, alíquotas de 200 µL da fração PLPr (2 mg/mL em tampão PBS, 50 mM, pH 6,0) foram pré-incubadas por 30 min, a 25 °C, com 20 µL de cada um dos seguintes inibidores: PMSF 5 mM – inibidor de proteases serínicas; E-64 0,18 mM – inibidor de proteases cisteínicas; EDTA – inibidor de metaloproteinases; Pepstatina 10 mM – inibidor de proteases aspárticas e IAA 0,1 M – inibidor de proteases cisteínica. PMSF, E-64, EDTA e Pepstatina foram utilizados nos ensaios com Azocaseína; PMSF, E-64 e IAA foram usados nos ensaios com BANA. As atividades proteolíticas remanescentes foram, então, determinadas a 37 °C, pH 6,0.

4.5.4.5 Atividade proteolítica em diferentes faixas de pH

Para se estabelecer uma curva de atividade proteolítica da fração PLPr em função do pH, ensaios enzimáticos foram realizados conforme as metodologias descritas anteriormente,

usando os três substratos, Azocaseína, BANA e BApNA. Os valores de pH testados foram: 2,5; 4; 5; 6; 7; 8; 9 e 10, exceto para Azocaseína, que não dissolve em pH 2,5 e 4. As soluções-tampão utilizadas para pH cada foram: glicina 50 mM (pH 2.6); acetato de sódio 50 mM (pH 4.0 e 5.0); fosfato de sódio (PBS) 50 mM (pH 6.0 e 7.0) e Tris-HCl 50 mM (pH 8.0 e 10.0).

4.5.4.6 Atividade proteolítica em diferentes faixas de temperatura

Para avaliar a estabilidade das atividades proteolíticas em função do calor, as proteínas do látex de *P. rubra*, diluídas em tampão PBS, 50 mM, pH 6,0, foram incubadas sob diferentes temperaturas (37, 45, 60, 75 e 90 °C) por 15 e 30 min. Após o aquecimento as amostras foram submetidas à centrifugação (10.000 x g, 10 min) e as atividades proteolíticas dos sobrenadantes foram mensuradas seguindo as metodologias descritas anteriormente, usando azocaseína e BANA como substratos. A concentração usada de PLPr foi de 2 mg/mL.

4.5.5 Zimograma para detecção de atividade proteolítica

A fração PLPr também foi avaliada qualitativamente quanto à sua atividade proteolítica. Para tanto foi empregada a metodologia para a detecção da atividade proteolítica em gel de acordo com MACEDO *et al.* (2004). Os géis de aplicação e separação foram montados conforme descrito para eletroforese, sendo que este tinha gelatina 0,1%.

A preparação da amostra, a aplicação no gel e a corrida ocorreram nas mesmas condições da eletroforese, no entanto foi realizada a 8 °C a fim de se manter a integridade das proteínas. Após a corrida eletroforética, o gel foi incubado em uma solução de Triton X-100 2,5 % por duas vezes, sendo 20 minutos cada, a 25 °C. Posteriormente, o gel foi incubado em uma solução ativadora (tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 6,0, contendo DTT 2 mM) por 60 minutos a 37°C. Em seguida, foi corado com uma solução de *Coomassie Brilliant Blue R-250* e, posteriormente, descorado com a solução descorante.

4.6 Ensaios biológicos

4.6.1 Bioensaios com *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*

4.6.1.1 Ensaios de repelência

A atividade repelente aqui mencionada refere-se a uma ação inibitória da ovoposição dos insetos sobre feijões em ensaios de repelência de não-escolha, onde sementes cobertas com as soluções testadas são oferecidas aos insetos dentro de potes de plástico transparentes. O método experimental usado neste trabalho é original, porém, baseado parcialmente na metodologia de repelência de livre-escolha como descrita por SADEGHI e colaboradores (2006).

As atividades repelentes foram realizadas com o látex íntegro de *P. rubra*, sempre recém coletado em água destilada, obedecendo a relação de 1:1 (v/v), e com sua fração protéica (PLPr) e não protéica (FD). Os parâmetros observados a partir destes ensaios foram: inibição da ovoposição, taxa de sobrevivência e massa larval. Em ensaios de repelência da ovoposição, o tempo de ação e a dose-resposta foram medidos.

4.6.1.1.1 Atividade repelente do látex íntegro de *P. rubra*

Para avaliar o potencial inibitório do látex de *P. rubra* sobre a ovoposição de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, estes insetos foram expostos a sementes de feijão-de-corda tratadas com o látex. Para preparar as sementes, estas foram mergulhadas em diferentes preparações do látex e, depois de secas à temperatura ambiente, foram usadas nos experimentos.

Três preparações diferentes foram testadas: a primeira consistiu de sementes embebidas em uma solução de gelatina a 1 %; a segunda, de sementes embebidas no látex, e a terceira, continha sementes embebidas, seqüencialmente, na solução de gelatina e no látex, depois de passar por secagem. Dois tipos de controle foram usados: um constituído por sementes sem nenhum tipo de cobertura e o outro que consistiu das sementes com a cobertura de gelatina. A gelatina foi empregada como controle porque apresenta uma característica aderente, semelhante ao látex, o que ajudaria a adsorver as partículas do látex aos feijões.

Em cada preparação, as sementes foram mergulhadas nas respectivas soluções por 30 segundos (de cinco em cinco grãos) e foram transferidas para uma placa de Petri grande onde

foram expostas ao calor leve de um secador elétrico para secagem. O tempo de exposição ao secador foi de aproximadamente 30 minutos, a uma distância de 50 cm.

O ensaio biológico obedeceu a um delineamento experimental inteiramente casualizado, onde cada grupo foi testado em quatro repetições (quadruplicatas). Cada repetição foi composta de 10 sementes acondicionadas em potes plásticos transparentes de 6 cm diâmetro x 4.5 cm altura com tampas perfuradas (totalizando 40 por grupo), onde foram introduzidos cinco casais de insetos em cada.

Os insetos utilizados tinham a idade de 0 - 24 horas para *C. maculatus* e 24 - 48 horas para *Z. subfasciatus*. Os insetos ficaram em contato com as sementes por 24 horas e, decorrido este período, foram descartados e o número de ovos depositados sobre as sementes foi registrado. Em continuidade, deixou-se seguir o ciclo de vida a partir dos ovos depositados nas sementes até o 17º dia. Após esse período, as sementes foram abertas e as larvas ali desenvolvidas foram quantificadas e avaliadas quanto à sobrevivência e massa larval. Os resultados foram expressos como média \pm EPM do número de ovos depositados.

4.6.1.1.2 Dose-resposta da atividade repelente do látex

Ensaio para determinação da dose-resposta da atividade repelente do látex foram realizados conforme a metodologia descrita no item anterior.

Para esse ensaio, o látex bruto e recém coletado foi diluído em água destilada (10, 100 e 1000 vezes) e cada diluição foi utilizada para preparar as sementes-tratamento. O controle consistiu de sementes sem nenhum tipo de tratamento. O experimento foi realizado em quadruplicata e os resultados foram expressos como média \pm EPM do número de ovos depositados.

Deste ensaio em diante, somente a atividade inibitória da ovoposição - a repelência - foi analisada, não sendo mais necessário que o experimento seguisse até o 17º dia para a abertura das sementes e verificação do desenvolvimento larval.

4.6.1.1.3 Determinação do tempo de repelência do látex

Seguindo, em parte, a mesma metodologia dos ensaios de repelência descritos inicialmente, outros ensaios foram realizados com o propósito de verificar o tempo da repelência observada nos ensaios anteriores, ou seja, verificar por quanto tempo o látex seria capaz de proteger as sementes de feijão da ovoposição dos insetos.

Nesse caso, 320 sementes foram tratadas com látex, ao mesmo tempo, e distribuídas em potes plásticos, em grupos de 4 potes contendo 10 sementes cada (quadruplicatas), onde cada grupo representava um período de tempo testado. Os potes foram todos acondicionados em câmara de crescimento, a 27 ± 1 °C. As sementes tratadas com látex ficaram reservadas por até 30 dias, sendo que, dentro deste período, grupos experimentais foram oferecidos aos insetos para ovoposição, seguindo os diferentes períodos de armazenamento. Os intervalos de tempo testados foram: 0, 6, 12, 24, 48, 72, 360 (15 dias) e 720 horas (30 dias).

O primeiro grupo (t=0) foi testado logo após a coleta do látex. Com o passar de 6 horas de armazenamento, o segundo grupo (t=6) foi retirado da BOD para a adição de 5 casais de insetos, que ficaram em contato com as sementes por 24 horas, sendo posteriormente descartados. Em seguida, com 12 horas de armazenamento repetiu-se o mesmo procedimento, e assim sucessivamente para todos os tempos testados. O número de ovos postos foi contabilizado logo após o tempo de contato. Grupos controle contendo sementes sem tratamento foram ensaiados em paralelo para cada período de tempo testado, a fim de se estabelecer uma comparação.

4.6.1.1.4 Atividade repelente das frações do látex sobre a ovoposição

O mesmo procedimento detalhado no item 4.3.1.1.1 foi adotado para verificação da capacidade repelente das frações do látex: PLPr (proteínas do látex) e FD (água de diálise). Neste caso, a fração PLPr foi testada na concentração de 1 % e FD nas concentrações de 0,5; 1 e 2 %, sendo diluídas em água destilada. Os grupos controle consistiram de sementes sem nenhum tipo de tratamento e de sementes tratadas com gelatina 1 %. Os mesmos parâmetros testados foram analisados.

4.6.1.1.5 Atividade repelente do látex íntegro desprovido de compostos voláteis

A fim de verificar se compostos voláteis estariam envolvidos na ação repelente detectada no látex de *P. rubra*, uma nova metodologia foi desenvolvida. Em um becker de 100 mL o látex recém coletado (20 mL) foi submetido a uma leve e contínua agitação, com o uso de barra e agitador magnéticos, por diferentes períodos de tempo: 0, 12 e 36 horas. Ao final de cada período uma alíquota era retirada para preparar as sementes de feijão a serem expostas para os insetos, nas mesmas condições descritas anteriormente. O volume do látex sob agitação foi sempre monitorado e ajustado a fim de se evitar que uma possível evaporação

promovesse uma concentração das substâncias presentes no látex. Sementes sem nenhum tipo de tratamento foram usadas como controle. O tempo descrito como zero referiu-se ao látex sem ter passado por agitação. Todo o processo de agitação foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar, mantendo-se condições de esterilidade, com o intuito de evitar contaminações e minimizar os efeitos naturais de degradação do látex.

Esse processo de agitação foi adotado com o propósito de fazer com que compostos voláteis presentes no látex, responsáveis ou não pelo aroma característico, fossem liberados para o meio. Porém, sem a garantia de que todo o composto volátil presente fosse eliminado.

4.6.1.1.6 Atividade repelente com os insetos expostos diretamente ao látex

Nesse tipo de ensaio não foram utilizadas sementes cobertas com o látex. Os insetos foram expostos ao látex de acordo com uma nova metodologia desenvolvida no laboratório, onde estes foram encerrados em potes contendo diretamente o látex. Diferentes tempos de exposição foram testados, onde ao final de cada período, sementes normais (sem tratamento) foram adicionadas aos potes e a ovoposição dos insetos foi monitorada.

Visto que o ambiente ficava saturado pelo aroma do látex, esse experimento foi planejado com o intuito de verificar se os compostos voláteis seriam capazes de intervir na fecundidade das fêmeas ou na cópula dos insetos, interferindo assim, de alguma maneira, no comportamento da ovoposição dos carunchos e, conseqüentemente, na sua fisiologia.

Desse modo, a metodologia seguiu-se da seguinte maneira: 5 casais de insetos foram colocados em potes plásticos (6 cm diâmetro x 4.5 cm altura) sem a tampa perfurada onde, ao centro, continham pequenos recipientes (3,5 cm diâmetro x 1 cm altura) com 3 mL de látex puro, coletado sem água. Estes mini-recipientes foram cobertos com uma tela para evitar que os insetos caíssem dentro do látex, mas permitiam a passagem de vapores. Os períodos de exposição testados foram: 0, 6, 12 e 24 h. Após cada período, 10 sementes de feijão foram adicionadas em cada pote e deixadas por 24 h.

Decorridas as 24 horas de contato, o número de ovos postos sobre as sementes foi quantificado. Grupos controle, contendo água destilada ao invés de látex, foram realizados em paralelo, nas mesmas condições e períodos de tempo testados. O experimento foi realizado em duplicata e os resultados foram expressos como média \pm EPM do número de ovos depositados. Mortalidade ou mudanças comportamentais dos insetos foram também monitoradas durante todo o experimento.

4.6.1.2 Ensaio com dieta artificial

À parte dos ensaios de repelência, bioensaios utilizando um sistema de sementes artificiais também foi realizado. Esses ensaios visaram avaliar o desenvolvimento das larvas de *C. maculatus* em sementes artificiais enriquecidas com as frações do látex de *P. rubra*. A metodologia seguida foi descrita por MACEDO *et al.* (1993), com algumas modificações.

4.6.1.2.1 Preparo das sementes

Sementes comerciais de *Vigna unguiculata*, susceptíveis ao ataque dos insetos, foram destegumentadas, trituradas em moinho elétrico e, posteriormente, maceradas em gral e pistilo para a obtenção de uma farinha de fina granulação. As frações testadas foram, cuidadosa e exaustivamente, misturadas com a farinha do feijão de corda em diferentes concentrações.

As sementes artificiais foram preparadas em uma encapsuladora manual utilizando cápsulas gelatinosas (nº. 1). Cápsulas contendo somente farinha de *V. unguiculata* e outras contendo 0,8% de albumina séria bovina (BSA) foram utilizadas como controle. As sementes artificiais foram colocadas em contato com feijão de corda por um período de 24 horas antes de serem submetidas à ovoposição pelos insetos, a fim de ficarem com o odor característico do feijão, o que possibilita sua aceitação pelos insetos.

4.6.1.2.2 Avaliação do efeito das frações do látex no desenvolvimento de *C. maculatus*

O ensaio biológico utilizado para a avaliação da toxicidade das frações do látex sobre os insetos obedeceu a um delineamento experimental inteiramente casualizado, com 6 tratamentos (concentrações das proteínas e controles) em 4 repetições. Cada grupo experimental foi composto por 5 sementes artificiais (total de 20 sementes), acondicionadas em potes plásticos com tampa perfurada. Insetos não sexados com 1-3 dias de idade foram introduzidos em cada pote em quantidade aleatória, mas suficiente para atingir o número necessário de ovos em um período de 24 horas. Decorrido este período, os insetos foram descartados e o número de ovos ajustado para 5 por semente. Após 17 dias, as sementes foram abertas para avaliação da sobrevivência e do peso larval.

Esse ensaio foi realizado com a fração protéica (PLPr) *in natura* e desnaturada, com a fração dialisável (DL) e com o pico I (mais abundante) oriundo da cromatografia de exclusão

molecular. As concentrações 0,1; 0,2; 0,4 e 0,8 % foram as utilizadas com PLPr *in natura* e DL, já com PLPr desnaturada e com o pico I a concentração utilizada foi 0,4 %.

Para obtenção da fração PLPr desnaturada, 60 mg da amostra foi dissolvida em 20 mL de água destilada. As proteínas em solução foram submetidas à fervura (100 °C) durante 30 minutos e, em seguida, centrifugadas a 5.000 x g durante 10 min. O sobrenadante foi liofilizado e utilizado no ensaio, sendo denominado de PLPr_A.

4.6.1.3 Avaliação da digestibilidade *in vitro* da fração PLPr frente às enzimas intestinais de *C. maculatus*

Larvas de *C. maculatus* com 17 dias de vida tiveram seus intestinos extraídos com auxílio de pinças e lupa estereoscópica. Duzentos intestinos foram removidos e homogeneizados em 200 µL de solução salina 0,15 M. O conteúdo intestinal foi extraído em 0,8 mL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,5, em banho de gelo, por 10 minutos. Os homogenatos foram centrifugados a 12000 x g por 20 minutos a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi recolhido e denominado homogenato intestinal.

Para o ensaio de digestibilidade, 80 mg da fração PLPr foram dissolvidos em 240 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM pH 5,5 e incubados em banho-maria a 37 °C por 0, 2, 8, 12, 24, 48 e 72 horas. A relação proteínas do látex/intestino foi de 1:6 para todos os ensaios. Os resultados dos ensaios de digestibilidade das proteínas do látex foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% contendo SDS.

4.6.2 Bioensaio com *Ceratitis capitata*

4.6.2.1 Manutenção e Cultura

Para manutenção das culturas, insetos adultos foram mantidos em gaiolas de armação de metal (20x20x25 cm) revestidas com tecido *voal*, contendo uma abertura lateral para introdução dos indivíduos e manuseio. Diariamente, colocava-se água e solução de sacarose e a cada dois dias introduzia-se uma dieta artificial contendo 10,4 % de fibra de cana-de-açúcar em pó, 6,5 % de farinha de trigo, 15 % de açúcar cristal, 9,9 % de fermento a base de levedura, 0,3 % de benzoato de sódio, 0,9 % de HCl e 57 % de água. As gaiolas foram mantidas em temperatura variável de 25-30°C, recebendo iluminação durante 10 horas diárias para estimular a ovoposição das fêmeas. Estas colocavam os ovos diretamente no tecido

poroso que revestia a gaiola, posicionada sobre uma bandeja com água, de onde estes foram coletados e colocados em placas de Petri com a mesma dieta oferecida aos adultos. As larvas foram mantidas em estufa, na ausência de luz, com temperatura aproximada de 25°C e umidade relativa de 70-80 %, conseguida com a utilização de quatro placas de Petri com água. No terceiro instar larval, as placas foram colocadas em caixas de acrílico (11x11x3 cm) contendo areia esterilizada, na qual permaneceram até se tornarem pupa e posterior emergência dos adultos.

4.6.2.2 Avaliação do efeito da fração PLPr no desenvolvimento de larvas de *C. capitata*

Para examinar os efeitos da fração PLPr no desenvolvimento de *C. capitata*, larvas neonatas foram alimentadas com dieta artificial contendo a fração nas concentrações 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 % (m/m). A dieta artificial foi distribuída em tubos de ensaio, 500 mg em cada. Cinco larvas foram adicionadas em cada tubo para alimentarem-se da dieta. O bioensaio foi mantido a 28 ± 2 °C e umidade relativa de 70-80%, em câmara de crescimento. Depois de 5 dias, os tubos foram abertos e a massa e número de larvas foram determinados. A porcentagem de decréscimo da massa e a mortalidade foram calculadas em relação ao controle. O experimento foi realizado em quadruplicata, onde foi calculada a média \pm desvio padrão. A dieta controle foi preparada sem a fração PLPr do látex.

4.6.3 Análise estatística

Os dados obtidos nos experimentos de repelência foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as suas médias foram comparadas pelos testes de Dunnet ou de Bonferroni, de acordo com a necessidade, onde valores de p inferiores a 0,05 foram considerados significantes. Para estas análises foi lançado mão do programa estatístico *GraphPad Prism Software* versão 4.0 (San Diego, CA). Os demais dados foram analisados de forma mais simplificada utilizando as ferramentas do *Software Excel* versão 2007.

V - RESULTADOS

5.1. Caracterização bioquímica

O processo de fracionamento do látex de *Plumeria rubra* foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido no laboratório para outras plantas laticíferas, como *Calotropis procera*, e resultou na obtenção de três frações distintas, sendo uma fração insolúvel em água, rica em polímeros de isopreno (borracha) e duas solúveis: as frações PLPr (Proteínas do Látex) e DL (fração Dialisável do Látex). A fração PLPr é composta por moléculas que ficaram retidas no interior da membrana de diálise e foi caracterizada pelo alto teor de proteínas. A fração DL reuniu as moléculas de baixa massa molecular (menores que 8 kDa) que não ficaram retidas no interior da membrana de diálise, sendo composta, possivelmente, por íons, partículas e/ou metabólitos secundários.

Quando foram avaliadas as proporções de cada fração em uma amostra de 5 mL de látex (sem adição de água) constatou-se que o conteúdo de borracha correspondeu a cerca de 70 % da massa seca, enquanto que, aproximadamente, 15 % são proteínas e os 15 % restantes, metabólitos de baixa massa molecular (comprovado posteriormente por eletroforeses). O teor de proteínas solúveis do látex, determinado pelo método colorimétrico de Bradford, foi em média 0,33 mg/mL (TABELA 2).

O ensaio de atividade hemaglutinante, realizado para detectar a presença de lectinas clássicas na fração PLPr do látex de *P. rubra*, revelou que esta fração não teve a capacidade de aglutinar eritrócitos de coelho em nenhuma diluição avaliada indicando, assim, a ausência de lectinas, quando desafiadas com esse tipo de eritrócitos.

Uma vez que, a luz do trato digestório dos insetos é revestida por uma estrutura quitinosa acelular, que protege o epitélio intestinal dos mesmos da abrasividade dos alimentos, denominada de membrana peritrófica, um dos objetivos desse trabalho foi verificar a presença de proteínas que têm a capacidade de se ligar à quitina no látex de *P. rubra*. Para tanto foi realizada uma cromatografia de afinidade de quitina. Como resultado obteve-se que a maior parte das proteínas submetidas à cromatografia não interagiram com a coluna de

quitina, somente uma pequena fração dessas proteínas apresentaram afinidade por esse polímero (FIGURA 5).

Seguindo com a etapa de caracterização bioquímica do látex de *P. rubra*, a fração PLPr foi submetida a cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-100. A filtração em gel foi bem eficiente no fracionamento das proteínas. Pelo menos três picos distintos puderam ser observados, havendo uma separação regular das proteínas ao longo das frações coletadas. O perfil eletroforético dos subprodutos da filtração em gel foi analisado em função do perfil cromatográfico obtido. Assim, determinadas frações recuperadas a partir da cromatografia foram selecionadas e liofilizadas para posterior utilização na SDS-PAGE.

Na FIGURA 6, a correlação feita entre as proteínas visualizadas na eletroforese e as frações cromatográficas mostra que o primeiro pico compreende as proteínas observadas nas raias 44-46, enquanto que o segundo pico refere-se a uma suave banda protéica observada na raia 66. As frações 55 e 57 encerram um perfil protéico distinto daquele observado nas raias anteriores, com bandas bem evidentes de massas moleculares aproximadas de 22 e 35 kDa que, interessantemente, não se destacaram na forma de pico. Não foi observada nenhuma banda protéica relacionada ao terceiro pico, que foi bastante evidente. Isso não foi surpreendente visto que este último pico possivelmente deve ser composto de moléculas de origem não protéica que são responsáveis pela coloração amarelada (pigmentos) que foi observada na solução inicial da fração PLPr.

Eletroforese unidimensional revelou que a fração PLPr exibe uma grande quantidade de proteínas com massas moleculares relativas variando de 15 e 58 kDa, com uma banda bastante evidente de massa em torno de 26 kDa. Não foram detectadas proteínas, nem peptídeos, na fração FD do látex (FIGURA 7).

O perfil eletroforético bidimensional (2-DE) da fração PLPr apresentou uma concentração bastante evidente de proteínas ácidas com massas moleculares em torno de 26 kDa, focalizadas principalmente entre os valores de pH 4,5 a 6,0. Um total de 118 *spots* protéicos com massas moleculares variando entre 117,4 e 12,2 kDa foram detectadas no gel (FIGURA 8).

Estes dados foram posteriormente checados por espectrometria de massas, confirmando as massas moleculares observadas por eletroforeses. As proteínas com massa molecular em torno de 26 kDa vistas na 2-DE diferiram em seu ponto isoelétrico (pI), mas foram detectadas na espectrometria de massas como um único pico, correspondendo ao valor 26392.337, como pode ser visto na FIGURA 9.

Tabela 2 - Rendimento do fracionamento do látex de *Plumeria rubra* e estimativa do teor de proteínas na fração PLPr.

Amostras ^a	Massa seca da fração FB		Massa seca da fração DL		Massa seca da fração PLPr		Total de massa protéica (mg/mL)	Proteínas solúveis em PLPr (mg/mL) ^b
	mg	%	mg	%	mg	%		
1	374,4	68,4	88,1	16,1	85,0	15,5	17,0	0,45
2	261,0	61,6	82,5	19,5	80,0	18,9	16,0	0,42
3	325,0	69,3	79,0	16,8	65,0	13,9	13,0	0,30
4	271,5	74,3	52,8	14,4	41,0	11,2	8,2	0,18
5	317,9	69,2	76,5	16,6	65,0	14,1	13,0	0,33
Média	309,9	68,6	75,8	16,7	67,2	14,7	13,4	0,33
DP	± 45,6	± 4,5	± 13,6	± 1,8	± 17,2	± 2,8	± 3,4	± 0,10

DP = Desvio Padrão

^a Cinco amostras independentes de 5 ml do látex foram fracionadas de forma a se obter três frações distintas que foram liofilizadas, pesadas e seu conteúdo protéico foi determinado.

^b O teor de proteínas solúveis foi estimado por Bradford, usando 10 mg mL⁻¹ da solução de PLPr.

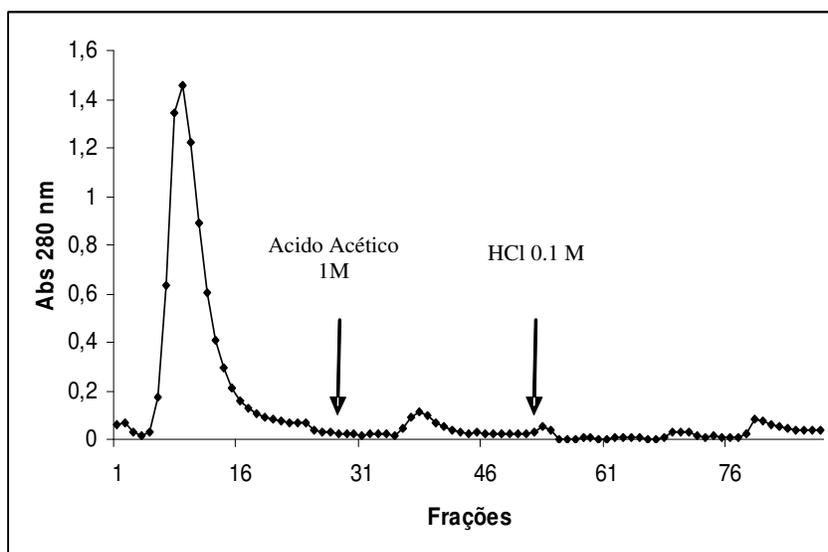


Figura 5 - Perfil cromatográfico da fração PLPr de *P. rubra* em coluna de quitina. A coluna de quitina (6 mL) foi equilibrada com NaCl 0,15 M. As proteínas retidas foram eluídas com ácido acético 1 M e Ácido clorídrico 0,1 M, respectivamente. O fluxo foi de 0,5 mL/min e as frações coletadas continham 1 mL.

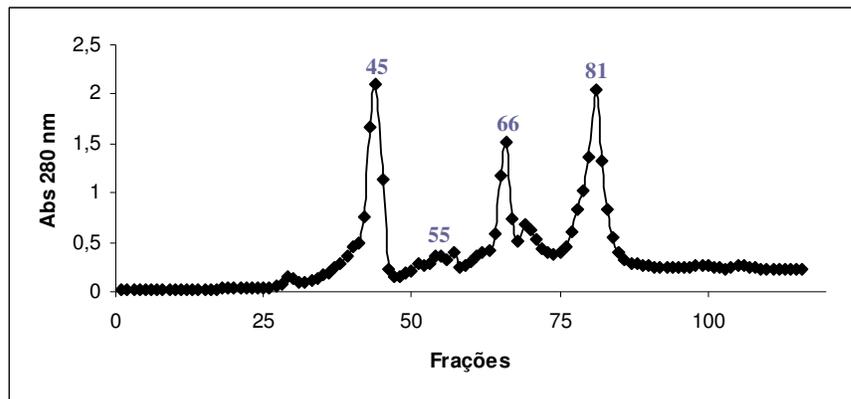
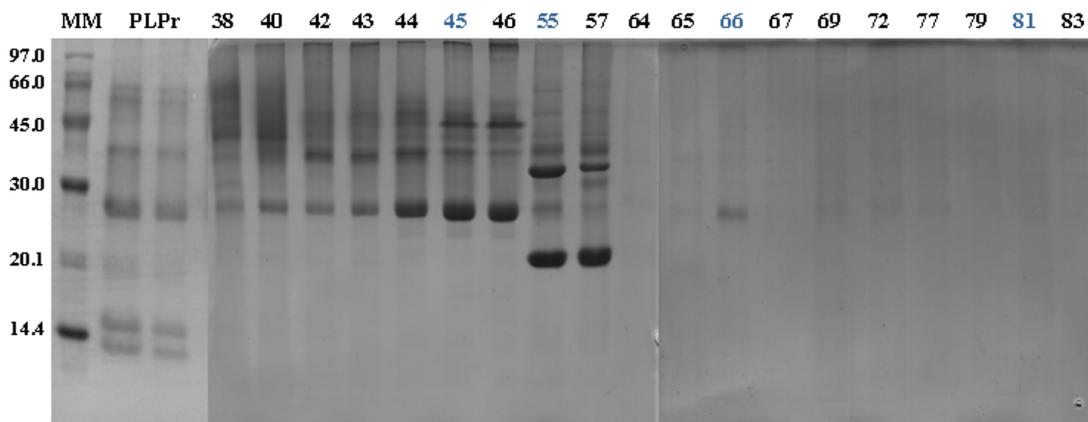
A**B**

Figura 6 - Perfil cromatográfico (A) e eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5 % (B) das sub-frações seqüenciais de PLPr recuperadas durante a cromatografia de filtração em gel Sephacryl S-100. As proteínas laticíferas (11,6 mg/mL) foram eluídas com tampão bicarbonato de amônio 25 mM, pH 7,9. O fluxo foi de 0,5 mL/min e as frações coletadas continham 2,5 mL. Os números sobrescritos sobre o perfil cromatográfico em A correspondem às raias eletroforéticas, em B os picos obtidos estão destacados em azul.

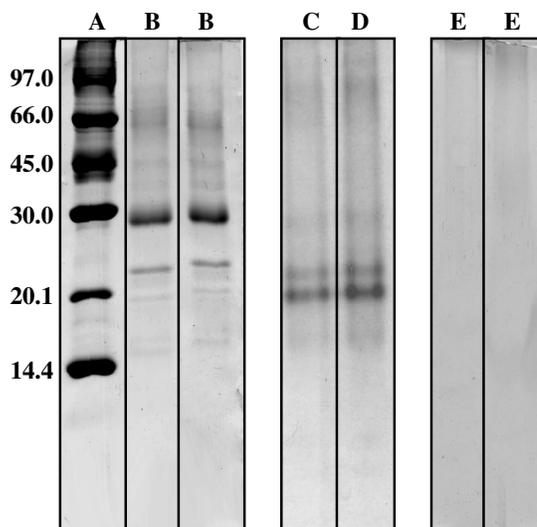


Figura 7 - Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5 % da fração protéica do látex de *Plumeria rubra* na presença (B) ou ausência de SDS (C e D). E - eletroforese para peptídeos (16,5 %) da fração DL do látex. Foram aplicados 10 μ L (1mg/mL) em B, 20 e 25 μ L (1mg/mL) em C e D, respectivamente, e 30 μ L (10mg/mL) em E. A - marcadores de massa molecular: Fosforilase B (97,0 kDa), Albumina Sérica Bovina (66,0 kDa), Ovalbumina (45,0 kDa), Anidrase Carbônica (30,0 kDa), Inibidor de Tripsina (20,1 kDa), Alfa-Lactalbumina (14,4 kDa).

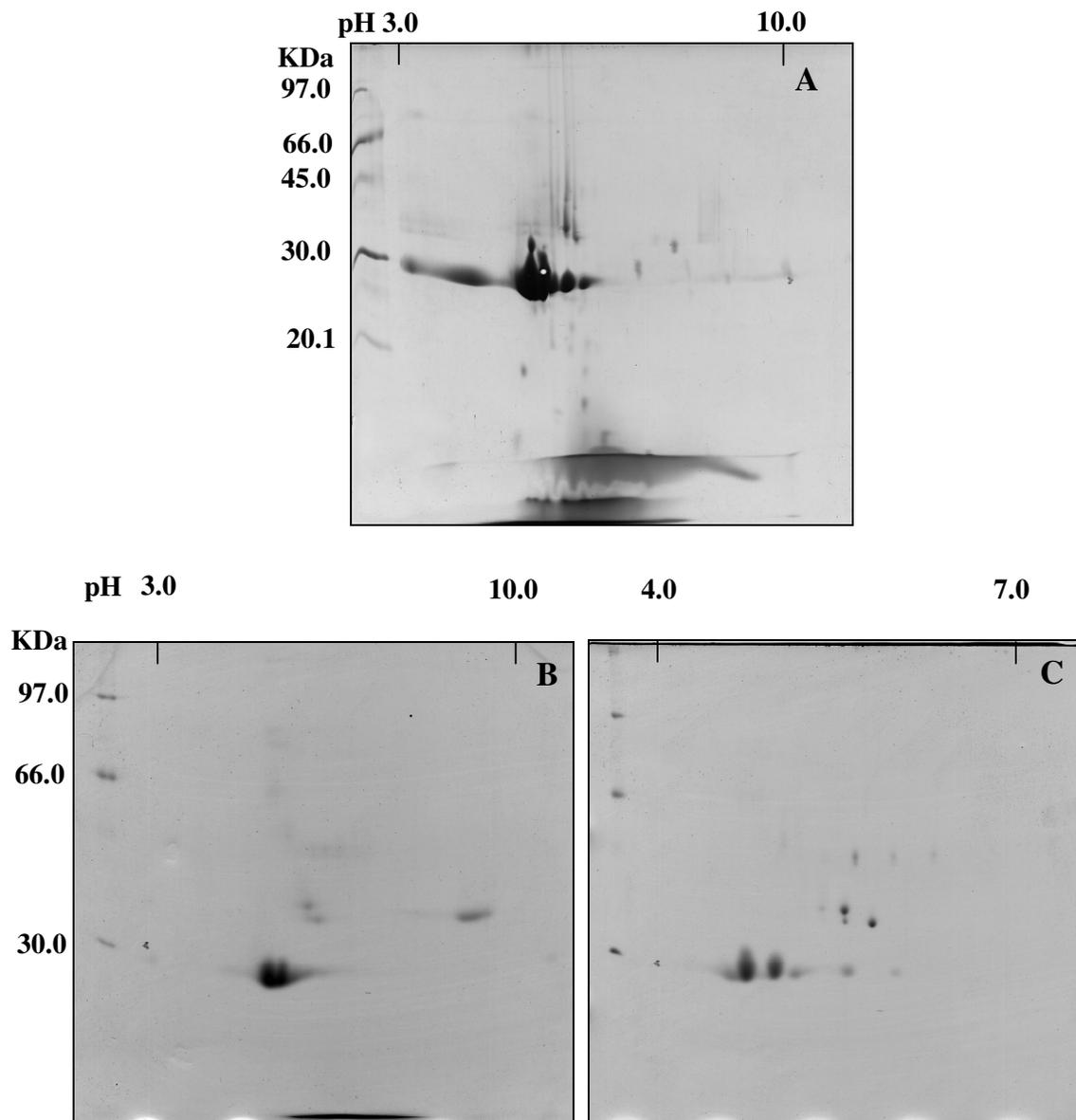


Figura 8 - Eletroforese bidimensional das proteínas do látex de *P. rubra*. Foram aplicados 400 μg (A) ou 200 μg (B e C) de proteínas, extraídas com tampão piridina e coradas com *Coomassie Brilliant Blue*.

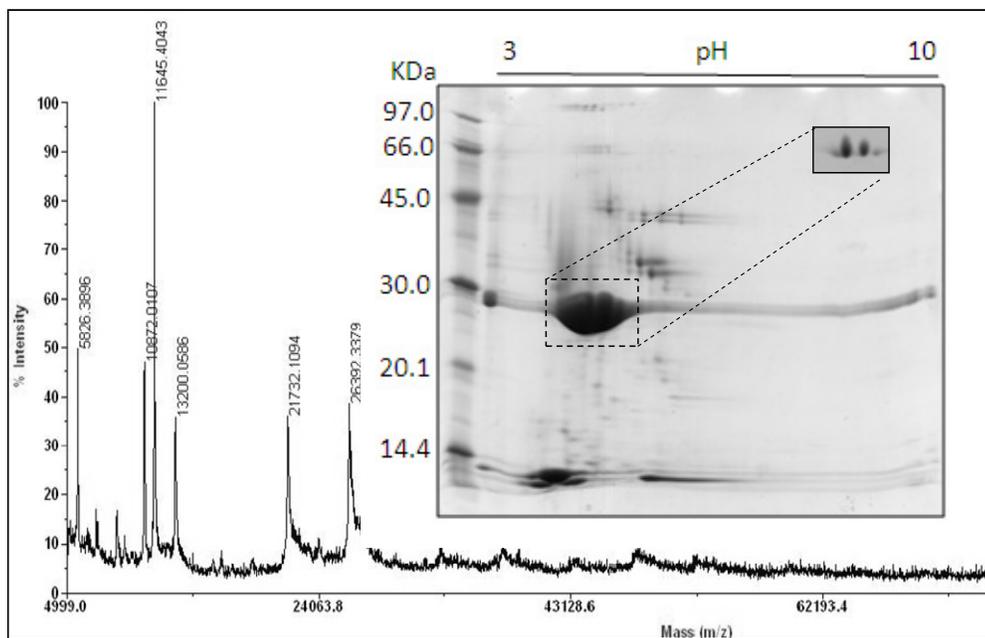


Figura 9 - Espectro de massas e eletroforese bidimensional das proteínas do látex de *Plumeria rubra*. A análise foi feita em um aparelho do tipo MALDI-TOF. As proteínas (300 μg) foram fracionadas no gel de poliacrilamida a 12,5 %, na faixa de pH de 3-10. O retângulo em destaque no gel mostra o grupo de proteínas que correspondem ao valor 26392.337 do espectro de massas.

5.2 Caracterização enzimática

Com o intuito de caracterizar as atividades enzimáticas presentes no látex de *P. rubra*, algumas atividades enzimáticas foram medidas, direcionando a pesquisa para a busca de enzimas relacionadas com a defesa vegetal. Desse modo, os primeiros ensaios para a busca de atividade enzimática foi para detecção de enzimas antioxidantes, onde três protocolos distintos foram seguidos para se determinar a ação de três enzimas: superóxido dismutase, peroxidase do ascorbato e catalase. Estas enzimas são responsáveis pelos processos de eliminação de espécies reativas do oxigênio – ROS – os radicais livres.

Superóxido dismutase e peroxidase do ascorbato foram detectadas no látex de *P. rubra* (TABELA 3). Catalase não foi detectada pelo método empregado.

O próximo passo para a busca de atividades enzimáticas presentes no látex de *P. rubra* foi a pesquisa de enzimas proteolíticas.

A fração PLPr de *P. rubra* foi capaz de degradar a azocaseína, um substrato inespecífico, e o BANA, substrato específico para proteinases do tipo cisteínicas. A hidrólise do BapNA, que tem especificidade para proteinases serínicas, foi apenas residual, como mostra a FIGURA 10. A ação enzimática foi significativamente aumentada quando as proteínas foram ativadas com DTT. A atividade específica detectada para a hidrólise da azocaseína foi de 0,15 UA/ μ gP, sendo esta atividade dobrada quando DTT foi adicionado (0,32 UA/ μ gP). Quando BANA foi utilizado como substrato, a atividade enzimática detectada foi de 0,38 UA/ μ gP.

Quando as proteínas do látex foram incubadas com quatro inibidores específicos de proteinases, antes de reagirem com azocaseína, os resultados observados mostraram que a atividade enzimática foi diminuída em 29, 87 e 8 % quando houve inibição das proteinases por E-64, PMSF e Pepstatina, respectivamente. Isto significa que a fração protéica do látex pode ser constituída por múltiplas proteinases, sendo do tipo cisteínica, serínica e, em menor proporção, aspártica (FIGURA 11).

Quando as proteínas do látex foram incubadas com três inibidores de proteinases cisteínicas (PMSF, E-64 e IAA), antes de reagirem com BANA, a atividade proteolítica foi inibida em 62, 7 e 11 %, respectivamente, reforçando a presença de proteinases cisteínicas no látex de *P. rubra* (FIGURA 12). De fato, esses resultados mostram que as proteinases do látex são majoritariamente enzimas cisteínicas, pois tiveram a capacidade de degradar o BANA e serem fortemente inibidas por PMSF, E-64 e IAA.

Tabela 3 - Enzimas antioxidantes detectadas na fração protéica do látex de *Plumeria rubra*.

Enzima	Atividade enzimática
Superóxido dismutase (SOD)	980,675 ± 6,116 UA/g
Peroxidase do ascorbato (APX)	0,196 ± 0,010 μmol H ₂ O ₂ /g.min
Catalase (CAT)	ND

ND = Não detectado.

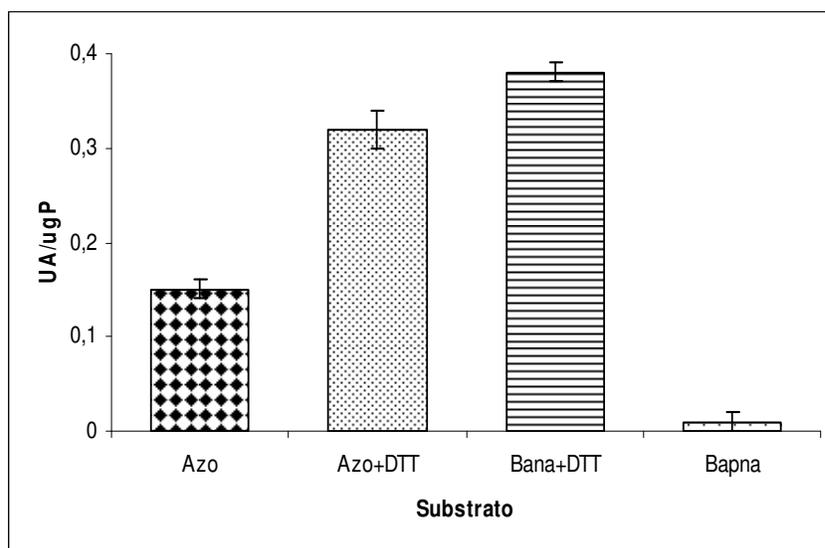


Figura 10 – Atividade proteolítica das proteínas do látex de *Plumeria rubra*. Os substratos utilizados foram azocaseína (azo), ativada ou não com DTT, BANA ativado e BApNA.

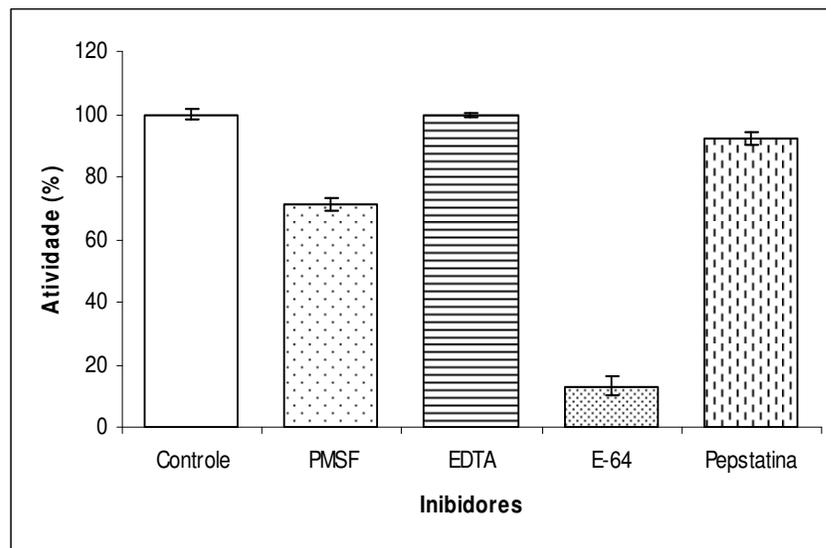


Figura 11 – Atividade proteolítica do látex de *Plumeria rubra* na presença de diferentes inibidores de proteinases utilizando azocaseína como substrato. As atividades proteolíticas remanescentes na presença de cada inibidor foram de 71, 99, 13 e 92 %, respectivamente.

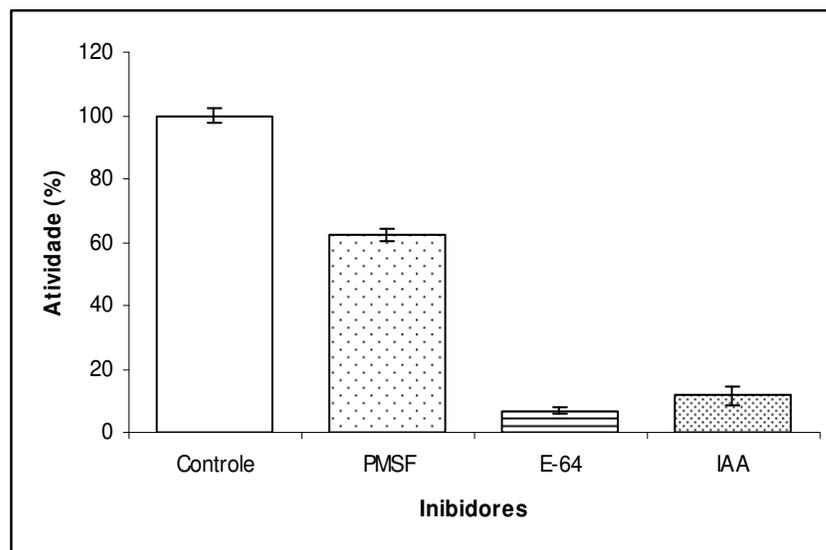


Figura 12 – Atividade proteolítica do látex de *Plumeria rubra* na presença de diferentes inibidores de proteinases utilizando BANA como substrato. As atividades proteolíticas remanescentes na presença de cada inibidor foram de 62, 7 e 11 %, respectivamente.

Seguindo na caracterização das enzimas proteolíticas encontradas no látex de *P. rubra*, sua fração protéica foi submetida à atividade enzimática sob condições variadas de pH e temperatura, mediante a presença dos três substratos testados: azocaseína, BANA e BApNA.

Os resultados do efeito do pH sobre as atividades enzimáticas podem ser visualizados na FIGURA 13. Pôde ser constatado que 6,0 foi o pH ótimo para a ação proteolítica, tanto para azocaseína quanto para BANA. Não foi detectada atividade enzimática em nenhum pH quando BApNA foi usado como substrato, ou pelo menos essa atividade foi residual, e não foi detectada pelo método empregado.

Quando analisadas sob condições de diferentes temperaturas, as enzimas proteolíticas do látex mostraram-se sensíveis a temperaturas altas. As enzimas apresentaram uma melhor atividade nas temperaturas de 4, 25 e 37 °C, sendo que a atividade diminuiu cerca de 30 % a 45 °C e foi praticamente abolida quando submetidas a valores de temperatura superiores a 60 °C (FIGURA 14).

Zimogramas para detecção qualitativa das atividades enzimáticas relatadas foram realizados. Os resultados mostram que as proteínas do látex de *P. rubra* apresentaram atividade peroxidásica, proteolítica e quitinásica em gel, confirmando as hidrólises *in vitro*. A atividade quitinásica foi visualizada na forma de uma suave banda protéica com massa molecular em torno de 28 kDa. Várias bandas protéicas correspondentes à degradação da gelatina no gel puderam ser visualizadas, sugerindo que a atividade proteolítica detectada no látex é desempenhada por múltiplas proteínas. A atividade de degradação do peróxido de hidrogênio é correspondente a apenas uma banda protéica, com massa molecular superior a 97 kDa (FIGURA 15).

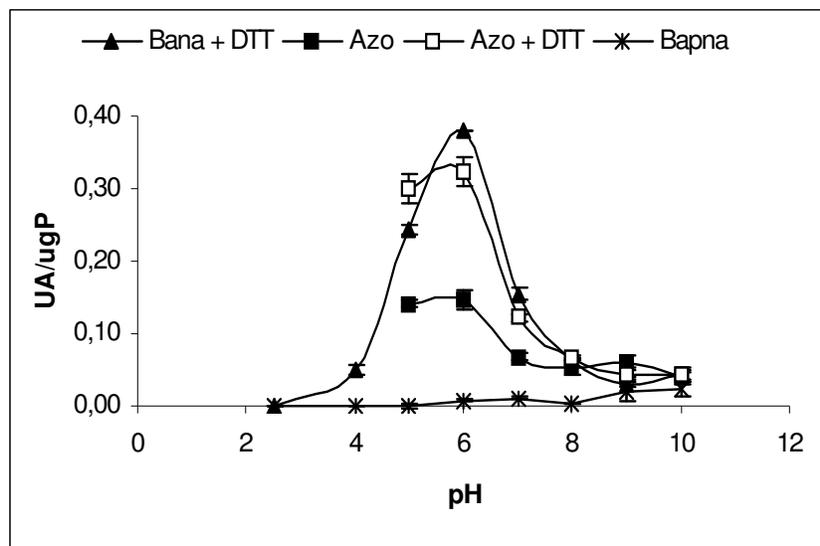


Figura 13 – Atividades proteolíticas do látex de *Plumeria rubra* em diferentes valores de pH. Os substratos utilizados foram azocaseína (Azo), ativada ou não com DTT, BANA ativado e BApNA.

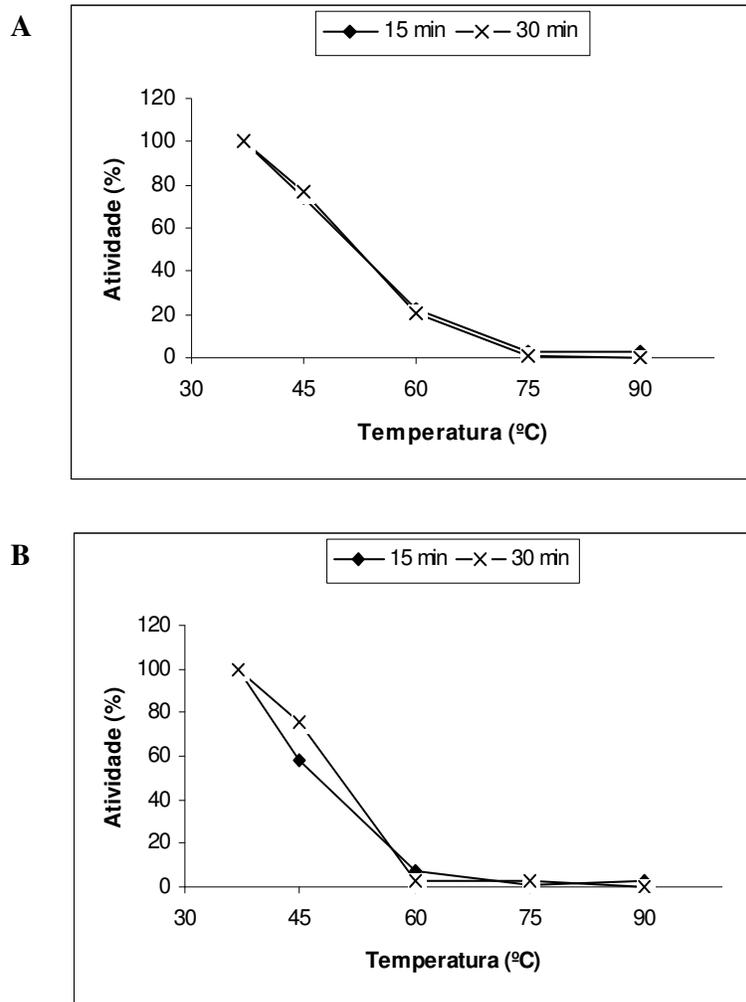


Figura 14 – Atividade proteolítica das proteínas do látex de *Plumeria rubra* aquecidas em diferentes temperaturas, utilizando azocaseína (A) e BANA (B) como substrato.

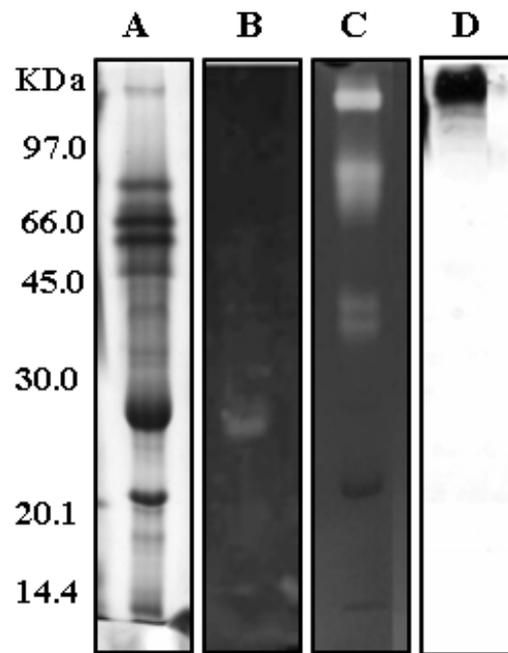


Figura 15 – Detecção de atividades quitinásica (B), proteinásica (C) e peroxidásica (D) em gel. A - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 %, marcadores de massa molecular: Fosforilase B (97,0 kDa), Albumina Sérica Bovina (66,0 kDa), Ovalbumina (45,0 kDa), Anidrase Carbônica (30,0 kDa), Inibidor de Tripsina (20,1 kDa), Alfa-Lactalbumina (14,4 kDa).

5.3 Ensaio biológicos

Após caracterizar o látex de *P. rubra* quanto ao seu perfil protéico e enzimático, neste trabalho também foi avaliado o efeito inibidor desse fluido sobre os mecanismos de ovoposição dos bruquídeos, bem como, a capacidade de suas proteínas interferirem no desenvolvimento das larvas de *C. maculatus* e *Ceratitis capitata*.

5.3.1 Bioensaio com *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*

5.3.1.1 Ensaio de repelência

Os ensaios de repelência realizados demonstraram o potencial do látex bruto de *P. rubra* de inibir a ovoposição dos bruquídeos em sementes de feijão-de-corda. A TABELA 4 mostra o número médio de ovos postos pelas fêmeas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* sobre os grãos de feijão tratados com látex, gelatina ou com a combinação de gelatina + látex.

O látex de *P. rubra*, quando impregnado em sementes de feijão, foi capaz de inibir a ovoposição de *C. maculatus*, sendo mais eficiente quando usado em conjunto com gelatina. Isso pode indicar que a cobertura de gelatina favorece a adsorção das partículas do látex sobre as sementes, já que ela própria não promove nenhuma alteração na ovoposição. A taxa de sobrevivência e a massa larval, determinados 17 dias depois da eclosão dos ovos, permaneceram iguais ao grupo controle (TABELA 5). Isto sugere que o fluido laticífero não altera a eclosão dos ovos nem o desenvolvimento das larvas.

Quando *Z. subfasciatus* foi ensaiado nas mesmas condições observou-se que o látex, sozinho ou em conjunto com a gelatina, foi capaz de inibir fortemente a sua ovoposição, que diminuiu de 8 para menos de 1 ovo por semente. A taxa de sobrevivência e a massa das larvas não foram afetados (TABELA 5). Os compostos ativos no látex, portanto, inibem somente a ovoposição dos insetos testados.

No experimento seguinte, a atividade repelente do látex foi avaliada em várias diluições, visando estabelecer a menor concentração (dentre as testadas) capaz de exibir efeito inibitório. O efeito repelente do látex sobre *C. maculatus* foi mantido até a diluição 1:100, enquanto que, somente a diluição 1:1 do látex apresentou efeito inibitório sobre a ovoposição de *Z. subfasciatus* (FIGURA 16).

Tendo em vista os resultados anteriores, foi investigado por quanto tempo a atividade repelente poderia se manter sobre as sementes. Então, foram realizados ensaios de repelência com os dois insetos e as sementes foram preparadas com látex por vários dias antes do experimento.

Os resultados mostraram que o efeito repelente se manteve nas sementes em todos os períodos de tempo testados, inclusive com 30 dias. Ou seja, a ovoposição dos insetos foi inibida quando foram utilizadas sementes tratadas com látex 1 mês antes da exposição, para ambos os insetos.

O efeito repelente do látex de *P. rubra* apresentou-se irregular, mas constante, ao longo do tempo no bioensaio com *C. maculatus*. Experimentos realizados com *Z. subfasciatus* mostraram que a repelência permaneceu constante até 72 horas após a preparação das sementes. Além disso, com 15 e 30 dias ainda pôde ser detectado mais de 50% de inibição da ovoposição, sugerindo que esta atividade é tempo-dependente (FIGURA 17).

Estes resultados poderiam dar indícios de que compostos voláteis não seriam os responsáveis pela ação repelente visto que o efeito se manteve nas sementes por um mês, período suficiente para que esses compostos fossem dissipados. Porém, é conveniente relatar que ainda se podia detectar o aroma característico do látex nessas sementes.

Bioensaios de repelência foram realizados com as frações PLPr e FD do látex na tentativa de verificar se estas seriam responsáveis pelo efeito detectado. Os resultados mostraram que a atividade repelente não está em nenhuma dessas frações. A fração FD não foi efetiva mesmo quando testada na concentração de 2 % (FIGURAS 18 e 19). Estes resultados sugerem que as proteínas do látex não estão envolvidas na atividade repelente.

Esta observação levou à hipótese de que o efeito repelente poderia ser desempenhado por metabólitos secundários voláteis presentes no fluido laticífero. Para explorar essa hipótese, um novo experimento foi planejado onde o látex foi submetido a um processo de agitação *overnight* com o intuito de provocar a saída de substâncias voláteis do látex, ou pelo menos parte delas. Como resultado, observou-se que o número de ovos depositados por fêmeas de *C. maculatus* foi semelhante em sementes tratadas com o látex sem e com agitação por 12 horas, diferindo das não tratadas (controle). Quando deixado sob agitação por 36 horas o número de ovos registrados foi igual ao controle. Com *Z. subfasciatus* foi observado que o número de ovos depositados nas sementes foi crescente em função do período de agitação imposto, mostrando que a atividade repelente foi diminuindo ao longo do tempo (FIGURA 20).

O último experimento dos ensaios de repelência objetivou verificar se o efeito redutor da ovoposição se daria através da inibição da cópula ou da fertilidade das fêmeas, ou seja, se poderia ser devido a algum efeito nocivo sobre os mecanismos fisiológicos que governam a fecundidade e a ovoposição dos insetos. No novo experimento elaborado para este fim, os insetos ficaram em contato direto com látex, não mais em sementes tratadas, e sim, em um ambiente fechado contendo o látex puro. Depois de diversos períodos de exposição ao látex, sementes normais foram oferecidas aos insetos e a ovoposição foi monitorada.

C. maculatus mostrou-se sensível ao látex, o número de ovos nas sementes permaneceu diminuído durante os períodos de tempo testados. *Z. subfasciatus* não foi sensível a esse tipo de exposição. O número de ovos postos foi igual ao controle (FIGURA 21).

Tabela 4 – Número de ovos depositados por fêmeas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* sobre sementes de feijão-de-corda cobertas com diferentes preparações do látex de *P. rubra*. Os valores representam a média \pm EPM de n=40. * (p<0,05) e ** (p<0,01) denota diferença significativa entre os tratamentos e o controle (ANOVA – teste de Dunnet).

Tratamento	Média do n°. de ovos	
	<i>C. maculatus</i>	<i>Z. subfasciatus</i>
Sementes Controle	7,00 \pm 0,31	8,20 \pm 0,48
Sementes+Látex	5,00 \pm 0,24**	0,52 \pm 0,27**
Sementes+Gelatina	8,87 \pm 0,28	5,92 \pm 0,81
Sementes+Gelatina+Látex	2,27 \pm 0,31**	0,07 \pm 0,07**

Tabela 5 – Taxa de sobrevivência e massa das larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* desenvolvidas em sementes de feijão-de-corda cobertas com diferentes preparações do látex de *P. rubra*. Os valores representam a média \pm EPM. Não houve diferença significativa entre os resultados (ANOVA – teste de Dunnet).

Tratamento	Media do nº. de ovos			
	<i>C. maculatus</i>		<i>Z. subfasciatus</i>	
	Sobrevivência (%)	Massa larval (mg)	Sobrevivência (%)	Massa larval (mg)
Sementes Controle	67,75 \pm 14,43	5,99 \pm 2,07	43,25 \pm 9,28	4,13 \pm 1,79
Sementes+Látex	71,25 \pm 10,53	5,87 \pm 2,34	55,25 \pm 12,50	4,35 \pm 0,92
Sementes+Gelatina	72,50 \pm 10,66	6,29 \pm 2,05	52,00 \pm 13,37	4,25 \pm 1,58
Sementes+Gelatina +Látex	80,00 \pm 12,83	5,67 \pm 2,53	ND	ND

ND=Não determinado

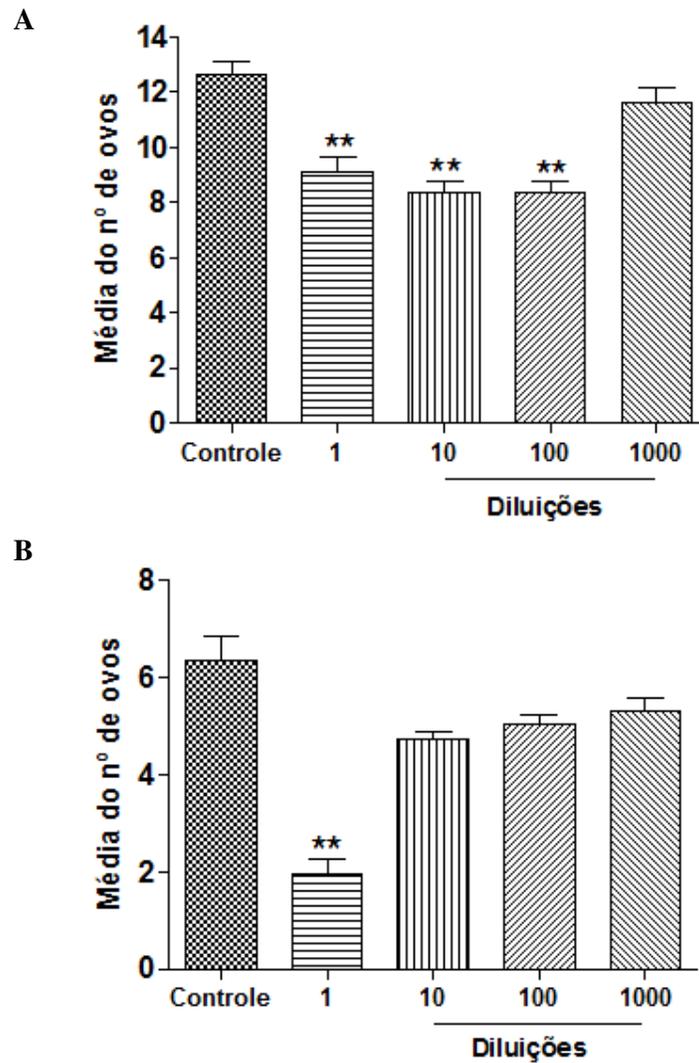


Figura 16 – Número de ovos depositados por 20 fêmeas de *Callosobruchus maculatus* (A) e *Zabrotes subfasciatus* (B) em sementes de feijão-de-corda cobertas com diferentes diluições do látex de *Plumeria rubra*. Os dados foram expressos como média \pm EPM (n = 40). ** (p<0,01) denota diferença significativa entre os tratamentos e o controle (ANOVA – teste de Dunnet).

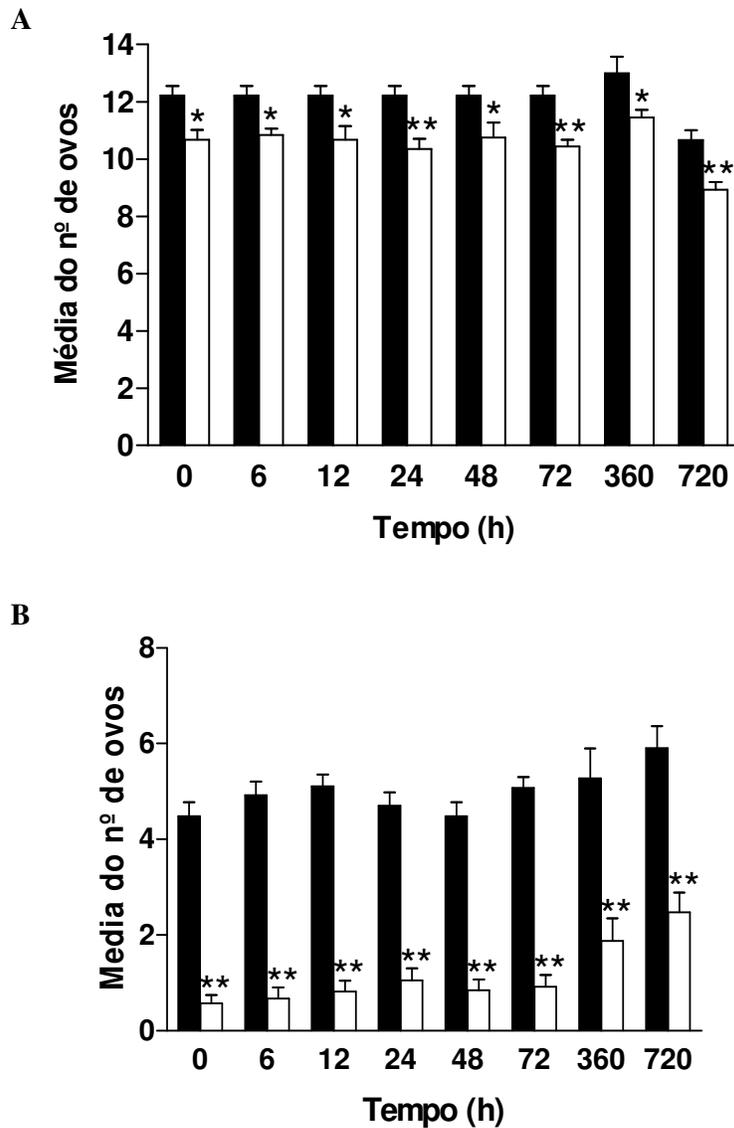


Figura 17 – Número de ovos depositados por 20 fêmeas de *Callosobruchus maculatus* (A) e *Zabrotes subfasciatus* (B) em sementes de feijão-de-corda tratadas com látex de *Plumeria rubra* avaliados em diferentes intervalos de tempo. Barras pretas representam os grupos controle e as barras brancas, os experimentais. Os dados foram expressos como média \pm EPM (n = 40).

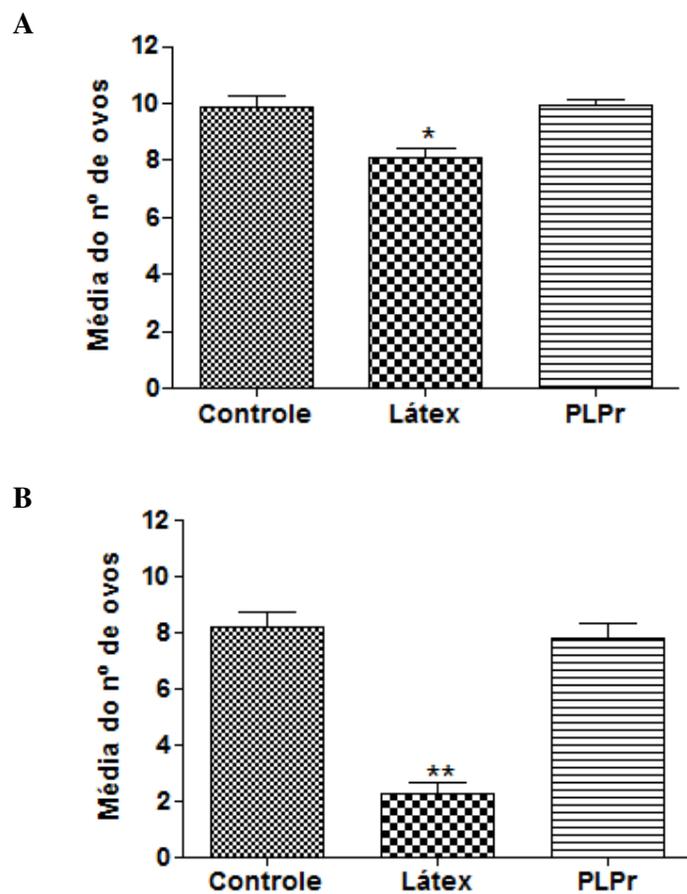


Figura 18 – Número de ovos depositados por 20 fêmeas de *Callosobruchus maculatus* (A) e *Zabrotes subfasciatus* (B) em sementes de feijão-de-corda cobertas com látex íntegro de *Plumeria rubra* ou com sua fração protéica (PLPr) a 1 %. Os dados foram expressos como média \pm EPM (n = 40). * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$) denotam diferença significativa entre os tratamentos e o controle (ANOVA – teste de Dunnet).

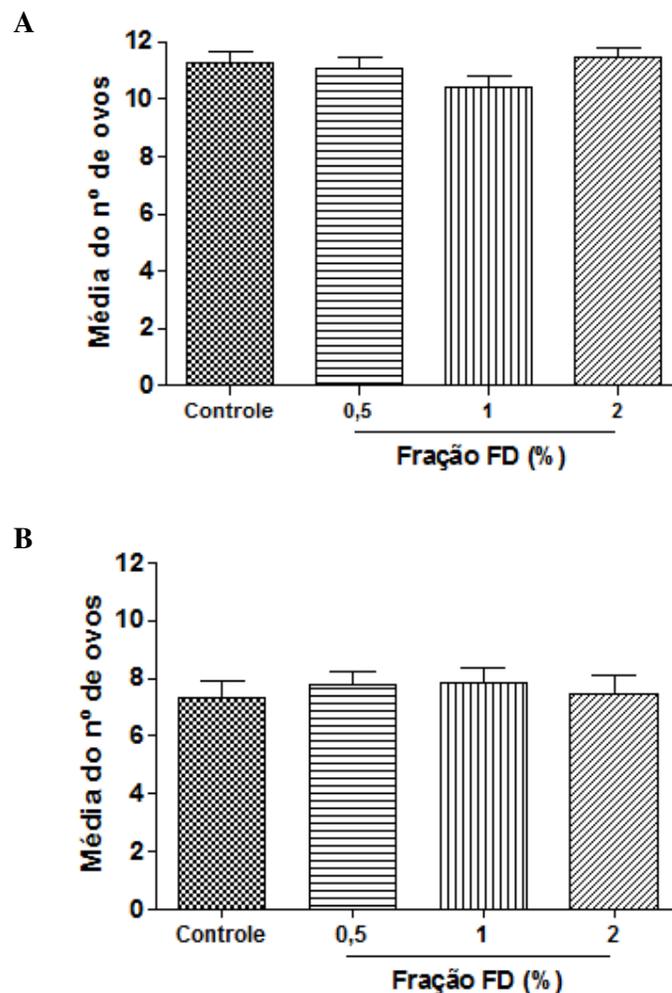


Figura 19 – Número de ovos depositados por 20 fêmeas de *Callosobruchus maculatus* (A) e *Zabrotes subfasciatus* (B) em sementes de feijão-de-corda cobertas com látex íntegro de *Plumeria rubra* ou com sua fração não protéica (FD) a 0,5, 1 e 2 %. Os dados são expressos como média \pm EPM (n = 40). Não houve diferença significativa entre os valores (ANOVA – teste de Dunnet).

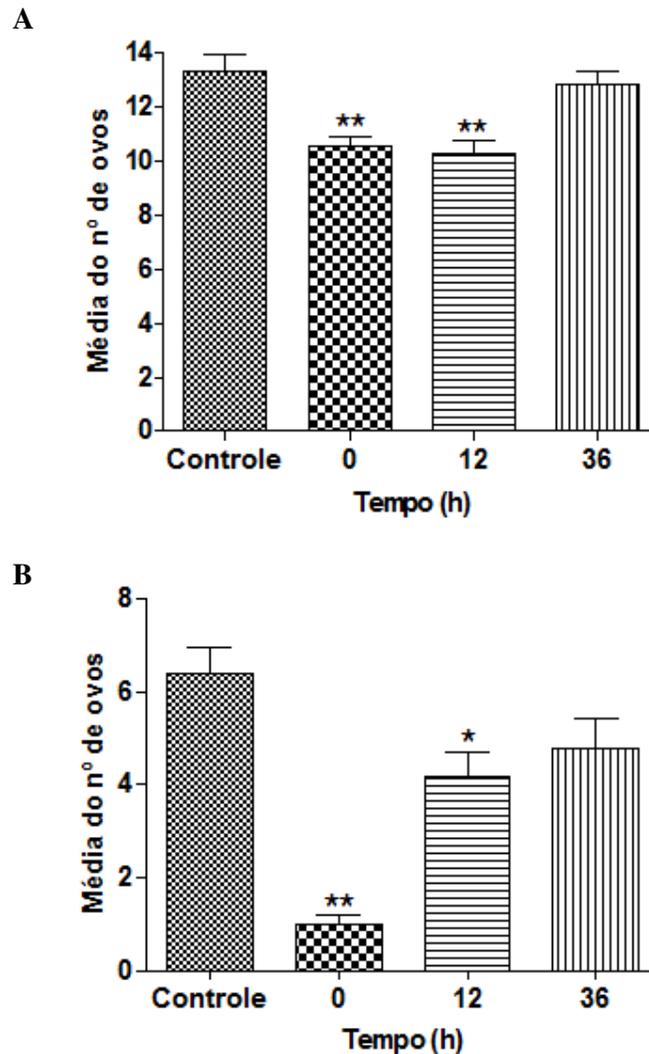


Figura 20 – Número de ovos depositados por 20 fêmeas de *Callosobruchus maculatus* (A) e *Zabrotes subfasciatus* (B) em sementes de feijão-de-corda tratadas com látex de *Plumeria rubra* mantido sob agitação por diferentes intervalos de tempo. Os dados foram expressos como média \pm EPM (n = 40). * (p<0,05) e ** (p<0,01) denotam diferença significativa entre os tratamentos e o controle (ANOVA – teste de Dunnet).

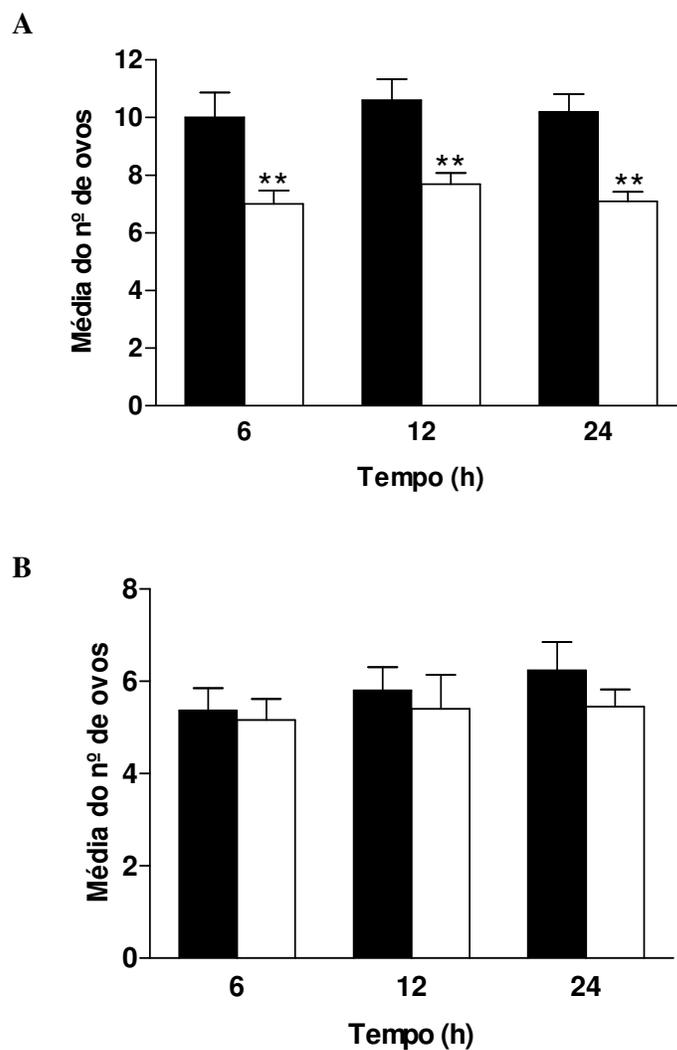


Figura 21 – Número de ovos depositados em sementes de feijão-de-corda por fêmeas de *Callosobruchus maculatus* (A) e *Zabrotes subfasciatus* (B) expostos diretamente ao látex de *Plumeria rubra* por diferentes intervalos de tempo. Barras pretas representam os grupos controle e as barras brancas, os experimentais. Os dados foram expressos como média \pm EPM (n = 40). ** ($p < 0,01$) denota diferença significativa entre os tratamentos e o controle (ANOVA – teste de Dunnet).

5.3.1.2 Ensaio com dieta artificial

Uma segunda etapa de ensaios biológicos foi procedida com *C. maculatus*. Nestes ensaios foi avaliado se as proteínas do látex teriam algum efeito deletério sobre o desenvolvimento das larvas deste inseto quando alimentadas com dieta artificial enriquecida com a fração PLPr. Para este objetivo, foi usado um sistema de sementes artificiais constituídas por farinha de feijão misturada com diferentes concentrações da fração, dentro de cápsulas de gelatina, simulando uma semente de feijão. A fração DL também foi testada.

A sobrevivência das larvas foi diminuída em quase 50% na presença das proteínas do látex a 0,4% e a massa dessas larvas foi severamente afetada, diminuindo de 3 mg para 0,5 mg. Apenas 0,1 % das proteínas do látex foram necessárias para diminuir em 50 % o ganho de massa larval. BSA foi usado como controle, visto que não causa nenhuma alteração no desenvolvimento das larvas (FIGURA 22).

Na presença da fração DL a taxa de sobrevivência não foi afetada, mas houve uma leve redução da massa larval, que diminuiu de 3 mg para 2 mg (FIGURA 23).

Quando as proteínas do látex foram desnaturadas por aquecimento, a porcentagem de sobrevivência e o peso médio das larvas foram semelhantes ao controle, sugerindo o envolvimento de proteínas no efeito deletério observado (FIGURA 24).

Neste mesmo bioensaio também foi avaliado o envolvimento do pico I, oriundo da cromatografia de exclusão molecular, na ação deletéria das proteínas do látex sobre as larvas de *C. maculatus*. As larvas alimentadas com o pico I não foram afetadas quanto à sobrevivência e o ganho de massa. Com isso, pode-se sugerir que as moléculas responsáveis pelo efeito deletério não estariam encerradas nesse pico. O pico I foi o único usado nesse experimento porque os picos II e III foram apenas residuais e não foram acumulados em quantidades necessárias para o bioensaio.

A estratégia seguida para investigar a ação das proteínas do látex sobre *C. maculatus* envolveu a análise de susceptibilidade das proteínas do látex à digestão pelo extrato larval. A FIGURA 25 mostra que as proteínas do látex foram resistentes à proteólise frente às proteases da larva do *C. maculatus*, mesmo após 72 horas de incubação.

Esse resultado mostra que as proteínas do látex ao resistirem à proteólise poderiam agir livremente sobre o intestino dessas larvas e causar o forte efeito deletério observado nos bioensaios.

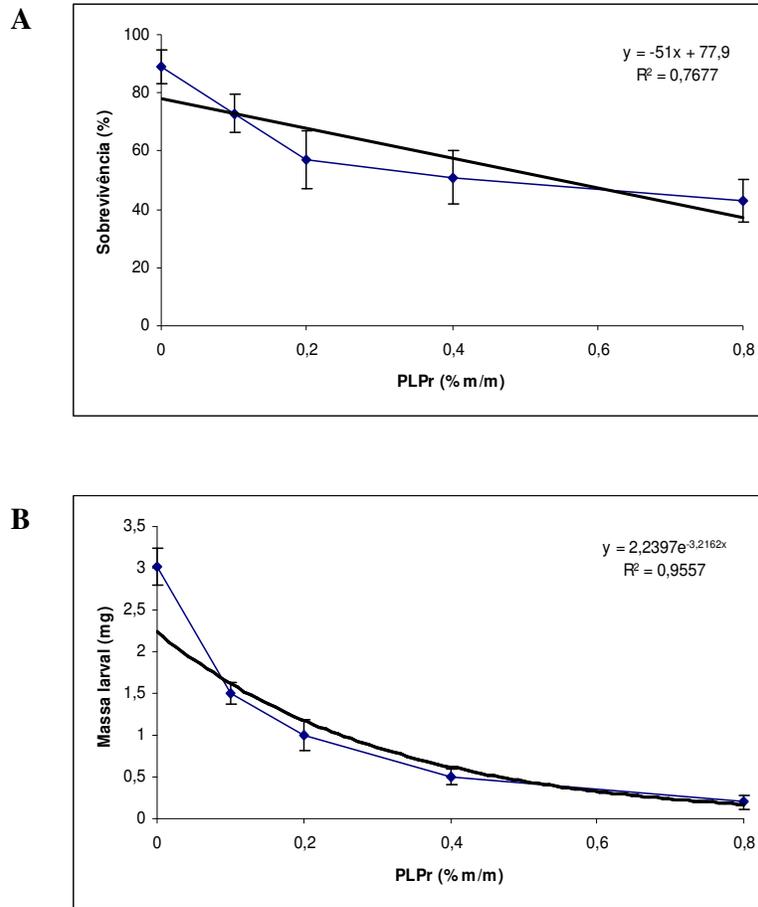


Figura 22 – Percentual de sobrevivência (A) e massa média (B) das larvas de *C. maculatus* alimentadas com diferentes concentrações da fração PLPr do látex de *Plumeria rubra*.

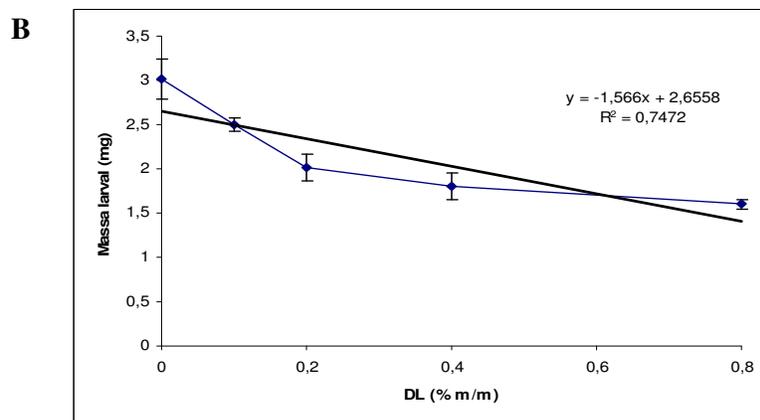
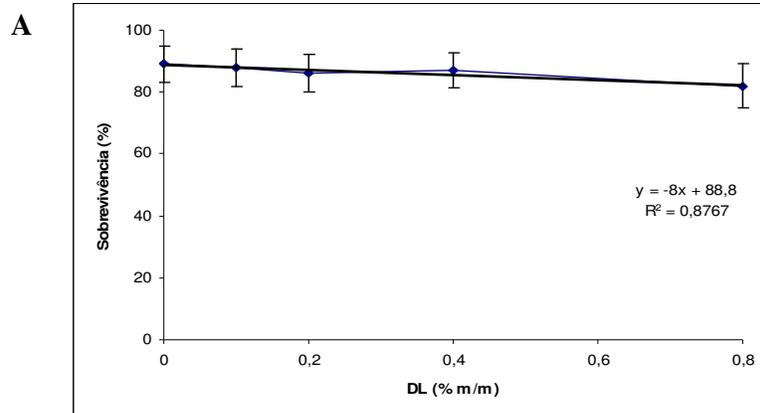


Figura 23 – Percentual de sobrevivência (A) e massa média (B) das larvas de *C. maculatus* alimentadas com diferentes concentrações da fração DL do látex de *Plumeria rubra*.

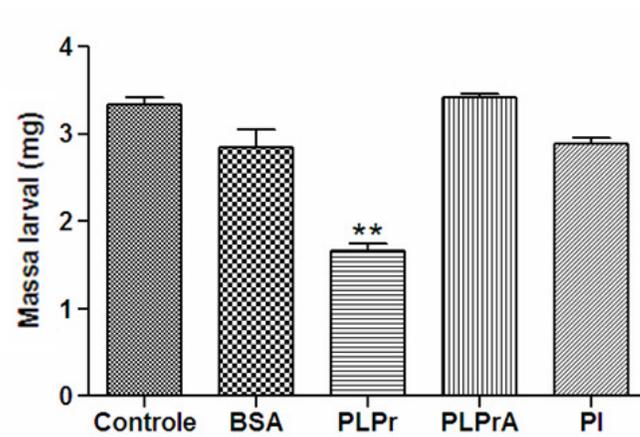


Figura 24 – Percentual de sobrevivência (A) e massa média (B) das larvas de *C. maculatus* alimentadas com a fração protéica do látex de *Plumeria rubra* íntegra (PLPr), aquecida (PLPr_A) e com o pico I (PI) da cromatografia de exclusão molecular.

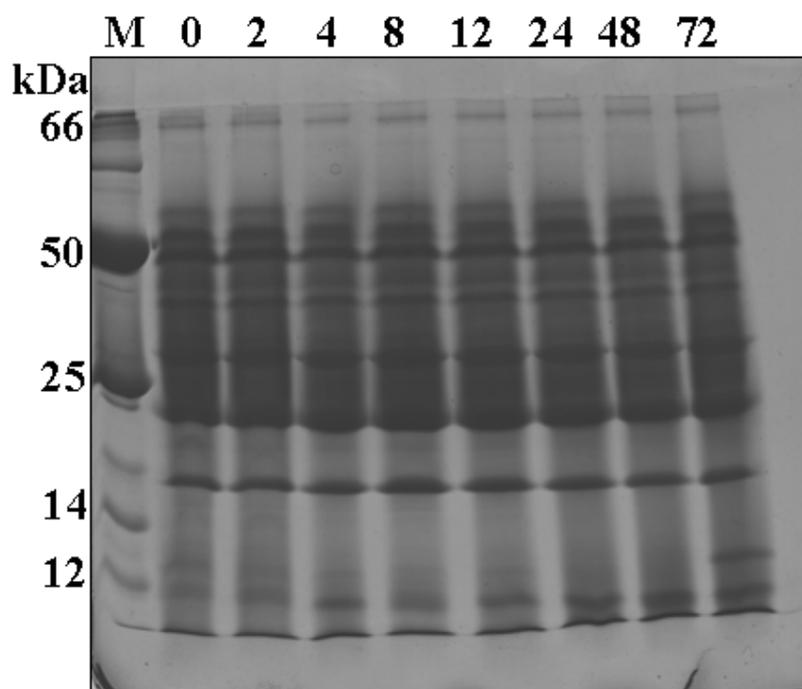


Figura 25 – Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) das proteínas do látex de *Plumeria rubra* incubadas a 37 °C com o homogenato intestinal das larvas de *C. maculatus* por diferentes intervalos de tempo. M = marcadores de massa molecular; 0 - 72 = tempo de incubação, em horas.

3.2 Bioensaio com *Ceratitis capitata*

As proteínas do látex de *P. rubra* adicionadas à dieta de *C. capitata* não causaram nenhum efeito deletério sobre o desenvolvimento das larvas mesmo na maior concentração testada, 4 % (FIGURA 26).

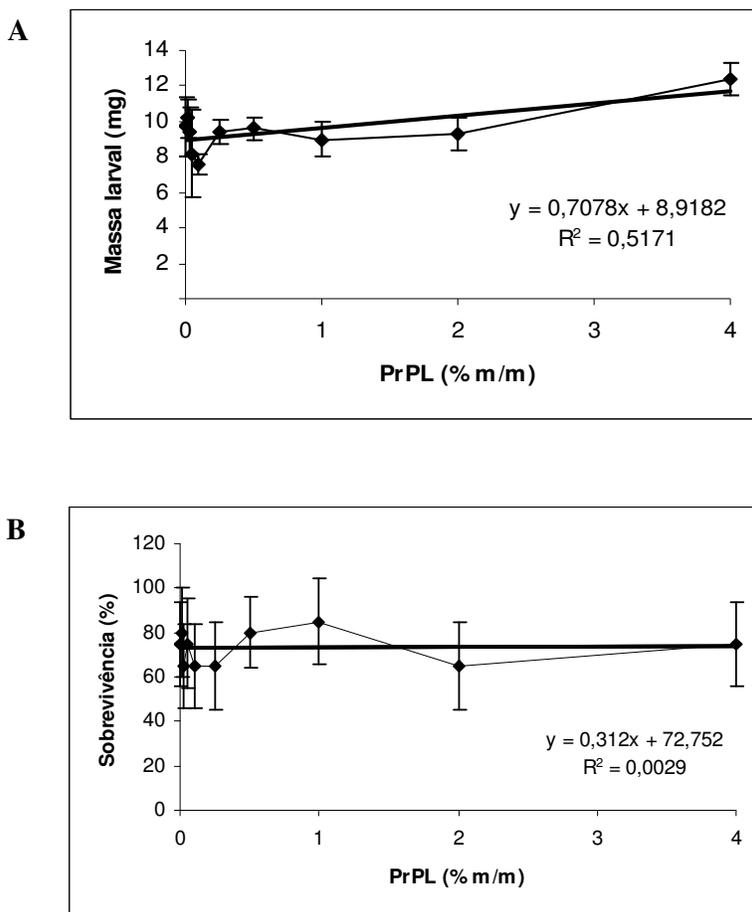


Figura 26 - Massa (A) e sobrevivência (B) das larvas de *C. capitata* alimentadas com dieta artificial enriquecida com concentrações crescentes da fração protéica (PrPL) do látex de *P. rubra*. Os dados foram expressos como média \pm EPM ($n = 20$). Não houve diferença significativa entre os valores.

VI – DISCUSSÃO

O látex é um fluido biológico notavelmente comum em plantas. Cerca de 6% de todas as espécies de plantas vasculares são reconhecidas como portadoras de laticíferos. Estas estruturas formam sistemas de canais que podem se estender por toda a planta. Estes canais mantêm o látex sob pressão, que é produzido, acumulado e exsudado comumente após um dano tecidual (HAGEL *et al.*, 2008).

Atualmente tem havido um crescente interesse pelos laticíferos e seu metabolismo peculiar e, embora ainda haja pouca informação disponível, a importância desses fluidos vegetais tem sido cada vez mais reconhecida e revisada (HAGEL *et al.* 2008; PICKARD, 2008).

No entanto, o estudo das plantas produtoras de látex ainda é escasso, com poucos exemplares sendo estudados, enquanto que, muitas plantas laticíferas são relatadas estarem envolvidas em manifestações de toxicidade ou exibirem propriedades farmacológicas que merecem investigações biológicas.

Quase toda a literatura disponível sobre os aspectos bioquímicas, funcionais ou tóxicos do conteúdo laticífero é referente ao látex da seringueira, a *Hevea brasiliensis*, porque o seu látex é utilizado em todo o mundo como uma fonte de borracha natural (poli-*cis*-isopreno), matéria-prima para a fabricação de muitos produtos industrializados derivados da borracha (CORNISH, 2001).

Nesse trabalho, o látex de *P. rubra* foi, pela primeira vez, caracterizado quanto a seus aspectos bioquímicos e enzimáticos, e avaliado quanto a uma potencial ação contra insetos.

Jasmim é o nome popular mais usado para se referir a *P. rubra*, uma planta de porte arbóreo muito conhecida pela beleza e aroma de suas flores, motivo pelo qual é cultivada como uma planta ornamental amplamente distribuída nos grandes centros urbanos. Sua distribuição geográfica estende-se por toda a América tropical, assim como, pelo do Brasil. A facilidade com que esta planta é encontrada em jardins residenciais e praças de Fortaleza e seus arredores facilitou a obtenção do fluido laticífero para esse estudo.

Os usos populares dessa planta fazem menção ao uso medicinal de suas folhas em contusões ou luxações, e relatos colhidos durante as coletas apontaram o uso do seu látex em

coceiras, impingens e inchaços. No entanto, raros são os estudos bioquímicos ou farmacológicos relatados para esta espécie, encontrando-se na literatura apenas estudos que avaliam o potencial citotóxico (KARDONO *et al.*, 1990) e anti-HIV (TAN *et al.*, 1991) de componentes fitoquímicos de sua casca. Sobre o látex foi encontrado um estudo de caracterização de atividade lipolítica (CAMBON *et al.*, 2006).

Nesse trabalho o estudo bioquímico realizado com o látex de *P. rubra* desenvolveu-se principalmente com sua fração protéica, que foi eficientemente separada da borracha, componente majoritário do látex, e de outras partículas e/ou metabólitos secundários. A fração protéica (PLPr) apresentou valores de proteínas solúveis de 0,33 mg/mL. Valor bem inferior daqueles encontrados no látex de *C. procera* e *Mangifera indica* que foram de 3,5 mg/mL e 8,2 mg/mL, respectivamente (JOHN *et al.*, 2003; FREITAS *et al.*, 2007).

A fração PLPr mostrou ser constituída de proteínas com diversas massas moleculares, variando de 15 a 58 kDa, prevalecendo as de aproximadamente 26 kDa. Isso mostra que o látex de *P. rubra* apresenta uma complexa mistura de proteínas com massas moleculares variadas, assim como no látex de *Manihot glaziovii* (PEREIRA *et al.*, 1999), que apresentou padrão eletroforético com proteínas variando de 14-80 kDa. Esses valores são também semelhantes com aqueles encontrados no látex de diversas variedades de *Hevea brasiliensis* (ARREGUIN *et al.* 1988).

Os resultados mostraram ainda que a fração protéica do látex de *P. rubra* exibiu um número razoável de *spots* protéicos vistos em 2-DE. Perfis complexos de proteínas foram também observados no látex de *C. procera*, *H. brasiliensis* e *Papaver somniferum* (FREITAS *et al.* 2007, POSCH *et al.* 1996; DECKER *et al.* 2000). No látex de *H. brasiliensis*, cerca de 200 *spots* protéicos distintos foram encontradas em 2-DE, e mais de 300 no látex de *P. somniferum*. À luz destes resultados, pode-se constatar que fluidos laticíferos constituem importantes fontes de proteínas desconhecidas de, certamente, relevância biológica.

Apesar dos baixos valores de proteínas solúveis encontrados, quando comparado com outras espécies, foi constatado que o látex de *P. rubra* é rico em atividades enzimáticas. Neste trabalho foi verificado que enzimas com atividades relacionadas ao metabolismo oxidativo estão presentes neste látex, embora não tenha sido detectada atividade de catalase. Essas atividades enzimáticas também foram descritas no látex de *C. procera*, *Euphorbia characias* e *Mango sap* (FREITAS *et al.*, 2007; JOHN *et al.*, 2003 e MURA *et al.*, 2006), bem como no látex de *Cryptostegia grandiflora* e *Himathantus drasticus* (FREITAS *et al.*, 2009 – dados submetidos).

Enzimas antioxidantes fazem parte de um processo metabólico que reúne diferentes atividades catalíticas em cascata que culminam com a destruição das espécies reativas de oxigênio. Estas, por sua vez, são potencialmente tóxicas para as células (MITTLER, 2002).

O metabolismo antioxidante é um processo bastante comum que ocorre nos vegetais, e a presença desse tipo de atividade nos laticíferos era esperada. Mesmo levando em conta o processo oxidativo endógeno nas plantas que envolve a degradação de metabólitos secundários, as enzimas antioxidantes, tais como peroxidases, catalase e superóxido dismutase, são reconhecidas como proteínas relacionadas à patogênese (VAN LOON *et al.* 2006). Também foi relatado que a síntese *de novo* destas enzimas ocorre após o início da infecção (SVALHEIM; ROBERTSEN, 2006).

Estas atividades estão comumente presentes nas folhas, que são os principais tecidos danificados após a infecção. Laticíferos de *P. rubra*, bem como, de *C. procera* e *C. grandiflora* são distribuídos através de suas folhas, que comumente exsudam após uma lesão. Assim, é razoável sugerir que essas atividades enzimáticas desempenham um importante papel defensivo durante a infecção. Convém ainda relatar que o envolvimento do metabolismo antioxidante como estratégia defensiva contra fungos já foi proposto (CARUSO *et al.* 2001).

Com exceção da síntese de borracha natural, a atividade proteolítica endógena é o aspecto mais comum e investigado no metabolismo de laticíferos. Enzimas proteolíticas são reconhecidas por desempenhar papel crucial em uma série de eventos relevantes do ciclo de vida dos vegetais. Isto inclui a senescência foliar, a degradação de proteínas de reserva durante a germinação de sementes, o desenvolvimento e a maturação dos frutos, os mecanismos reguladores de morte celular programada (DOMSALLA; MELZING, 2008).

A síntese e o acúmulo de proteinases em células altamente especializadas, como os laticíferos, são eventos importantes também no que se refere à defesa. O papel defensivo das enzimas proteolíticas nos vegetais foi revisto por VAN DER HOORN *et al.* (2004). KONNO e colaboradores (2004) demonstraram a atividade de proteção da papaína, uma proteinase do látex de *Carica papaya*, contra herbívoros.

Atividades proteolíticas foram detectadas e caracterizadas no látex de *P. rubra*. Proteinases do tipo cisteínica representaram a quase totalidade da atividade proteolítica do látex, onde proteinases serínicas também foram detectadas.

As condições ótimas de pH e temperatura determinadas para a ação das proteinases do látex de *P. rubra* foram pH 6,0 e 37 °C, para todos os tipos de substratos usados,

diferentemente dos valores determinados para *C. procera*, que teve uma atividade mais intensa de hidrólise da azocaseína a pH 5,0 e 6,0. O pH 6,0 foi melhor quando as proteínas foram ativadas com DTT ou quando BANA foi usado como substrato. As proteínas do látex de *C. procera* foram mais resistentes a altas temperaturas do que as de *P. rubra* (FREITAS *et al.*, 2007).

Proteinases cisteínicas parecem predominar na maioria dos fluidos laticíferos. Há relatos de proteinases cisteínicas no látex de diversas espécies, como em *Ficus glabrata*, *F. carica*, *Calotropis gigantea*, *Funastrum clausum*, *Hevea brasiliensis* e *Carica papaya* (ABRAHAM; JOSHI, 1979; SGABIERI *et al.*, 1964; GLAZER; SMITH, 1971). Em *C. papaya*, 6 % da matéria seca de seu látex é constituído de enzimas, das quais, 80 % são proteases cisteínicas, entre elas, papaína, quimopapaína, caricaína e glicil-endorpeptidase (AZRAKAN *et al.*, 2003).

Pelo fato de plantas produzirem e armazenarem uma grande quantidade de proteinases cisteínicas em seu látex e as mesmas serem ativadas apenas após a planta sofrer algum dano mecânico, o papel dessas enzimas na defesa do vegetal tem sido proposto, além do fato de essas enzimas serem requeridas no processo de coagulação do látex (MOUTIM *et al.*, 1999).

A presença de quitinases ou proteínas que têm a capacidade de se ligar à quitina também pode evidenciar o papel de defesa do látex. As enzimas quitinásicas têm como atividade a digestão de polímeros de *N*-acetilglucosamina unidos por ligações β -1-4. Essa seqüência ocorre na parede celular de fungos filamentosos, muitos dos quais são fitopatogênicos, e estão presentes na constituição da membrana peritrófica que envolve o trato digestório dos insetos, além de ocorrerem no exoesqueleto de outros organismos (JACH *et al.*, 1995; TELLAM *et al.*, 1999). O fato de que plantas não possuem estruturas montadas a partir de polímeros de quitina, enquanto que estas ocorrem em seus potenciais predadores, confere a essas enzimas um potencial papel na defesa.

Nesse trabalho foi mostrado pela primeira vez evidências de quitinases no látex de *P. rubra*, que apresentou atividade quitinolítica em gel contendo glicol quitina. A presença de quitinases já foi descrita no látex de *H. brasiliensis* e *Ficus microcarpa* (JEKEL *et al.*, 1991; TAIRA *et al.*, 2005). Pode-se inferir que os efeitos deletérios encontrados das proteínas do látex sobre o inseto *C. Maculatus* poderiam ser atribuídos, pelo menos em parte, a essas enzimas.

Um alvo potencial para proteinases e quitinases é a membrana peritrófica, que é constituída de proteínas e quitina. Essa membrana age como a primeira linha de defesa dos

insetos, protegendo-os contra toxinas e patógenos (BARBEHENN, 2001). Além disso, ela auxilia na digestão e protege o epitélio intestinal de partículas abrasivas da dieta. Devido a sua importância na defesa e na digestão, sua destruição é muitas vezes deletéria, se não letal, para os insetos que a possuem (WANG; GRANADOS, 2001).

Há vários relatos na literatura de ação antifúngica desencadeada por atividade quitinolítica (LAWRENCE *et al.*, 1996). Estas enzimas são abundantes nas folhas que são particularmente suscetíveis ao ataque de fungos (RAKWAL *et al.*, 2004). Recentemente foi demonstrado que as proteínas do látex de *Cryptostegia grandiflora*, bem como de *C. procera*, têm a capacidade de inibir o crescimento de fungos filamentosos (dados não publicados).

Recentemente, efeitos tóxicos e prejudiciais das proteínas do látex de *C. procera* sobre importantes pragas agrícolas foram notificados (RAMOS *et al.* 2007). RAMOS e colaboradores (2008) também abordaram de forma mais detalhada a ação dessas proteínas sobre o desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus*. O látex de *P. rubra* foi avaliado de maneira similar, onde o efeito da fração PLPr sobre o desenvolvimento das larvas deste bruquídeo foi analisado.

Como resultado foi visto que apenas 0,4 % das proteínas do látex adicionadas na dieta foram necessárias para diminuir em 50 % a sobrevivência das larvas. A fração PLPr a 0,1 % diminuiu drasticamente o ganho de massa larval. Resultados semelhantes foram encontrados para o látex de *C. procera*, onde o mesmo efeito deletério foi alcançado na mesma concentração. Para fins de comparação, o látex de *M. galziovii* reduziu a massa larval de *C. maculatus* em 50 % na concentração 0,7 % (PEREIRA *et al.*, 1999), enquanto que o látex de *P. rubra* a reduziu em uma concentração sete vezes menor.

Quando essas proteínas foram incubadas com os extratos intestinais das larvas desse inseto, os resultados mostraram que as proteínas do látex foram resistentes à proteólise frente às proteases da larva, podendo sugerir que, estas proteínas, ao resistirem à proteólise poderiam agir livremente sobre o intestino dessas larvas e serem responsáveis pelo efeito deletério observado, ou pelo menos em parte. Fatos semelhantes foram reportados por MOHAN *et al.*, 2006; KONNO *et al.*, 2004 e MOUSSAOUI *et al.*, 2001.

Ao contrário do observado para as larvas de *C. maculatus*, as proteínas do látex não apresentaram efeitos deletérios sobre as larvas de *Ceratitis capitata*. Assim como as proteinases cisteínicas, as quitinases presentes nas proteínas do látex poderiam ter sido degradadas pelas proteinases das larvas da mosca, dessa forma não podendo causar efeitos.

Nesse trabalho foi demonstrado pela primeira vez que fluidos laticíferos apresentam uma ação dissuasiva da ovoposição de bruquídeos, do tipo repelente. Na realidade, o único relato deste tipo de atividade descrita em látex encontrado na literatura direcionou-se ao mosquito *Aedes aegypti* (SINGHI *et al.* 2004).

Os experimentos de repelência realizados com o látex *P. rubra* também foram estendidos para o látex de *C. procera*, *C. grandiflora* e *H. drasticus* (RAMOS *et al.*, 2009 - dados submetidos). Os látex destas três plantas também apresentaram atividade repelente.

Recentemente, SADEGHI e colaboradores (2006) relataram uma atividade dissuasiva sobre a ovoposição do caruncho do feijão-de-corda por lectinas de plantas. Mostrou-se que esta atividade estava associada à atividade de ligação a carboidratos, atividade lectínica.

Esta hipótese foi totalmente descartada para a ação dissuasiva encontrada no látex de *P. rubra*, visto que atividade lectínica não foi encontrada nesse fluido. Na verdade, ainda não foi encontrado que proteínas laticíferas aglutinam eritrócitos de coelhos ou interagem com resinas à base de carboidratos utilizadas para a purificação de lectinas. Além do mais, os resultados encontrados neste estudo sugerem que a atividade repelente não é desempenhada pela fração protéica do látex, nem para *P. rubra* e nem para *C. procera*, *C. grandiflora* e *H. drasticus* (RAMOS *et al.*, 2009 - dados submetidos).

O fato de as proteínas não serem as responsáveis pelo efeito repelente observado levantou a hipótese de que compostos voláteis poderiam estar envolvidos nessa ação. Porém, o fato de o látex manter seu efeito dissuasivo mesmo após o longo tempo de armazenamento ou após ser mantido sob agitação não deu evidências sólidas para segurar essa hipótese. Outros experimentos serão necessários para esclarecer este ponto.

Apesar desta incerteza, uma vasta literatura aponta para a existência de metabólitos secundários que apresentam algum tipo de ação sobre insetos. Foi mostrado que flavonóides obtidos de *C. procera* controlaram a proliferação de *C. chinensis* criados em sementes de *Vigna radiata* (SALUNKE *et al.* 2005). Os efeitos tóxicos incluíram redução na ovoposição, efeito ovicida e alteração do número e da massa dos adultos. Recentemente, foi demonstrado que 2-tridecanona produziu efeitos deletérios sobre *C. maculatus* quando sementes de *V. unguiculata* foram pré-tratadas com diferentes doses deste monoterpene (BRAGA *et al.* 2007). O vapor de 2-tridecanona provocou redução no número de ovos, no percentual de eclosão e no número de adultos emergidos em sementes infestadas. O efeito inseticida do 2-tridecanona foi relatado ser devido à sua atividade ovicida. Este efeito foi completamente

descartado no presente estudo, pois ovos e larvas em desenvolvimento não foram afetados pelo látex.

Outros possíveis metabólitos de fluidos laticíferos candidatos a exibirem repelência incluem muitos outros alcalóides e glicosídeos fenólicos que foram descritos em látex e foram recentemente revisados por HAGEL e colaboradores (2008). Contudo, a atividade repelente aqui reportada não foi encontrada na fração que provavelmente comporta os metabólitos secundários.

O fato de haver uma diminuição da ovoposição imposta pelo fluido laticífero sem qualquer efeito deletério observados sobre ovos e larvas sugere que este efeito seja realmente do tipo repelente.

Enfim, estas observações destacam o papel multi-defensivo do látex nas plantas. A identificação mais detalhada das moléculas envolvidas nas diferentes atividades detectadas neste fluido laticífero certamente irá estabelecer o significado biológico destes fluidos no vegetal.

Em conclusão, este estudo sugere que os fluidos laticíferos sintetizam e armazenam substâncias que, uma vez liberados podem agir como repelentes e prejudicar a aproximação dos insetos, e esta atividade seria somada a outras estratégias defensivas dos laticíferos de plantas já relatadas serem expressas nesses fluidos.

VI - CONCLUSÃO

A caracterização bioquímica e enzimática parcial do látex de *Plumeria rubra* mostrou que esse fluido é uma boa fonte de proteínas com diversificadas atividades enzimáticas. Algumas dessas enzimas têm ações que podem estar relacionadas com o papel de defesa da planta, como as enzimas antioxidantes e proteolíticas detectadas. No entanto, essa hipótese ainda necessita de investigação experimental.

Um forte efeito deletério para larvas de *C. maculatus* foi observado na fração protéica do látex, dando indícios de que proteínas poderiam estar envolvidas nesta ação. Estudos posteriores merecem ser realizados a fim de tentar se estabelecer uma correlação entre o efeito observado e as proteínas encontradas no látex, pois, foi visto que as proteínas do látex podem não ser passíveis de digestão pelas proteases das larvas.

Além disso, uma interessante atividade repelente da ovoposição de bruquídeos foi encontrada no látex íntegro de *P. rubra*, e essa repelência pode permanecer ativa por mais de 30 dias, podendo proteger as sementes contra a ovoposição dos insetos por um razoável período de tempo. Contudo, nenhuma conclusão acerca da identidade do composto responsável pela repelência pode ser tomada sem que estudos mais aprofundados sejam realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, J. I.; SIDENIUS, U.; SVENSSON, B. Arginine is essential for the amilase inhibitory activity of the amilase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. **Biochemical Journal**, **293**:151-155, 1993.

ABRAHAM, K. I.; JOSHI, P. N. Studies on proteinases from *Calotropis gigantean* latex. Purification and some properties of two proteinases containing carbohydrates. **Biochim Biophys Acta**, **568**:111-119, 1979.

ARCHER, B. L. An alkaline protease inhibitor from *Hevea brasiliensis* latex. **Phytochemistry**, **23**:633-639, 1983.

ARREGUIM, B.; LARA, P.; RODRIGUEZ, R. Comparative study of eletrophoretic patterns of latex proteins from clones of *Hevea brasiliensis*. **Electrophoresis**, **9**:323-326, 1988.

AZRAKAN, M.; MOUSSAOUI, A.; WUYTSWINKEL, D.; DEHOL, G.; LOOZE, Y. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of *Carica papaya*. **Journal of Chromatography**, **790**:229-238, 2003.

BABU, R. M.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M. S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in insect management - an overview. **Crop Prot**, **22**:1071-1086, 2003.

BARBEHENN, R. V. Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. **Archiv Insect Biochem and Physiol**, **47**:86-99, 2001.

BEERS, J. R.; SIZER, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by Catalase. **J Biol Chem**, **195**:133-140, 1952.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, **72**:248-254, 1976.

BRAGA, Y. F.; GRANGEIRO, T. B.; FREIRE, E. A.; LOPES, H. L.; BEZERRA, J. N.; ANDRADE-NETO, M.; LIMA, M. A. Insecticidal activity of 2-tridecanone against the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **An Acad Bras Cienc**, **79**:35-39, 2007.

BROCKBANK, W. J.; LYNN, K. R. Purification and preliminary characterization of two asclepains from the latex of *Asclepias syriaca* L. (milkweed). **Biochim Biophys Acta**, **578**:13-22, 1979.

BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Annu Rev Biochem**, **59**:873-907, 1990.

BROWN, S. H. Tropical flowering tree list. Disponível em: <<http://lee.ifas.ufl.edu/Hort/GardenPubsAZ/FactSheet/PlumeriaRubraFrangipani.pdf>> Acesso em: 25/11/2008.

CAMBON, E.; GOUZOU, F.; PINA, M.; BAREA, B.; BAROUH, N.; LAGO, R.; RUALES, J.; TSAI, S.; VILLENEUVE, P. Comparison of the lipase activity in hydrolysis and acyl transfer reactions of two latex plant extracts from Babaco (*Vasconcellea X Heilbornii* Cv.) and *Plumeria rubra*: Effect of the aqueous microenvironment. **J Agric Food Chem**, **54**:2726-2731, 2006.

CARUSO, C.; CHILOSI, G.; LEONARDI, L.; BERTINI, L.; MAGRO, P.; BUONOCORE, V.; CAPORALE, C. A basic peroxidase from wheat kernel with antifungal activity. **Phytochemistry**, **58**:743-750, 2001.

CHESIN, M.; ZIPF, A. E. Alarm systems in higher plants. **The Botanical Review**, **56**:193-235, 1990.

CHRISPEELS, M. J.; GROSSI-de-SÁ, M. F.; HIGGINS, T. J. V. Genetic engineering with alpha-amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. **Seed Sci Res** **8**:257-263, 1998.

CHEYE, M. L.; CHEUNG, K. Y. Beta-1,3-glucanase is highly-expressed in laticifers of *Hevea brasiliensis*. **Plant Mol Biol** **29**:397-402, 1995.

CORNISH, K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species. **Phytochemistry**, **57**:1123-1134, 2001.

COUTINHO, M. V.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; GROSSI-de-SÁ, M. F. As pragas que atacam o feijão armazenado e os possíveis fatores protéicos envolvidos em sua resistência. Brasília: **Embrapa Recurso Genético e Biotecnologia, Circular Técnica**, 6:66p, 2000.

DEAN, R. & KUC, J. Induction systemic protection in concuber. The source of the signal. **Physiol and Mol Plant Pathology**, 28:227-233, 1986.

DECKER, G.; WANNER, G.; ZENK, M. H.; LOTTSPREICH, F. Characterization of proteins in latex of the opium poppy (*Papaver somniferum*) using two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. **Electroforesis**, 21:3500-3516, 2000.

DELTA UNIVERSAL. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Delta. 1394p, 1982.

DOBIE, P.; DENDY, J.; SHERMAN, C.; PADGHAM, J.; WOOD, A.; GATEHOUSE A. M. R. New sources of resistance to *Acanthosceildes obtectus* (Say) and *Zabrotes subfasciatus* Boheman (Coleoptera: Bruchidae) in mature seeds of five species of *Phaseolus*. **J Stored Prod Res**, 26:177-186, 1990.

DOMSALLA, A.; MELZING, M. F. Occurrence and properties of proteases in plant latices. **Planta Medica**, 74:699-711, 2008.

DONGRE, T. K.; PAWAR, S. E.; THAKARE, R. G. Identification of resistant sources to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) in *Vigna* spp. and inheritance of their resistance in black gram. **J Stored Prod Res**, 32:201-204, 1996.

DON-PEDRO, N. K. Mode of action of fixed oils against eggs of *Callosobruchus maculatus* (F.). Lanham: **Pesticide Science**, 26(2):107-116, 1989.

DUBEY, V. K.; JAGANNADHAM, M. V. Procerain, a stable cysteine protease from the latex of *Calotropis procera*. **Phytochemistry**, 62:1057-1071, 2002.

ELDEN, T. C. Influence of a cysteine proteinases inhibitos on alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidade) growth and development over successive generations. **J Entomol Sci**, 35:70-76, 2000.

FARREL, B. D.; DUSSOURD, D.E.; MITTER, C. Escalation of plant defense: do latex and resin canals spur plant diversification? **The American Naturalist**, 138 (4): 881-900, 1991.

FENG, G. H.; RICHARDSON, M.; CHEN, M. S.; KRAMER, K. J.; MORGAN, T. D.; REECK, G. R. Amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and pates of inhibition of insect and human amylases. **Insect Biochem Mol Biol**, **26**:419-426, 1996.

FERRE, J.; VAN RIE. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, **47**:501-533, 2002.

FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-Caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Recurso Genético e Biotecnologia, 2005.

FREITAS, C. D. T.; SOUZA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; CAVALHEIRO, M. G.; OLIVEIRA, L. S.; RAMOS, M. V. Enzymatic anti-oxidative and proteolytic activities in laticifers of *Cryptostegia grandiflora*, *Plumeria rubra* and *Euphorbia tirucalli*. **Protoplasma**, (submitted), 2009.

FREITAS, C. D. T.; OLIVEIRA, J. S.; MIRANDA, M. R. A.; MACEDO, N. M. R.; SALES M. P.; VILLAS-BOAS, L. A.; RAMOS, M. V. Enzymatic activities and protein profile of latex from *Calotropis procera*. **Plant Physiol Biochem**, **45**:781-789, 2007.

GALLO, D. **Manual de entomologia agrícola**. São Paulo: Agronômica Ceres, 649p, 1988.

GARCIA-MAROTO, F.; CARBONERO, P.; GARCIA-OLMEDO, F. Site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli* of WMAI-1, a wheat monomeric inhibitor of insect alpha amylase. **Plant Molecular Biology**, **17**:1005-1011, 1991.

GARCIA-OLMEDO, F.; SALCEDO, G.; SANCHEZ-MONGE, R.; GOMEZ, L.; ROYO, J.; CARBONEIRO, P. Plant proteinaceous inhibitor of proteinases and amilases. **Oxford Surv Plant Mol Cell Biol**, **4**:275-334, 1987.

GATEHOUSE, A. M. R.; HILDER, V. A.; BOULTIER, D. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. **Biotechnology in Agriculture**, **7**:155-181, 1992.

GATEHOUSE, A. M. R.; POWELL, K. S.; VAN DAMME, E. J. M.; GATEHOUSE, J. Insecticidal properties of plants lectins: their potential in plant protection *In*: PUTSZTAI, A.; BARDOCZ, S. **Lectins, biomedical perspectives**. London: Taylor & Francis Ltda Publishers, p. 35-57, 1995.

GHEE, T.; TAN, J. M.; PEZZUTO, A.; KINGHORN, D. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV- 1) reverse transcriptase 1. **Journal of Natural Products**, **54(1)**:143-154, 1991.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIEIS, S. K. Superoxides dismutases I: occurrences in higher plants. **Plant Physiol**, **59**:309-314, 1977.

GIORDANI, R.; LAFON, L. Action of *Carica papaya* latex on cell wall glycosidases from *Lactuca sativa*. **Phytochemistry**, **34**:1473-1475, 1993.

GLAZER, A. N.; SMITH, E. L. Papain and other plant sulfhydryl proteolytic enzymes. *In*: Boyer, P.D. **The enzymes**. New York: Academic Press, p. 501-546, 1971.

GOMES, V. M.; MOSQUEDA, M. I.; BLANCO-LABRA, A.; SALES, M. P.; FERNANDES, K. V. S.; CORDEIRO, R. A.; XAVIER-FILHO, J. Vicilin storage proteins from *Vigna unguiculata* (legume) seeds inhibit fungal growth. **J Agric Food Chem**, **45**:4110-4115, 1997.

GOTTSTEIN, H. D.; KUC, J. Induction of systemic resistance in cucumber by phosphates. **Phytopathology**, **79**:143-154, 1989.

GUTIERREZ, B. A.; SCHOONHOVEN, A. **Proteja su cosecha de frijol contra el ataque de los gorgojos**. Palmira: Instituto Colombiano Agropecuario, 66, 12p, 1981. Boletim divulgado.

GUZMÀN-MALDONADO, S. H.; MARÍNJARILLO, A.; CASTELLANOS, J. Z.; HAMMERSCHMIDT, R.; SCHULTZ, J. C. Multiple defenses and signals in plant defense against pathogens and herbivores. **Rec Adv Phytochem**, **30**:121-154, 1996.

HAGEL, J. M.; YEUNG, E. C.; FACCHINI, P. J. Got milk? The secret life of laticifers. **Trends in Plant Sci**, **13**:631-639, 2008.

HALL, J. S.; HARMAN, G. E. Efficacy of oil treatments of legume seeds for control of *Aspergillus* and *Zabrotes*. Oxford: **Crop Protection**, **10**:315-319, 1991.

HALL, A. E.; SINGH, B. B.; EHLERS, J. D. Cowpea breeding. **Plant Breeding Reviews**, **15**:215-274, 1997.

HUESING, J. E.; MURDOCK, L. L.; SHADE, R. E. Rice and stinging nettle lectins - insecticidal activity similar to wheat-germagglutinin. **Phytochemistry**, **30**:3565-3569, 1991.

IBRAF (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS). Estatísticas. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br/x-es/f-esta.html>> Acesso em: 08/12/2008.

ISHIMOTO, M.; CHRISPEELS, M. J. Protective mechanism of the mexican bean weevil against high levels of amylase inhibitor in the common bean. **Plant phisiol**, **111**:393-401, 1996.

ISHIMOTO, M.; SATO, T.; CHRISPEELS, M. J.; KITAMURA, K. Bruchid resistance of transgenic azuk bean expressing seed amylase inhibitor of common bean. **Entomologica experimentallis et applicata**, **79**:309-315, 1996.

JACQUET, A.; KLEINSCHMIDT, T.; SCHNER, A. G.; LOOZE, Y.; BRAUNITZER, G. The thiol proteinases from the latex of *Carica papaya* L. III: the primary structure of chymopapain. **Biol Chem**, **370(5)**:450-434, 1989.

JACH, G.; GORNHARDT, B.; MUNDY, J.; LOGERMANN, J.; PINSDORF, E.; LEAH, R.; SCHELL, J.; MAAS, C. Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. **The Plant Journal**, **8**:97-109, 1995.

JEKEL, P. A.; HARTMANN, B. H.; BEINTEMA, J. J. The primary structure of hevamine, an enzyme with lysozyme/chitinase activity from *Hevea brasiliensis* latex. **Eur J Biochem**, **200**:123-130, 1991.

JOHN, K. S.; BHAT, S. G.; RAO PRASADA, U. J. S. Biochemical characterization of sap (latex) of a few Indian mango varieties. **Phytochemistry**, **62**:13-19, 2003.

JOHRI, S.; JAMWAL, U.; RASOOL, S.; KUMAR, A.; VERMA, V.; QAZI, G. N. Purification and characterization of peroxidases from *Withania somnifera* (AGB 002) and their ability to oxidize IAA. **Plant Science**, **169**:1014-1021, 2005.

KARNODO, L. B. S.; TSAURI, S.; PADMAWINATA, K.; PEZZUTO, J. M.; KSINGHORN, D. Cytotoxic constituents of the bark of *Plumeria rubra* collected in Indonesia. **Journal of Natural Products**, **53(6)**:1447-1455, 1990.

KEKWICK, R. G. O. **Latex and laticifers**. Encyclopedia of Life Science, Nature Publishing Group, p. 1-6, 2001.

KOGAN, M. **Natural chemicals in plant resistance to insects**. Iowa: Sts Res, 60, 1986.

KONNO, K.; HIRAYAMA, C.; NAKAMURA, M.; TATEISHI, K.; TAMURA, Y.; HATTORI, M.; KOHNO, K. Papain protects papaya trees from herbivorous insects: role of cysteine proteases in latex. **Plant J**, **37**:370-378, 2004.
KRUSH, G. S. Green revolution preparing for the 21 st century. **Genome**, **42**:646-655, 1999.

KUC, J.; HAMMERSCHMIDT. Induced resistance to disease in plants. **Development in Plant Pathology**, **4**, 1995.

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

LAWRENCE, C. B.; JOOSTEN, M. H. A. J.; TUZUN, S. Differential induction of pathogenesis-related proteins in tomato by *Alternaria solani* and the association of a basic chitinase isozyme with resistance. **Physiol Mol Plant Pathol**, **48**:361-377, 1996.

LE BERRE-ANTON, V.; NAHOUM, V.; PAYAN F.; ROUGÉ, P. Molecular basis for the specific binding of different amilase inhibitors from *Phaseolus vulgaris* seeds to the active site of amilase. **Plant Physiol Biochem**, **38**:657-665, 2000.

LEMOS, F. J. A.; CAMPOS, F. A. P.; SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Entomol Exp Appl** **56**:219-227, 1990.

LIN, Y. H.; LU, C. L. Latex trypsin inhibitors of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.). **Bot Bull Acad Sin** **35**:153-159, 1994.

LIQUIDO, N. J.; SHINODA, L. A.; CUNNINGHAM, R. T. **Host plants of the Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae):** an annotated world review. Lanham, MD: Miscellaneous Publication, 77, Entomological Society of America, 1991.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. **Plantas ornamentais no Brasil:** arbustivas, herbáceas e trepadeiras. 2. ed. São Paulo: Instituto Planatarum, 250p, 1999.

LORINI, L. **Manual para o manejo integrado de pragas de grãos armazenados.** Embrapa Trigo, 80p, 2001.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Hevamins: serine-centred proteases from the latex of *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, **25(10)**: 2279-2282, 1986.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Acid phosphatases from latices of Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, **26**:655-657, 1987a.

LYNN, K. R.; CLEVETTE-RADFORD, N. A. Biochemical properties of latices from the Euphorbiaceae. **Phytochemistry**, **26**: 939-944, 1987b.

MACEDO, M. L. R.; SÁ, C. M.; FREIRE, M. G. M.; PARRA, J. R. P. A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. **J Agric Food Chem**, **52(9)**:2533-2540, 2004.

MACEDO, M. L. R.; FERNANDES, K. V. S.; SALES, M. P.; XAVIER-FILHO, J. Vicilins variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). **Comp Biochem Physiol**, **105**:89-94, 1993.

MALAVASI, A.; ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil: Conhecimento básico e aplicado**. Ribeirão Preto: Holos, 327p, 1999.

MATIOLI, J. C. Moscas das frutas, situação e perspectivas de controle no Brasil. São Paulo: **Defesa Vegetal & Animal**, **27**:19-26, 1985.

MCKEE, R. A.; SMITH, H. Purification of proteases from *Carica papaya*. **Phytochemistry**, **25(10)**:2283-2287, 1986.

MEIK, J.; DOBIE, P. The ability of *Zabrotes subfasciatus* to attack cowpeas. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, **42**:151-158, 1986.

MELO, F. R.; SALES, M. P.; PEREIRA, L. S.; BLOCH JR, C.; FRANCO, O. L.; ARY, M. B. Alpha amylase inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Protein and Peptide Letters**, **6(6)**:385-390, 1999.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci**, **7**:405-410, 2002.

MOHAN, S.; MA, P. W. K.; PECHAN, T.; BASSFORD, E. R.; WILLIMS, W. P.; LUTHE, D. S. Degradation of the *Spodoptera frugiperda* peritrophic matrix by an inducible maize cysteine protease. **J Insect Physiol**, **52**:21-28, 2006.

MORCELLE, S. R.; CAFFINI, N. O.; PRIOLO, N. Proteolytic properties of *Funastrum clausum* latex. **Fitoterapia**, **75**:480-493, 2004.

MOREIRA, R. A.; PERRONE, J. C. Purification and partial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, **59(5)**: 783-787, 1977.

MOURSY, L. E. Insecticidal activity of *Calotropis procera* extracts of the flesh fly, *Sarcophaga hemorrhoidalis* fallen. **J Egypt Soc Parasitol**, **27(2)**:505-514, 1997.

MOUSSAOUI, A. E. L.; NIJS, M.; PAUL, C.; WINTJENS, R.; VINCENTELLI, J.; AZARKAN, M.; LOOZE, Y. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defense mechanism. **Cell Mol Life Sci**, **58**:556-570, 2001.

MOUTIM, V.; SILVA, L. G.; LOPES, M. T. P.; FERNANDES, W. G.; SALAS, C. E. Spontaneous processing of peptides during coagulation of latex from *Carica papaya*. **Plant Science**, **142**:115-121, 1999.

MURA, A.; PINTUS, F.; LAI, P.; PADIGLIA, A.; BELLELLI, A.; FLORIS, G.; MEDDA, R. Catalytic pathways of *Euphorbia characias* peroxidase reacting with hydrogen peroxide. **Biol Chem**, **387(5)**:559-67, 2006.

MUSSER, F. R.; SHELTON, A. M. Bt sweet corn and selective insecticides: impacts on pest and predators. **Journal of Economic Entomology**, **96**:71-80, 2003.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidases in spinach chloroplasts. **Plant Cell Physiol**, **22**:867-880, 1981.

NUNEZ-BUENO, L. La mosca dei mediterrâneo. Bogotá: **ICA Informa**, **21(1)**:9-17, 1987.

OERKE, E. C.; DEHNE, H. W.; SCHONBECK, F.; WEBER, A. **Crop production and crop protection**: estimated losses in major food and cash crops. Amsterdam: Elsevier Science, 1994.

OLIVEIRA, J. V.; VENDRAMIM, J. D. Repelência de óleos essenciais e pós vegetais sobre adultos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleóptera: Bruchidae) em sementes de feijoeiro. *In*: **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, **29**:549-555, 1999.

PADIL, F. Pests and diseases images library. Disponível em: <http://flyaqis.mov.vic.gov.au/padil/Z_subfasciatus_dorsfull.htm> Acesso em: 01/02/2009.

PAES, N. S.; GERHARDT, I. R.; COUTINHO, M. V.; YOKOYAMA, M.; SANTANA, E.; HARRIS, N.; CHRISPPEELS, M. J.; GROSSI-de-SÁ, M. F. The effect of arcelin-1 on the

structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. **J Insect Physiol**, **46**:393-402, 2000.

PEREIRA, L. S.; GOMES, M. V.; FERNANDES, K. V. S.; SALES, M. P.; XAVIER-FILHO, J. Insecticidal and antifungic proteins of the latex from *Manihot glaziovii* Muell. **Bras Bot**, **22**(1):1-8, 1999.

PICKARD, W. F. Laticifers and secretory ducts: two other tube systems in plants. **New Phytol**, **177**:877-888, 2008.

POSCH, A.; CHEN, Z.; WHEELER, C.; DUNN, M. J.; RAULF-HEIMSOTH, M.; BAUR, X. Characterization and identification of latex allergens by two-dimensional electrophoresis and protein microsequencing. **J Allergy Clin Immunol**, **99**:385-395, 1996.

RAKWAL, R.; YANG, G.; KOMATSU, S. Chitinase induced by jasmonic acid, methyl jasmonate, ethylene and protein phosphatase inhibitors in rice. **Mol Biol Reports**, **31**:113-119, 2004.

RAMOS, M. V., MOREIRA, R. A., CAVADA, B. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; ROUGÉ, P. Interaction of the lectins from sub-tribe Diocleinae with specific ligands. **Rev Bras Fisiol Veg**, **8**: 193-199, 1996.

RAMOS, M. V.; ARAÚJO, E. S.; OLIVEIRA, R. S. B.; TEIXEIRA, F. M.; CAVALHEIRO, M. G.; SOUZA, D. P.; OLIVEIRA, J. S.; FREITAS, C. D. T. Defensive role of latex in plants involves repellent-like activity on insects. **Chemical Ecology**, (submitted), 2009.

RAMOS, M. V.; GRANGEIRO, T. B.; FREIRE, E. A.; SALES, M. P.; SOUSA, D. P.; ARAÚJO, E. S.; FREITAS, C. D. T. The defensive role of latex in plants: detrimental effects to insects. **Plant Science** (submitted), 2008.

RAMOS, M. V.; FREITAS, C. D. T.; STANISÇUASKI, F.; MACEDO, L. L. P.; SALES, M. P.; SOUZA, D. P.; CARLINI, C. R. Performance of distinct crop pests reared on diets enriched with latex proteins from *Calotropis procera*: role of laticifer proteins in plant defense. **Plant Science**, **173**:349-357, 2007.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annu Rev Phytopathol**, **28**:425-429, 1990.

RUDALL, P. J. Laticifers in Euphorbiaceae: a conspectus. **Botanical Journal of the Linnean Society**, **94**:143-163, 1987.

SADEGHI, A.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; SMAGGHE, G. Deterrent effect of plant lectins on cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (F.) oviposition. **Phytochemistry**, **67**:2078-2084, 2006.

SALUNKE, B. K.; KOTKAR, H. M.; MENDKI, P. S.; UPASANI, S. M.; MAHESHWARI, V. L. Efficacy of flavanoids in controlling *Callosobruchus chinensis* (L.) (Coleoptera:Bruchidae), a post-harvest pest of grain legumes. **Crop Protection**, **24**:888-893, 2005.

SELA-BUURLAGE, M. B.; PONSTEI, A. S.; BRESS-VLOEMANS, J. A.; MELCHERS, L. S.; CORNELISEN, B. J. C. Only specific tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinase and B-1,3-glucanase exhibit antifungal activity. **Plant Physiol**, **101**:57-863, 1993.

SINGHI, M.; JOSHI, V.; SHARMA, R. C.; SHARMA, K. Oviposition behaviour of *Aedes aegypti* in different concentrations of latex of *Calotropis procera*: studies on refractory behaviour and its sustenance across gonotrophic cycles. **Dengue Bulletin**, **28**:184-188, 2004.

SRITANYARAT, W.; PEARCE, G.; SIEMS, W. F.; RYAN, C. A.; WITITSUWANNAKUL, R.; WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of iso inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber tree, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, **67**:1644-1650, 2006.

STEVENS, P. F. 2001. Angiosperm phylogeny website. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>> Acesso em: 01/02/2009

SUSSMAN, G. L.; BEEZHOLDB, D. H.; LISSC, G. Latex allergy: historical perspective. **Methods**, **27**:(1), 3-9, 2002.

SVALHEIM, O.; ROBERTSEN, B. Induction of peroxidases in cucumber hypocotyls by wounding and fungal infection. **Physiologia Plantarum**, **78**:261-267, 2006.

TANZUBIL, P. B. Control of some insect pests of cowpea (*Vigna unguiculata*) with neem (*Azadirachta indica*) in Northern Ghana. **Tropical Pest Management**, **37**:216-217, 1991.

TAIRA, T.; OHDOMARI, A.; NAKAMA, N.; SHIMOJI, M.; ISHIHARA, M. Characterization and antifungal activity of Gazyumaru (*Ficus microcarpa*) latex chitinases: both the chitin-binding and the antifungal activities of class I chitinases are reinforced with increasing ionic strength. **Biosci Biotechnol Biochem**, **69**:811-818, 2005.

TELLAM, R. L.; WIJFFELS, G.; WILLADESEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochem Mol Biol**, **29**:87-101, 1999.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu Rev Phytopathol**, **44**:135-62, 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiol Mol Plant Pathol**, **55**:85-97, 1999.

VAN DER HOORN, R. A. L.; JONES, J. D. G. The plant proteolytic machinery and its role in defense. **Curr Opin Plant Biol**, **7**:400-407, 2004.

WANG, P.; GRANADOS, R. R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. **Archiv Insect Biochem Physiol**, **47**:110-118, 2001.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F. A. P. Proteinase inhibitors. *In*: CHEEK, P.R. **Toxicants of plant origin**. Boca Raton : CRC Press, 1989. v.3: p.1-27.

XAVIER-FILHO, J. **Sementes e suas defesas contra insetos**. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos. Organização dos Estados Americanos-OEA, p. 1-31, 1993.

YEANG, H. Y.; ARIF, S. A. M.; YUSOF, F.; SUNDERASAN, E. Allergenic proteins of natural rubber latex. **Methods**, **27**:32-45, 2002.