

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

**Proteínas do Látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. e
Seus Efeitos Sobre Pragas Agrícolas**

CLEVERSON DINIZ TEIXEIRA DE FREITAS

FORTALEZA-CE

2006

**Proteínas do Látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. e
Seus Efeitos Sobre Pragas Agrícolas.**

CLEVERSON DINIZ TEIXEIRA DE FREITAS

**Dissertação submetida à Coordenação do Programa de pós-graduação em
Bioquímica Vegetal da Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.**

Orientador: Prof. Dr. Márcio Viana Ramos

FORTALEZA-CE

2006

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 disponível 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.

Cleverson Diniz Teixeira de Freitas

Dissertação aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Maurício Pereira Sales
Deptº de Química - UFRN
Examinador

Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Deptº de Biologia -UFC
Examinador

“É melhor tentar e falhar,
Que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda em vão,
Que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
Que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
Que em conformidade viver”.

Martin Luther King

Dedico este trabalho aos
meus pais que não mediram
esforços para ajudar
em minha formação.

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado com o suporte das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará, através do Laboratório de Bioquímica e Biologia de Proteínas Vegetais do Professor 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 do Professor Maurício Pereira Sales do Departamento de Química.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, através do laboratório de Proteínas Tóxicas coordenado pela professora Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), MCT/PADCT, International Foundation for Science (IFS) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Ceará (FUNCAP).

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Márcio Viana Ramos por ter me acolhido em seu laboratório por todos esses anos. Por toda atenção dispensada, pelo interesse e competência na orientação de parte do trabalho experimental. Agradeço ainda sua paciência frente as minhas dificuldades e por disponibilizar todos os meios possíveis para o bom desenvolvimento de meu trabalho.

À professora Ana Lúcia Freitas, chefe do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará. Pela oportunidade e compreensão.

Ao professor Maurício Pereira Sales por ter me acolhido em seu laboratório e pela execução e orientação das atividades enzimáticas e ensaios com o inseto *Ceratitidis capitata*. E aos seus estudantes de mestrado Fabiano e Leonardo.

À professora Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini (UFRS) por ter me acolhido em seu laboratório e à estudante de Doutorado Fernanda Stanisçuaski pela paciência e orientação nos experimentos com os insetos *Spodoptera frugiperda*, *Anticarsia gemmatalis* e *Dysdercus peruvianus*.

Ao professor Thalles Barbosa Grangeiro pelo fornecimento dos insetos *Callosobruchus maculatus* e por ter aceitado o convite em participar da banca examinadora dessa dissertação.

Ao Colega e estudante de doutorado Éder Freire pela paciência e ensinamento dos ensaios com os insetos *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*.

Ao professor José Tadeu Abreu de Oliveira pelo acolhimento em seu laboratório e aos estudantes de mestrado José Edvar Monteiro Júnior e de graduação Fredy Davi Albuquerque pela ajuda e paciência em alguns ensaios.

À todos os colegas que fazem parte do laboratório (Jefferson, Emanoella, Delano, Diego, Raquel, Lia, Nívea, Ana Alice) e do curso de pós-graduação em bioquímica pela cumplicidade e companheirismo do dia-a-dia.

A Deus, aos meus pais e irmãos e à Tatiana pelo apoio oferecido, essencial para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	15
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	16
RESUMO	17
ABSTRACT	18
I. INTRODUÇÃO	20
Os vegetais e suas defesas naturais	20
Enzimas proteolíticas	22
Inibidores de proteinases	23
Enzimas quitinases	24
Látex	25
Função Biológica dos Laticíferos	27
Composição bioquímica do látex	27
Descrição e Características da Planta <i>Calotropis procera</i> (Ait.) R. Br.	29
Insetos	31
<i>Callosobruchus maculatus</i> (F.) e <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Boh.)	31
<i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797)	32
<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hueb., 1918)	33
<i>Dysdercus peruvianus</i> (Guérin-Ménéville)	34
<i>Caratitis capitata</i> (Wiedeman, 1824)	34
Justificativa e objetivo do trabalho de pesquisa	36

II. MATERIAIS E METODOS	37
Reagentes	37
Material Biológico	38
Planta	38
Insetos	38
Coleta e Fracionamento do Látex	40
Dosagem de Proteínas	41
Eletroforese em gel de poliacrilamida	41
Ensaio de atividade enzimática endógena e de inibição nas proteínas do látex	43
Atividade α -amilase e inibição da α -amilase pancreática suína	43
Fracionamento em cromatografia em coluna de quitina	44
Determinação da atividade quitinolítica por fotolorimetria	45
Zimograma para detecção de atividade quitinolítica	46
Determinação da atividade proteolítica e inibição por E-64 e TPCK	47
Zimograma para detecção de atividade proteolítica	47
Inibição da atividade proteolítica do tipo cisteínica	48
Inibição da atividade proteolítica do tipo serínica	48
Bioensaios	49
Bioensaios com os insetos <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i>	49
Desenvolvimento larval e tempo de emergência	50
Avaliação do desenvolvimento do <i>Callosobruchus maculatus</i> quando alimentado por seis gerações seguidas com as proteínas do látex	50
Avaliação da ação inseticida das proteínas do látex desnaturadas ou	51

digeridas	
Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> das proteínas do látex frente às enzimas das larvas do <i>C. maculatus</i> e <i>Z. subfasciatus</i>	52
Bioensaio com <i>Dysdercus peruvianus</i>	53
Avaliação da digestibilidade <i>in vitro</i> das proteínas do látex frente às enzimas intestinais do <i>D. peruvianus</i>	54
Produção de anticorpos policlonais contra as proteínas do látex	55
Westen Blotting	56
Ensaio de Inibição da atividade proteolítica cisteínica do extrato total das larvas do <i>C. maculatus</i> e do extrato intestinal de ninfas no 4 ° estágio de <i>Dysdercus peruvianus</i> por proteínas do látex tratadas a 98 °C.	57
Bioensaio com <i>Ceratitis capitata</i>	57
Bioensaio com <i>Spodoptera frugiperda</i> e <i>Anticarsia gemmatilis</i>	58
Análise estatística	59
III. RESULTADOS	60
IV. DISCUSSÃO	87
V. CONCLUSÃO	95
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
1.	Aspecto geral da planta <i>Calotropis procera</i> .	31
2.	Aspecto geral dos insetos <i>Anticarsia gemmatilis</i> , <i>Spodoptera frugiperda</i> ; <i>Callosobruchus maculatus</i> , <i>Ceratitis capitata</i> ; <i>Dysdercus peruvianus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i> .	35
3.	Esquema de fracionamento do látex da planta <i>Calotropis procera</i> .	42
4.	Eletroforese em gel de poliacrilamida das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> .	61
5.	Eletroforese em gel de poliacrilamida e Zimograma para proteases cisteínicas das proteínas do látex.	63
6.	Perfil cromatográfico das proteínas do látex em coluna de quitina e eletroforese em gel de poliacrilamida das frações obtidos da cromatografia.	64
7.	Atividade quitinásica <i>in vitro</i> das proteínas do látex, proteínas do látex aquecidas a 98 C por 30 mim, sobrenadante e precipitado e Zimograma para quitinase	65
8.	Avaliação das proteínas do látex de <i>C. procera</i> na sobrevivência e na massa das larvas do <i>C. maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i>	67
9.	Avaliação das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> emergência e no tempo de desenvolvimento do inseto <i>Callosobruchus maculatus</i>	68
10.	Emergência e Tempo de desenvolvimento dos insetos <i>Callosobruchus</i>	72

	<i>maculatus</i> desenvolvidos em sementes contendo as proteínas do látex por 6 gerações seguidas	
11.	Avaliação das proteínas do látex de <i>C. procera</i> aquecidas por 30 min a 98 °C em banho-maria no desenvolvimento do <i>C. maculatus</i>	73
12.	Perfil cromatográfico em coluna de quitina das proteínas do látex aquecidas e sobrenadante	75
13.	Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% da hidrólise das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> sobre diferentes tempos com a protease de <i>Streptomyces griseus</i> .	76
14.	Avaliação dos picos obtidos após cromatografia em coluna de quitina com as proteínas do látex não aquecidas de <i>C. procera</i> no desenvolvimento do <i>C. maculatus</i> .	77
15.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) e Westen blotting das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> quando incubadas a 37 °C por diferentes tempos com o homogenato de larvas do inseto <i>Callosobruchus maculatus</i>	78
16.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (15 %) das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> quando incubadas a 37 °C por diferentes tempos com o homogenato de larvas do inseto <i>Zabrotes subfasciatus</i> .	79
17.	Avaliação das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> no desenvolvimento do inseto <i>Dysdercus peruvianus</i> .	80
18.	Avaliação das proteínas do látex de <i>C. procera</i> sobre a sobrevivência dos insetos adultos machos de <i>D. peruvianus</i>	81
19.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) e Westen blotting das proteínas do látex de <i>Calotropis procera</i> quando incubadas a 37 °C	82

por diferentes tempos com o homogenato intestinal de ninfas do 4º estágio de *D. peruvianus*.

20. Avaliação das proteínas do látex de *C. procera* no desenvolvimento do inseto *C. capitata*. 83
21. Avaliação das proteínas do látex de *C. procera* no desenvolvimento do inseto *Anticarsia gemmatalis*. 84
22. Avaliação das proteínas do látex de *C. procera* no desenvolvimento do inseto *Spodoptera frugiperda*. 85
23. Inibição da atividade cisteínica da papaína, do extrato das larvas do *C. maculatus* e do intestino de ninfas de *D. peruvianus* com a amostra sobrenadante em diferentes concentrações. 86
24. Lagarta de *Danaus plexippus* se alimentando de folhas de *Calotropis procera* 88

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
1.	Avaliação da atividade enzimática da fração protéica do látex de <i>C. procera</i> para diferentes substratos e na presença de inibidores.	62
2.	Avaliação das proteínas do látex de <i>C. procera</i> sobre o percentual de emergência e o tempo médio de desenvolvimento das gerações F ₁ e F ₂ do inseto <i>C. maculatus</i> .	71
3.	Massa dos insetos machos e fêmeas das gerações F ₁ e F ₂ do <i>C. maculatus</i> emergidos das sementes contendo as proteínas do látex de <i>C. procera</i> .	71

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

Abs 280	Absorbância a 280 nanômetros
BSA	Albumina Sérica Bovina
BANA	N-Benzoil-arginina-naftilamida
BAPNA	Benzoil Arginina Nitroanilida
BCIP	5- Bromo-4-Cloro-3-Indolilfosfato
DMAB	p-dimetilaminobenzaldeido
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra acético
EGTA	Éter Etilenoglicol-bis-aminoetil
E-64	Trans-Epoxisuccinil-Leucilamido-3-Metil-Butano
mg	Miligrama
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TCA	Ácido tricloro Acético
TPCK	N-Tosil-L-Fenilalanina Clorometil Cetona
Tris	Tris-hidroxiaminometano
UA	Unidade de Atividade
µg	Micrograma

RESUMO

Proteínas do Látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. e seus efeitos sobre pragas agrícolas.

A planta *Calotropis procera* pertencente à família Asclepiadaceae é encontrada em vasta extensão do Nordeste Brasileiro. É uma planta laticífera e sua produção endógena de látex é extraordinária. Embora haja na literatura científica diversas publicações que relatam o potencial medicinal de diversas partes da planta, principalmente de seu látex, não há ainda uma abordagem bioquímica e funcional de seu fluido laticífero. Esta pesquisa foi desenvolvida no sentido de proceder a um estudo bioquímico parcial de atividades endógenas da fração protéica majoritária do látex e de avaliar seus efeitos inseticidas sobre diferentes modelos de pragas agrícolas. A fração protéica majoritária do látex foi preparada a partir de um protocolo previamente desenvolvido no laboratório em que são envolvidas etapas de centrifugação e diálise. A fração protéica isenta de borracha e de moléculas de baixa massa molecular foi testada para atividades enzimáticas endógenas proteolíticas, quitinásicas e α -amilásica e atividades inibitórias para proteases e α -amilase. Ensaio enzimático de digestão das proteínas do látex por extratos digestivos de insetos foram também realizados. Bioensaios utilizando-se dietas artificiais contendo diferentes proporções das proteínas do látex íntegras, digeridas por pronase ou aquecidas a 98 °C foram realizados com seis insetos pertencentes a quatro ordens. Nos bioensaios foram avaliados parâmetros tais como desenvolvimento, sobrevivência, tempo de emergência dos indivíduos além de ser avaliado o efeito cumulativo de proteínas do látex na dieta por sucessivas gerações. Na fração protéica do látex foram encontradas atividades proteolíticas do tipo cisteínica e serínica, além de atividade quitinolítica. Não foi detectada atividade α -amilásica. Soluções de proteínas do látex não exibiram atividade inibitória do tipo α -amilásica e tripsínica ou quimiotripsínica. Após tratamento térmico, proteínas do látex ainda solúveis foram capazes de inibir a atividade da papaína. Posteriormente esta atividade inibitória foi capaz de inibir as atividades proteolíticas de *Callosobruchus maculatus* e *Dysdercus peruvianus*. As proteínas do látex foram inseticidas para *C. maculatus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Anticarsia gemmatalis* e *Ceratitidis capitata* enquanto que não foram para *Spodoptera frugiperda* e *D. peruvianus*. Não houve efeito deletério acumulativo em insetos submetidos a uma dieta contendo proteínas do látex durante seis gerações. Quando digeridas por pronase e aquecidas por 30 min a 98 °C, a ação inseticida das proteínas do látex ainda foi mantida sobre o *C. maculatus*. As proteínas do látex foram completamente resistentes à proteólise por enzimas digestivas de *Dysdercus peruvianus* e *Callosobruchus maculatus*. Entretanto, a ação proteolítica endógena do látex promoveu a proteólise do extrato enzimático de *C. maculatus* embora isto não tenha ocorrido no extrato intestinal de *D. peruvianus*. O látex de *C. procera* apresenta forte atividade proteolítica e resistência à proteólise por enzimas digestivas de insetos. Atividade quitinolítica foi também observada. O látex possui atividade inseticida para diferentes pragas agrícolas e esta atividade parece estar associada à presença de um inibidor de atividade proteolítica do tipo cisteínica, além da presença de quitinases e elevada atividade proteolítica endógena. Assim, a fração protéica do látex pode ser considerada como parte constituinte da defesa da planta contra insetos.

ABSTRACT

Proteins from the latex of *Calotropis procera* (Ait.) R.Br. and their effects against insects.

The plant *Calotropis procera* belonging to Asclepiadaceae is found around a vast extension of the Northeast from Brazil. It is a lactifers plant and its endogenous production of latex is admirable. Despite continuous reports appearing in the literature give mention to the medicinal properties of different parts of the plant, including the latex, there is not scientific approaches comprising biochemical of functional aspects of the latex from *C. procera*. The aims this work was determine the presence of endogenous enzymatic activities and inhibitory activity against different proteases and α -amylase, to evaluate insecticidal properties against different crop pests and to correlate enzymatic content and insecticidal action with possible role of the latex in protecting the plant to insect pathogens. The major soluble protein fraction from the latex was prepared following the protocol previously defined that includes centrifugations and dialysis steps. The protein fraction devoided of rubber and low molecular mass molecules was assayed to the presence of endogenous proteolytic activities as well as α -amylase activity. Even, the presence of inhibitor of such activities was investigated. Additionally the latex proteins were submitted to proteolysis by digestive content of different insects. Bioassays base on artificial diets with different contents of native, pronase digested or heated treated (98 °C) latex proteins were performed against six insects belonging to 4 different orders. Increment in bodyweight of larvae, time of development and percentage of survive were the parameters considered to analyze detrimental effects of latex proteins upon insects. The effect of latex proteins upon *Callosbruchus maculatus* insects by continuous exposure until F-6 generation was reached was performed. It was found strong endogenous proteolytic activity and latex proteins were resistant to proteolysis by insect digestive extracts. In addition chitinolytic activity was also detected. The latex exhibited insecticidal activity against different insect groups and this effect may be correlated to the presence of a cysteine protease inhibitor associated to its proteolytic properties and chitinolytic activity. It is suggested that the protein fraction of the latex from *Calotropis procera* plays a relevant role in defending the plant against pathogens.

F936p

Freitas, Cleverson Diniz Teixeira de

Proteínas do Látex de *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.
e Seus Efeitos Sobre Pragas Agrícolas/Cleverson
Diniz Teixeira de Freitas

104 f.il.color.enc

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará,
Fortaleza, 2006.

Orientador: Dr. Márcio Viana Ramos
Área de concentração: Bioquímica

1. Insetos 2. Látex 3. Proteases 4. Pragas agrícolas.

C.D.D. 574.192

I. INTRODUÇÃO

Os vegetais e suas defesas naturais

As plantas estão constantemente expostas a uma variedade de estresses ambientais. Considerando a desvantagem de estarem ancoradas no solo e de serem desprovidas de um sistema circulatório imune, as plantas têm desenvolvido várias estratégias sofisticadas de proteção contra patógenos e predadores, como bactérias, fungos, vírus, insetos e herbívoros, assim como contra estresses abióticos.

Os mecanismos naturais de proteção contra patógenos e predadores estão baseados em uma variedade de barreiras presentes no vegetal antes do ataque. Os efeitos combinados dessas barreiras são referidos como constitutivos. Além disso, os vegetais podem também ativar outros mecanismos após o contato com os invasores, denominados de induzidos ou adquiridos (Ebel & Coiso, 1994). Independente do tipo de resistência, induzida ou constitutiva, esses arsenais de defesa podem ser de caráter estrutural, quando agem como barreiras físicas impedindo ou inibindo o patógeno de penetrar e se espalhar nos tecidos vegetais, ou podem estar baseados em reações químicas, produzindo substâncias que matam ou inibem o crescimento do invasor (Agrios, 1988).

As reações de defesa induzida das plantas podem ser classificadas como diretas ou indiretas. Por exemplo, a reação de hipersensibilidade constitui um efetivo mecanismo de defesa. Nesse caso, uma rápida morte das células da planta no local de infecção restringe a colonização do patógeno. Esse sacrifício previne que o patógeno se espalhe pelos tecidos não infectados (Grant & Mansfield, 1999). Por analogia a apoptose em mamíferos, a reação de

hipersensibilidade é também uma forma de morte celular programada em plantas (Lam et. al., 1999). Outros exemplos de defesa direta incluem a produção de metabólitos secundários e proteínas de defesa (Bohlmann, 1994). Existem três classes principais de metabólitos secundários, os alcalóides, os terpenóides e os compostos fenólicos. Embora as funções biológicas dessas substâncias não sejam bem esclarecidas, acredita-se que uma delas seja a de dissuadir predadores e/ou competidores (Raven, 2001). Exemplos de tais compostos são a cafeína e a nicotina (alcalóides), glicosídeos cardioativos, borracha e óleos essenciais (terpenóides) e os taninos (compostos fenólicos). A nicotina pode agir como toxina diretamente no sistema nervoso de herbívoros (Wink, 1998; Shoji et. al., 2000); os glicosídeos cardioativos atuam na musculatura cardíaca, promovendo aumento da força dos batimentos. Em excesso, podem causar taquicardia, náuseas, vômitos, cefaléia e intoxicações gastrintestinais, podendo levar a morte (Mingoia, 1965).

A liberação de moléculas voláteis de tecidos de plantas é considerada como um mecanismo de reação de defesa indireta (Baldwin et. al., 2001). Essas moléculas têm sido reconhecidas por muitos anos como um importante caráter capaz de atrair ou de perturbar a interação de insetos com a planta. As emissões de moléculas voláteis específicas podem também agir como atrativos naturais de carnívoros e de parasitas de herbívoros (De Moraes et. al., 1998) ou como mensageiros de alerta para plantas vizinhas (Bruin & Dicke, 2001; Karban et. al., 2000).

Entre as proteínas de defesa, estão as com atividade enzimática. Entre estas incluem as quitinases (Chang et al. 1995), glucanases (Krebs & Grumet, 1993), proteinases (Pinedo et al, 1993), proteínas inativadoras de ribossomos, RIPs (Ramos et al. 1998; Jach et al, 1995), mas também podem ser encontradas proteínas não enzimáticas como inibidores de proteases. As lectinas, proteínas que se ligam a carboidratos, e os inibidores de α -amilase também são bem caracterizados (Lajolo et al., 1991, Rouge et al, 1997).

Enzimas proteolíticas

Enzimas proteolíticas, comumente chamadas de proteases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas. Elas são classificadas como endopeptidases quando hidrolisam ligações internas e exopeptidases quando hidrolisam unicamente ligações C- e N- terminais (Franco et al., 1999). As endopeptidases são também conhecidas como proteinases, que são classificadas, de acordo com o aminoácido presente em seu sítio ativo e no seu mecanismo de ação, em serínica, cisteínica, aspártica e metaloproteinases (Barrett, 1986). Proteinases de todas as quatro classes têm sido encontradas em diferentes órgãos e tecidos das plantas (Ryan & Walker-Simmons, 1981).

Muitas proteinases de plantas têm sido isoladas de frutas e sementes e a maioria delas pertencem à classe de proteinase cisteínicas (Boller, 1986). Em plantas, as proteinases cisteínicas possuem importantes papéis em processos intra e extracelulares, degradação de proteínas de reserva (Kembhavi et al., 1993); ativação de zimogênios e degradação de proteínas defeituosas (Rudenskaya et al., 1995); morte celular programada (Solomon et al., 1999); no reconhecimento de patógenos e na indução de respostas de defesa (Liu et al., 2001; Avrova et al, 1999).

Proteinases cisteínicas são também relatadas em látex, no qual a papaína, presente em *Carica papaya*, é a mais conhecida. Além da papaína, o látex de *C. papaya* possui outras três proteinases cisteínicas, quimopapaína, caricaína e glicil-endopeptidase (Glazer & Smith, 1971). Do mesmo modo, o látex de *Ficus glabrata*, *F. carica* (Sgarbieri et al., 1964), *Calotropis gigantea*, *C. procera* (Abraham & Joshi, 1979; Dubey & Jagannadham, 2003) apresentam múltiplas formas de proteinases cisteínicas.

Alguns trabalhos mostram que as proteinases cisteínicas estão envolvidas na interação de incompatibilidade planta-patógeno. Entre elas podemos citar a RCR3, que é requerida na resistência do tomate contra o fungo *Cladosporium fluvum* (Kruger et al., 2002); Mir1, que mostrou se acumular diretamente no local de ataque dos insetos *Spodoptera frugiperda* e *Diatraea grandiosella*, em plantas de milho resistentes (Pechan et al., 2000); papaína, bromelaina e ficina que foram tóxicas para os insetos *Samia ricini*, *Mamestra brassicae* e *Spodoptera litura* (Konno et al., 2004).

Inibidores de proteinases

Os inibidores de proteinases são proteínas de ampla distribuição no reino vegetal relacionadas à defesa da planta, que podem estar presentes constitutivamente nas sementes ou serem induzidos em outros tecidos por patógenos ou injúria (Ryan, 1990; Koiwa et al., 1997). Essas proteínas interagem com enzimas proteolíticas do agressor, agindo como moléculas antidigestivas ou antinutritivas (Belitz & Weder, 1990). Além desse papel de defesa, eles estão também relacionados com a regulação de proteinases endógenas durante a dormência e mobilização de proteínas de reserva da semente e na morte celular programada (Solomon et al., 1999). Contudo, podem também agir como proteínas de reserva (Lin & Hou, 2002).

Os inibidores de proteinases são geralmente pequenos, termoestáveis e específicos para cada uma das quatro classes mecanicistas de enzimas proteolíticas, sendo classificados como inibidores de proteinases serínicas, cisteínicas, aspárticas e metaloproteinases. A sua capacidade de inibir proteinases é devido à formação de um complexo estável, que bloqueia, altera ou previne o acesso ao sítio ativo da enzima pelo substrato (Bode et al., 2000).

A pesquisa de inibidores de proteinases tem sido centrada, principalmente, em sementes de leguminosas, como na soja (Xavier-Filho & Campos, 1989); *Vigna unguiculata*

(Xavier-Filho & Ventura, 1988); *Phaseolus vulgaris*, *P. lunatus*, *Canavalia brasiliensis*, *Dioclea grandiflora* (Richardson, 1986) e *Crotalaria palida* (Gomes et al., 2005). Contudo, são poucos os trabalhos com inibidores em látex. Entre eles podemos citar inibidores isolados de *Hevea brasiliensis* (Sritanyarat et al., 2006; Archer, 1983); *Carica papaya* (Monti et al., 2004) e batata doce (Lin & Lu, 1994).

Os inibidores de proteinases mais abundantes e estudados são aqueles capazes de inibir as proteinases serínicas, grupo da tripsina e quimotripsina, enzimas digestivas encontradas em insetos das ordens Lepidoptera, como em *Spodoptera frugiperda* (Ferreira et al., 1994a) e Diptera, como em *Ceratitis capitata* (Gomes et al., 2005). Inibidores de proteinases cisteínicas e aspárticas, enzimas que são predominantes nas ordens Coleóptera e Hemiptera, como no *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* e *Dysdercus peruvianus* (Silva & Xavier-Filho, 1991; Campos et al., 1989; Stanisçuaski et al., 2005) são menos conhecidos.

Quitinases

A quitina é um polissacarídeo insolúvel, constituído principalmente de resíduos de *N*-acetilglicosamina polimerizados através de ligações β -1,4. Este polissacarídeo é extremamente abundante na natureza de ocorrência inferior apenas da celulose em disponibilidade. Quitinases são enzimas capazes de hidrolisar ligações β -1,4-glicosídicas da quitina. São encontradas em diversos organismos, entre eles: fungos, bactérias, insetos e principalmente plantas. Elas podem ser induzidas em plantas através de infecções por vírus, bactérias e fungos, injúria ou pelo aumento na concentração de substâncias elicitoras tais como ácido salicílico, etileno, auxinas e citocininas (Graham & Sticklen, 1994), sugerindo que as quitinases participam em uma larga variedade de respostas de estresses nas plantas.

As quitinases atuam na defesa da planta a fungos por duas vias principais, degradando diretamente a parede de hifas do patógeno levando à lise (Jach et al., 1995) e indiretamente, liberando oligossacarídeos elicitores que levarão a planta a acumular fitoalexinas, que são compostos secundários envolvidos com a defesa de plantas (Lawrence et al., 1996).

A membrana peritrófica presente no trato intestinal de muitos insetos, é uma membrana semipermeável acelular constituída de quitina e proteínas, que separa o conteúdo do lúmen do intestino das células epiteliais que o cobrem (Tellam et al., 1999). Essa membrana tem sido descrita há quase 244 anos, em insetos (Lyonet, 1762). Contudo, a função e os componentes químicos permanecem ainda não muito claros. Sugere-se que ela é responsável por proteger o epitélio intestinal de partículas abrasivas da dieta e na defesa contra infecções por vírus e parasitas (Tellam et al., 1999).

As quitinases podem degradar essa membrana peritrófica (Flach et al., 1992) levando a uma inibição do crescimento ou morte de insetos (Wang et al., 1996), funcionando dessa forma como proteínas de defesa (Kramer et al., 1997).

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). No caso de plantas que produzem látex, este sofre um processo de agregação progressiva que lembra o processo de coagulação sanguínea. Este processo é comum ocorrer após a planta sofrer algum dano mecânico, o que leva a liberação do fluido laticífero, impedindo que a área injuriada seja penetrada por patógenos. O látex também tem uma ação colante que pode imobilizar pequenos insetos ou mesmo uma lagarta (Moursy, 1997). Entretanto, além deste efeito mecânico, a composição química do látex

parece ser também funcionar como uma ferramenta de defesa, neste caso agindo no combate a fungos e a vírus por meio de suas substâncias constituintes (Pereira et al., 1999). A presença de proteínas relacionadas à defesa contra patógenos (PR-Proteínas), como glucanases e quitinases (Van Loon & Van Sttrien, 1999), proteinases (Dubey & Jaganadham, 2002; Abraham & Joshi, 1979; Glazer & Smith, 1971; Sgarbieri et al, 1964) e inibidores de proteinases (Sritanyarat et al., 2006; Montil et al., 2004) no látex de várias espécies sugere que essa secreção poderia agir como uma defesa da planta contra o ataque de insetos e patógenos.

Látex é um termo geralmente usado para descrever um líquido com aspecto leitoso que é exudado de plantas que sofreram algum dano mecânico. Naqueles já estudados, em geral, são compostos de um soro, que contém em solução ou suspensão uma variedade de substâncias e/ou componentes celulares, entre os quais núcleos, mitocôndrias, ribossomos bem como ácidos nucléicos (Lynn & Clevette-Radford, 1986 b). A capacidade para formar látex é encontrada em plantas crescidas em muitos diferentes habitats e diferentes características morfológicas como ervas, arbustos e árvores. Cerca de 12.000-35.000 espécies, pertencentes a 900 gêneros de aproximadamente 12 famílias, maioria dicotiledônea, formam látex. Látex também pode ser produzido por fungos, como dos gêneros *Lactaria* e *Peziza*. Embora o látex tenha na maioria das vezes um aspecto leitoso, como em *Hevea* e *Calotropis*, ele pode ser amarelo ou laranja, como em plantas da família Papaveraceae, marrom-amarelado, em *Cannabis*, ou pode ser límpido como em *Morus* e *Nerium oleander* (Metcalf, 1967).

O látex é um exudado citoplasmático de células especializadas, denominadas de laticíferos. Os laticíferos são classificados como articulados e não articulados. Os articulados consistem de cadeias longitudinais de muitas células em que as paredes celulares que separam as células individuais permanecem intactas, enquanto os laticíferos não articulados surgem de

uma simples célula que cresce importunamente dentro dos espaços intracelulares, eventualmente ramificando-se nos tecidos das plantas de um modo similar as hifas de um fungo (Rudall, 1987).

Função Biológica dos Laticíferos

Várias funções têm sido atribuídas aos laticíferos. Uma delas é que eles formam um tecido de secreção, mas a vantagem para a planta de estocar látex ainda é duvidosa, pois a enorme quantidade de energia envolvida na síntese de borracha ou de outros componentes do látex não parece ser recuperável. 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). Esse papel de defesa tem sido defendido através de estudos, principalmente, do látex de *Hevea brasiliensis*, em que foram encontradas várias proteínas relacionadas com a defesa da planta ou que em testes de atividade biológica tenha demonstrado toxicidade contra patógenos como: a heveína (Lynn & Clevette-Radford, 1986b), as quitinases e as proteínas que se ligam à quitina (Jekel et. al.,1991).

Composição bioquímica do látex

Além de componentes celulares, essa secreção é composta por uma grande variedade de substâncias de baixa densidade, como proteínas, terpenos, carbonatos, alcalóides, vitaminas, carboidratos, lipídios e aminoácidos (Morcelle, et. al., 2004).

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 euphorbainas, 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 heveminas (Lynn & Clevette-Radford, 1986b), o mesmo constata-se no látex de *Elaeophorbia drupifera* (Lynn & Clevette-Radford, 1985, 1987b) e 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).

Também têm sido estudadas no látex de plantas, especialmente em *H. brasiliensis*, outros tipos de proteínas, como: lectinas, quitinases (Jekel et. al.,1991), beta-1,3- glucanases (Chey & 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) dentre outros.

O temo látex é frequentemente associado ao termo borracha. Praticamente todos os produtos industrializados derivados da borracha são fabricados a partir de uma fração do látex extraído da planta *Hevea brasiliensis*, a seringueira. Isto inclui desde os pneus dos automóveis até a chupeta usada para crianças. 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. Poliisoprenos constituem proporcionalmente a principal porção da maioria dos fluidos laticíferos e dão a estes a característica colante do látex recém exsudado, assim como é a sua agregação em rede que promove o efeito tipo coagulante observado ocorrer progressivamente quanto o látex é exsudado e entra em contato com o ar.

Embora plantas laticíferas sejam um atraente modelo biológico para estudo, investigações sobre as propriedades bioquímicas e fisiológicas de látex são ainda limitadas em bases de dados bibliográficos, principalmente, em se tratando de atividade inseticida. Em particular, a caracterização bioquímica, isolamento e purificação de proteínas, bem como de outros compostos presentes nesta secreção não são amplamente descritos na literatura. No que se refere à planta *C. procera*, pouco tem sido investigado quanto a composição bioquímica e funções de seu látex. Em contraste, a planta é amplamente conhecida pelas suas propriedades medicinais, e não são poucos os relatos de atividades farmacológicas detectadas em seu látex. Investigar aspectos funcionais do látex de *C. procera* é de cunho bastante relevante, principalmente considerando ser esta uma planta muito comum no Ceará.

Descrição e Características da Planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br.

C. procera (Ait.) R. Br., pertencente à família Asclepiadaceae, é um arbusto perene, ereto, pouco ramificado podendo alcançar 3,5 metros de altura. As folhas são grandes, subcoriáceas, cobertas, muitas vezes, por uma camada de cera, pelo menos nas plantas mais jovens. As flores são arroxeadas, dispostas em inflorescências fasciculadas terminais. Os frutos são cápsulas infladas, globosas, grandes, com sementes envolvidas em painas sedosas brancas (Figura 1). Multiplica-se apenas por sementes sendo disseminadas pelo vento (Lorenzi & Matos, 2002). O seu nome é derivado de Asclépios, Deus grego da medicina, do grego “kalos” = belo, “tropis” = barco e procera do latim “procerus” = alto, esbelto. Ela é provavelmente nativa da Índia, mas é encontrada em quase todas as regiões tropicais semiáridas da América, inclusive no Brasil, desde o Nordeste até o norte de Minas Gerais. A planta *C. procera* possui vários nomes populares de acordo com a região onde se encontra:

algodão-de-seda e seda (PE), flor-de-seda, ciúme e hortêncica (CE), paininha-de-seda (SP) e leiteiro (SP, MG).

Na medicina tradicional da Índia, a planta *C. procera* tem sido usada para combater uma variedade de doenças incluindo leprose, úlceras e tumores. Também tem sido usada como purgativo e anti-helmíntico (Kirtikar & Basu, 1935). Suas folhas e raízes são utilizadas para aliviar a dor em diferentes condições (The Wealth of India, 1992). Além disso, seu látex demonstrou diversas atividades biológicas como: hemólise de células sanguíneas e atividade anti-plasmodial (Sharma et al, 2001); atividade antidiarréica (Kumar et al., 2001); atividade antifertilidade em ratos (Kamath & Rana, 2002); atividade analgésica (Soares et al., 2005; Dewan et al., 2000); atividade esquistossomocida (Sharma & Sharma, 2000); atividade antiinflamatória (Kumar & Basu, 1994; Alencar et al., 2004); pró-inflamatória (Singh et al., 2000) e antibacteriana (Larhsini et al., 1999).

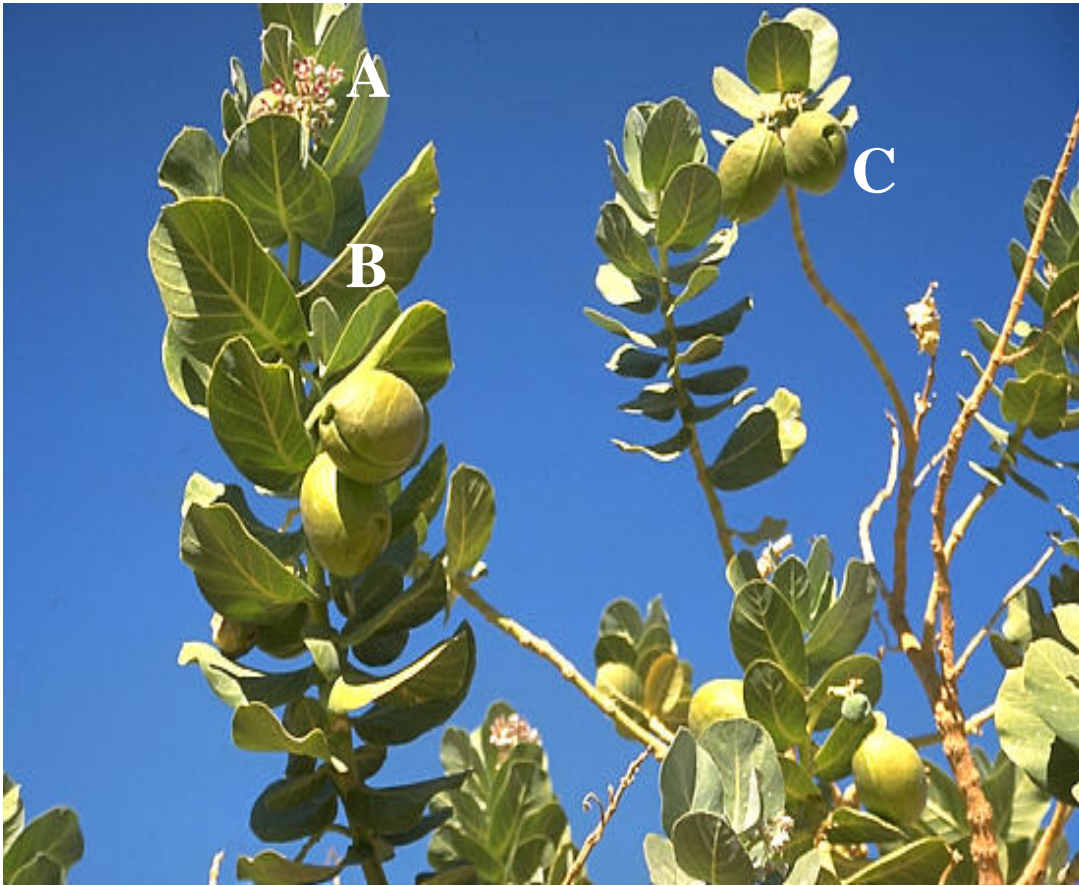


Figura 1: Aspecto geral da planta *Calotropis procera*, crescida na região metropolitana de Fortaleza-Ce. A: Flor; B: Folha; C: Fruto. Localidade: Fortaleza, bairro Papicu.

Insetos

***Callosobruchus maculatus* (F.) e *Zabrotes subfasciatus* (Boh.)**

As sementes contribuem significativamente para a dieta humana e animal, entre elas podemos citar principalmente as de cereais e de leguminosas. No Brasil e em outros países da América Latina, o feijão é um dos alimentos básicos mais consumidos e é uma excelente

fonte de proteínas, vitaminas, minerais e conteúdo energético (Guzmán- Maldonado et al., 1996). O feijão é uma cultura agrícola que tem grandes perdas em todo seu processo de cultivo devido aos variados fatores adversos de origem abiótica e biótica, sendo o ataque de insetos no campo e durante o armazenamento de seus grãos importantes contratempos da produção.

Uma das principais pragas do feijão de corda (*Vigna unguiculata*) é o *Callosobruchus maculatus* (Coleóptera: Bruchidae), que ataca, principalmente, as sementes estocadas, afetando severamente a qualidade, o peso e a capacidade de germinação (Hall et al., 1997; Dongre et al., 1996). Este caruncho pode ocasionar perda de peso das sementes da ordem de 60 % em seis meses de armazenamento (Tanzubil, 1991).

O *Zabrotes 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; Pimbet, 1985) e *V. unguiculata* (Lemos et al., 1990). Assim como o *C. maculatus*, esse inseto causa severos danos na perda de peso, redução do poder germinativo e do valor nutritivo e desvalorização comercial dos grãos, devido à presença de insetos mortos, furos, ovos e excrementos (Gallo et al., 1988).

***Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797).**

As culturas de milho e de arroz têm grande significado sócio-econômico no Brasil (Pulver, 2001). Entretanto, vários fatores são responsáveis pela queda na produtividade e, dentre eles, as pragas ocupam lugar de destaque. Nesse contexto, *Spodoptera frugiperda* pertencente à ordem Lepidoptera, família Noctuidae, é encontrada com grande frequência atacando estas culturas, provocando altos índices de desfoliamento (Cruz, 1995; Oliveira, 1987). Tem-se registrado que essa lagarta pode se alimentar além do milho e do arroz, de

várias outras plantas pertencentes a 23 famílias, caracterizando sua polifagia, sendo que seus maiores hospedeiros são as gramíneas (Lugibill, 1928).

Na cultura do milho, *S. frugiperda* é conhecida vulgarmente como lagarta-cartucho, podendo se alimentar em todas as fases de crescimento da cultura, mas tem preferência por cartuchos de plantas jovens. Na cultura do arroz é conhecida como lagarta-da-folha, alimentando-se de plantas novas, podendo consumi-las completamente, permanecendo na cultura até a fase de emissão das panículas (Loeck et. Al, 1993).

***Anticarsia gemmatalis* (Hueb., 1918)**

A soja constitui um dos produtos agrícolas de maior importância para o Brasil, ocupando lugar de destaque na pauta de exportação do país, sendo cultivada praticamente em todo o território nacional. Com a ampliação da área de soja plantada, problemas como perdas decorrentes do ataque de insetos-praga tendem a se agravar.

Dentre aqueles que trazem consequências econômicas mais significativas na soja destaca-se a lagarta-da-soja *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) (Gallo et al., 2002; Hoffmann-Campos et al., 2000). Mesmo em baixas densidades populacionais, esta lagarta causa grandes danos à lavoura de soja, que vai desde o desfolhamento até a destruição completa da planta. Durante o seu desenvolvimento, pode consumir até 90 cm² de folha de soja (Leppla et. al., 1977). Dessa forma, alta infestação dessa praga pode comprometer a produção dessa cultura.

Dysdercus peruvianus (Guérin-Ménéville)

O algodão (*Gossypium hirsutum* L.) é uma cultura muito importante economicamente em todo o mundo. Ela está distribuída em mais de setenta países e em várias regiões do globo terrestre (Abrahão et al., 1982). Estima-se que a produção mundial de fibra seja de aproximadamente 32 milhões de toneladas, sendo que o Brasil produziu em 1996/97 cerca de 310 mil toneladas e importou 460 mil toneladas de fibra (Magalhães, 1998).

O algodoeiro é atacado por diversas pragas que causam prejuízos à cultura, dentre as quais se destaca o bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis* Boheman), que é a praga de maior capacidade nociva econômica já detectada no continente americano. Os danos causados por ele nos órgãos reprodutivos desta planta podem causar perdas de até 100 %, caso não haja nenhum tipo de controle (Barbosa et al., 1983).

Além do bicudo, o algodoeiro é atacado pelo *Dysdercus peruvianus*, que é um inseto pertencente à ordem Hemiptera e a família Pyrrhocoridae. Ele ataca tanto as sementes como as fibras do algodão. Além disso, ele é um vetor para fungos e bactérias fitopatogênicos, podendo causar grandes perdas às plantações de algodão (Gallo, 1988).

Ceratitis capitata (Wiedeman, 1824)

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, 2005).

A mosca-do-mediterrâneo ou mais conhecida como mosca-das-frutas, *C. capitata*, pertencente à ordem Diptera, família Tephritidae. Ela é originária da África e sua introdução no continente Americano ocorreu pelo Brasil em 1901 (Nunez-Bueno, 1987). Atualmente, ela se encontra bastante distribuída pelo referido continente, infestando hospedeiros nativos e exóticos (Matioli, 1985). Ela é uma das mais importantes pragas que provocam 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).

O conjunto destes insetos, cujas imagens são apresentadas na Figura 2, representa indivíduos predadores de plantas cultivadas de interesse econômico. Constituem assim, excelentes modelos biológicos para avaliar atividades de defesa contra pragas no látex de *Calotropis procera*.

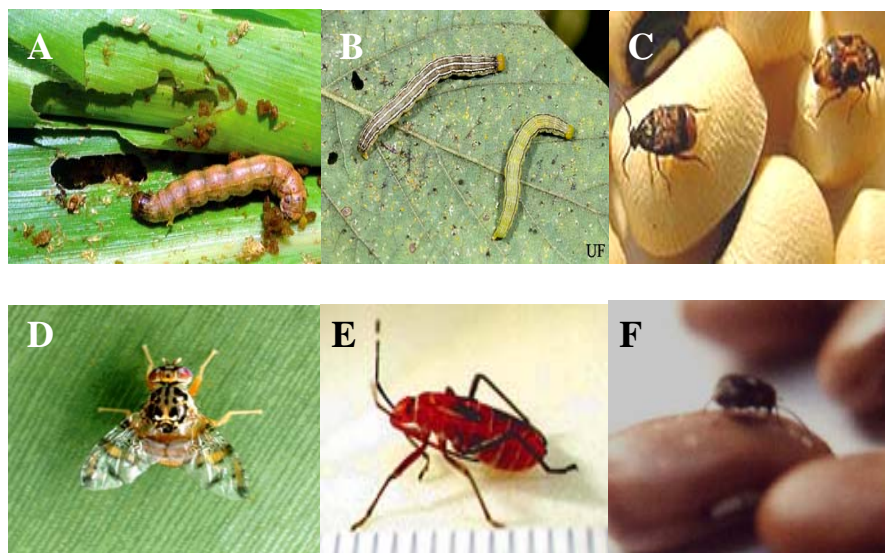


Figura 2: (A) Lagartas de *Anticarsia gemmatalis* e (B) *Spodoptera frugiperda*; (C) *Callosobruchus maculatus*; (D) *Ceratitidis capitata*; (E) Ninfa do 3º estágio de *Dysdercus peruvianus* e (F) *Zabrotes subfasciatus*.

II. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO DO TRABALHO DE PESQUISA

A planta *Calotropis procera* está presente em quase todo o Estado do Ceará. Entretanto, este vegetal não tem sido alvo de investigações científicas de qualquer natureza por grupos de pesquisa no Brasil. *Calotropis* é uma planta laticífera e quase todos os estudos bioquímicos e funcionais de fluidos laticíferos envolvem a planta *Hevea brasiliensis*, a Seringueira. Além destas observações, o que mais chama atenção na referida planta é a quantidade de látex que a mesma produz, mesmo estando esta ausente de infecções. A produção de látex em *Calotropis procera* é extraordinária. É possível coletar até 60 ml de fluido de uma única planta sem comprometer sua saúde.

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo estudar atividades enzimáticas presentes no látex de *Calotropis procera*, caracterizar alguns aspectos bioquímicos deste e avaliar a capacidade de suas proteínas interferir no desenvolvimento de insetos predadores de diferentes plantas cultivadas, na perspectiva de evidenciar o envolvimento destas proteínas na defesa de *Calotropis procera* e ao mesmo tempo avaliar seu potencial como fonte de proteínas com atividade inseticida relevante.

III. MATERIAIS E METODOS

Reagentes

Azocaseína, N-Benzoyl-arginine-naphthylamide (BANA), Benzoil Arginina Nitroanilida (BApNA), Trans-Epoxy succinyl-Leucylamido-3-Methyl-Butano (E-64), N-Tosyl-L-Phenylalanine Chlorometryl Ketone (TPCK), Tripsina (E.C. 3.4.21.4), Quimotripsina (E.C. 3.4.21.1) e α -amilase pancreática bovina (E.C. 3.2.1.1), Papaína 2x cristalisada (E.C. 3.4.22.2), marcadores de massa molecular, Quitina coloidal, glucuronidase (ECP 3.2.1.31), p-dimetilaminobenzaldeido (DMAB), Pronase de *Streptomyces griseus*, Amido, Quitina, Anticorpo secundário anti-IgG de coelho produzido em cabra marcado com fosfatase alcalina, 5- Bromo-4-Chloro-3-IndolylPhosphato (BCIP), Nitro Blue Tetrazolium (NBT), persulfato de amônio, membrana de PVDF e de diálise “cut off” 8.000 foram obtidos de Sigma ou Sigma-Aldrich Co. USA.

Dithiothreitol (DTT), Sodium Dodecil Sulphate (SDS), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), Ethyleneglycol-bis-aminoethyl Ether (EGTA) foram obtidos da Amersham Bioscience, USA. Azul de bromofenol, tiosulfato de sódio, nitrato de prata, carbonato de sódio foram obtidos da Acros Organics, USA. Albumina Sérica Bovina Fração V foi obtida de INLAB, Brasil. Triton X-100 e Tween 20 foram obtidos da USB Corporation, cleveland, OH USA.

Os demais reagentes foram de grau analítico e provenientes de diferentes fornecedores.

Material Biológico

Planta

A planta *Calotropis procera* (Ait.) R. Br., pertencente à família Asclepiadaceae, foi identificada pelo Professor Edson de Paula Nunes, taxonomista do Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, onde uma exsicata (N. 32663) desse material está depositada. A planta ocorre em abundância em várias localidades da cidade de Fortaleza, principalmente na área litorânea. A coleta do látex foi sempre realizada na região metropolitana de Fortaleza no horário entre 7 e 8 horas da manhã. A coleta de látex não compromete a saúde da planta, que tem excelente capacidade regenerativa. É possível observar que ao longo do tempo, plantas alvo de coleta regeneram-se e prosseguem o desenvolvimento em condições aparentemente normais. Nenhuma mortalidade foi observada após coleta do látex.

Insetos

Calosobruchus maculatus e *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae)

As colônias dos insetos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* utilizadas foram originalmente fornecidas pelo professor Dr. Thalles Barbosa Grangeiro do Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceará. Os dois insetos foram mantidos em uma incubadora BOD a $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de 65-75 %, fotoperíodo de 12 horas de luz e em sementes de feijão de corda (EPACE-10) obtidas no comércio de fortaleza-CE.

Dysdercus peruvianus (Hemiptera: Pyrrhocoridae)

As colônias dos insetos utilizados foram originalmente fornecidas pelo professor Dr. Carlos Peres Silva, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacases, RJ. Os insetos foram mantidos a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de 65-75 %, fotoperíodo de 16 horas de luz. Os insetos foram mantidos em potes plásticos transparentes cobertos com um pano fino, com livre acesso à água e alimentados com sementes de algodão.

Ceratitis capitata (Diptera: Tephritidae)

As larvas de *Ceratitis capitata* foram fornecidas pelo professor Dr. Maurício Pereira Sales do laboratório de química e função de proteínas bioativas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, RN. As lagartas foram mantidas a uma temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de 60-70 %, fotoperíodo de 12 horas de luz e em uma dieta artificial descrita por Gomes et al., 2005, como descrito abaixo.

Spodoptera frugiperda e *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae)

Lagartas de *Spodoptera frugiperda* e *Anticarsia gemmatilis* foram fornecidas pela MSc. Lúcia Bertholdo Vargas do laboratório de controle biológico, Universidade de Caxias do Sul, RS. Os dois insetos foram mantidos a uma temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade relativa de 65-75 %, fotoperíodo de 12 horas de luz e dieta artificial descrita por Hoffmann-Campo et al, 1985, assim como descrito posteriormente.

Coleta e Fracionamento do Látex

Através de incisões no ápice caulinar de espécimes, o látex foi coletado em tubos tipo Falcon, contendo 20 ml de água destilada, sendo o látex misturado na proporção de 1:1 (v/v). A coleta de 20 ml pode ser obtida de um único exemplar da planta e leva em média 10-15 minutos. O procedimento de coleta do látex sobre água foi mostrado diminuir o efeito tipo coagulação que ocorre logo após sua coleta. Se coletada em sua forma *in natura*, a secreção tende a sofrer reações de oxidação e claramente há formação de pedaços (flocos) de borracha, característica comum de látex de plantas. Este fenômeno leva a uma grande perda de moléculas solúveis que são então aprisionadas nas partículas de coagulação.

Após a coleta do látex em água, o material foi centrifugado em centrífuga de bancada (5.000 g) por 10 minutos a 25 °C. O precipitado obtido era constituído de uma densa massa com aspecto de borracha, entretanto o sobrenadante submetido à diálise, contra água destilada a 4 °C, mantinha o aspecto original do látex, isto é, leitoso, embora desprovido de floculação. Após a segunda centrifugação, nas mesmas condições acima, um sobrenadante límpido e completamente desprovido de borracha foi obtido. Esta fração do látex total foi alvo de análise neste trabalho e designada como **Proteínas do Látex**, já que foi demonstrado anteriormente ser uma fração rica em proteínas. Importante frisar neste ponto que a membrana de diálise utilizada tinha capacidade para retenção de moléculas com massa molecular superior a 8.000 Da. As proteínas do látex foram preparadas em quantidade suficiente para utilização nos bioensaios. As amostras foram submetidas a processo de liofilização para formulação de dietas experimentais. A seqüência de eventos realizados para a obtenção das proteínas do látex pode ser sumarizada como apresentado no esquema da Figura 3.

Dosagem de Proteínas

A amostra em estudo foi estimada quanto ao teor de proteínas solúveis pelo método colorimétrico descrito por Bradford (1976). A partir de 100 µL, da amostra em diferentes concentrações, foram adicionados 2,5 mL do reagente de BRADFORD. As misturas foram levemente agitadas e após 10 minutos foram feitas as leituras das absorbâncias a 595 nm. A quantidade de proteínas foi estimada utilizando-se Albumina Sérica Bovina como referência padrão na curva de calibração.

Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS foram conduzidos de acordo com a técnica descrita por Laemmli (1970), adaptadas para o uso de géis de separação em placas. Em todas as eletroforeses foram utilizados géis de aplicação contendo 5 % de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS 1 % e os géis de separação contendo 12,5 % ou 15 % de poliacrilamida em uma solução tampão Tris-HCl 3 M, pH 8,9 e SDS 1 %. As proteínas do látex e suas frações foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1 % e sem agente redutor. Azul de bromofenol (para a marcação da frente de corrida eletroforética) a 0,02 % foi acrescentado às amostras antes da aplicação no gel.

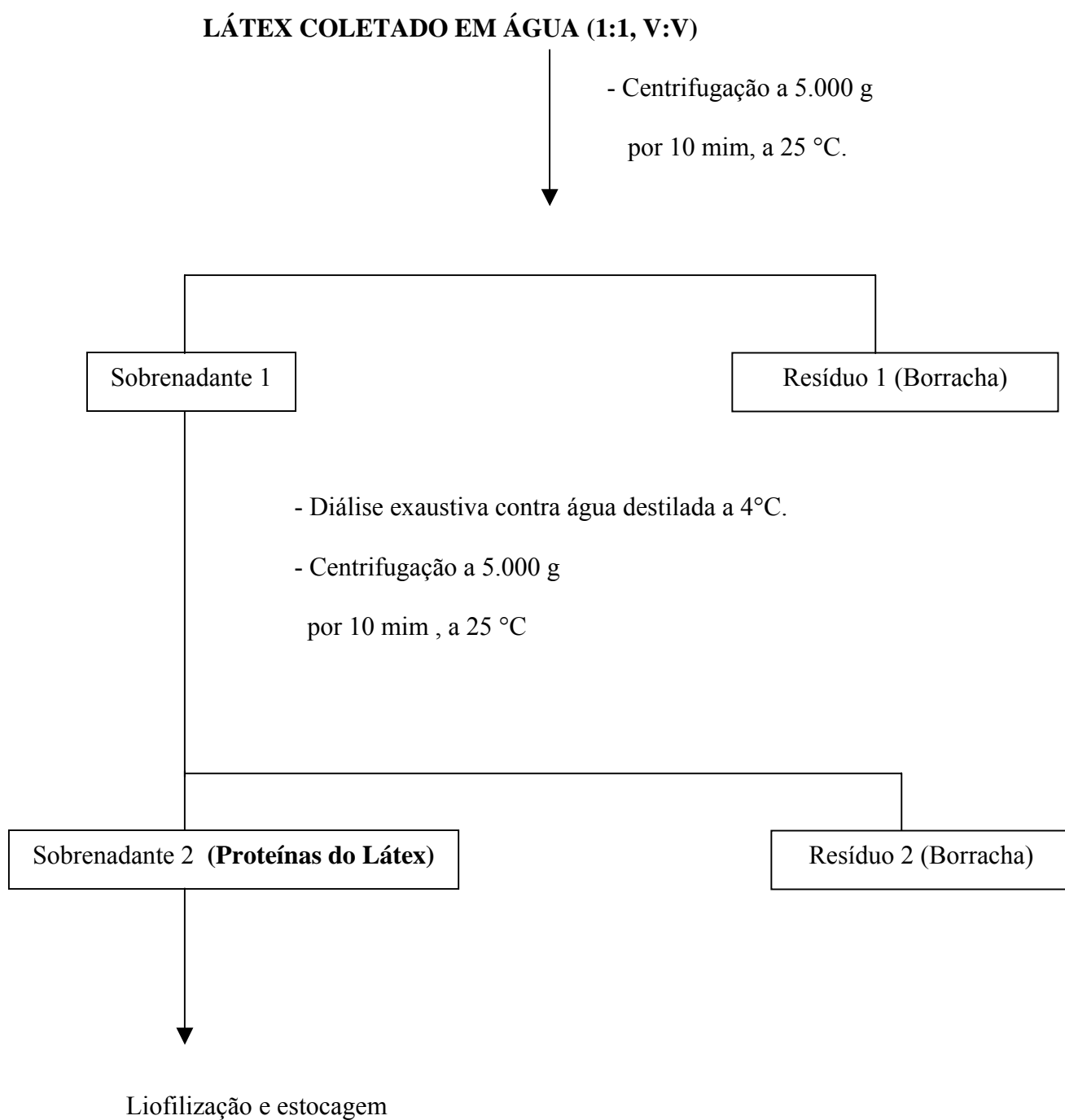


Figura 3: Esquema de fracionamento do látex da planta *Calotropis procera*.

As corridas eletroforéticas foram realizadas sob amperagem constante (20 mA) por um período médio de 2 horas a 25 °C. Os picos obtidos das cromatografias em coluna de quitina também foram igualmente analisadas. Após as corridas, os géis foram corados com prata ou com uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 e descorados em solução de ácido acético, água destilada e metanol (1:8:3,5, v,v,v) desprovida do corante.

Ensaio de atividade enzimática endógena e de inibição nas proteínas do látex

Atividade α -amilásica e inibição da α -amilase pancreática suína

Para determinação da atividade α -amilase foram realizados ensaios contendo 10, 50, 100 e 200 μ g das proteínas do látex, em 200 μ l de tampão acetato de sódio 100 mM, contendo NaCl 3mM pH 5,5. Após 10 minutos a 30 °C em banho-maria, foram adicionados 2 ml de amido (1 % em tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,5 contendo NaCl 3 mM). A reação processou-se por mais 60 minutos nas mesmas condições de incubação e foi paralisada em banho de gelo por 5 minutos. Alíquotas de 25 μ l de cada tubo de ensaio foram retiradas e adicionadas a 2,5 ml de solução de lugol (Iodo 3 mM, Iodeto de Potássio 24 mM). O amido remanescente foi detectado em espectrofotômetro a uma absorbância de 565 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata e provas em branco foram feitas. A absorbância foi medida a 565 nm.

Para determinação da possível atividade anti- α -amilase foram realizados ensaios em que 20 μ l de uma solução de α -amilase (0,66 mg/ml em tampão acetato de sódio 100 mM pH 5,5 contendo NaCl 3mM) foram pré-incubados com 10, 50, 100 e 200 μ g das Proteínas do Látex por 15 minutos a 30°C em banho-maria. O restante do ensaio seguiu-se como citado acima. Esses ensaios foram feitos de acordo com Mao & Kinsella, 1981.

Fracionamento em cromatografia em coluna de quitina

A coluna de quitina foi preparada a partir de carapaças de caranguejo obtidas comercialmente da SIGMA. O material foi submetido a um tratamento como descrito por Hackman & Goldberg (1964). Aproximadamente, 25 g de farinha foram suspensas em 500 ml de HCl 0,1 N, deixada por agitação constante por 24 horas e centrifugada a 7.500 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 250 ml de NaOH 0,1 N. Esta mistura foi aquecida a 100 °C por 16 horas, resfriada, centrifugada a 7.500 x g por 20 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. Este procedimento foi repetido mais duas vezes e, ao término, foi centrifugado nas mesmas condições anteriores. O precipitado foi acidificado com HCl 0,2 N e dialisado contra água destilada por 48 horas. A suspensão foi novamente centrifugada a 7.500 x g por 20 min a 4 °C. O precipitado foi equilibrado com água destilada, sendo montado em uma coluna de dimensões de 17 x 2,5 cm, deixando o gel sedimentar sob a ação da gravidade. O fluxo da coluna foi ajustado para 30 ml/h e foram coletadas frações de 3 ml. Em cada cromatografia foram utilizados 30 mg das Proteínas do Látex dissolvidas em 3 ml de NaCl 0,15 M, centrifugada a 10.000 x g por 10 min a 10 °C. O pico não retido foi eluído com a mesma solução de equilíbrio da coluna e pico retido, com ácido acético 1 M. As absorvâncias foram monitoradas a 280 nm. Quando testada as frações proteínas do látex desnaturadas e sobrenadante, a coluna utilizada foi de 6 x 1,8 cm e as quantidades de proteínas aplicadas na coluna foram de 2 mg em NaCl 0,15 M. As proteínas do látex, assim como seus picos derivados da coluna de quitina foram avaliados quanto a presença de atividade quitinolítica através de ensaios fotolorimétricos e zimograma. As frações foram ainda avaliadas quanto o potencial inseticida no modelo com *Callosobruchus maculatus*.

Determinação da atividade quitinolítica por fotolorimetria

A atividade quitinolítica foi medida segundo o método colorimétrico descrito por Boller (1993), tendo como parâmetro a liberação de *N*-acetil-D-glucosamina (NAG) a partir da ação hidrolítica da enzima sobre a quitina coloidal. Para isso, 250 µL (1 mg/ml dissolvido em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2) das frações: Proteínas do Látex nativa, sobrenadante e precipitado (obtidos após aquecimento por 30 min a 98 °C em banho-maria) foram incubados com 250 µL de quitina coloidal (10 mg/ml), a 37 °C, durante 60 minutos em estufa. A reação enzimática foi interrompida através de fervura em banho-maria a 98 °C, por 5 minutos. Após resfriamento, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g, 25 °C, por 20 minutos. A seguir, 10 µL de uma solução diluída de enzima glucoronidase foram adicionados a 300 µL de cada sobrenadante resultante da primeira mistura reacional e feita incubação, novamente, a 37 °C, por 60 minutos em estufa. Esta segunda etapa enzimática também foi interrompida por meio de fervura em banho-maria, durante 10 minutos. Para determinação da quantidade de NAG liberada a partir da quitina coloidal sob ação de enzimas quitinolíticas, 310 µL do hidrolizado foram acrescidos de 190 µL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 6,0 e 100 µL de tetraborato de sódio e potássio 0,6 M. A mistura reacional foi aquecida em banho-maria a 98 °C, por 5 minutos. Após resfriamento, 1 ml da solução de *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) (100 mg/ml), foi adicionado à mistura reacional e incubado em banho-maria a 37 °C por 20 minutos. As leituras de absorvância foram feitas no comprimento de onda de 585 nm.

Para ambos os ensaios, o cálculo da quantidade de NAG liberado na reação foi feito a partir de uma curva padrão construída com concentrações conhecidas de NAG, variando de 100 a 500 µM (Reissig *et al.*, 1955). A atividade quitinásica foi expressa em nanokatal (nkat)

por mg de proteína, onde 1 nkat corresponde a liberação de 1 μ M de NAG por mililitro por minuto.

A quitina coloidal usada como substrato para determinação da atividade quitinolítica foi preparada segundo a metodologia descrita por Boller (1992), a partir de quitosana, com algumas modificações. A solução de glucoronidase usada no ensaio foi diluída 10 vezes em água grau Milli-Q a partir do preparado bruto de *Helix pomatia* (Sigma Chemical Co-Type HP- 2.132.000 unidades/ml) e dialisada exaustivamente contra água grau Milli-Q, sendo armazenada em freezer (-20 °C). A solução de ρ -dimetilaminobenzaldeído (DMAB), foi preparada pela dissolução de 10 g de DMAB em 100 ml de ácido acético glacial contendo 12,5% (v/v) de ácido clorídrico.

Zimograma para detecção de atividade quitinolítica

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita de acordo com Laemili, 1970, enquanto a metodologia empregada para a detecção da atividade quitinásica no gel foi realizada seguindo-se o protocolo estabelecido por Truel & Asselin (1989), com duas modificações: após a corrida eletroforética o gel ficou em contato com o tampão de renaturação (acetato de sódio 100 mM, pH 5,0, contendo Triton X-100 1 %) por 12 horas em banho-maria a 37 °C. As amostras Proteínas do Látex e as frações PI-Q e PII-Q obtidos após cromatografia em coluna de quitina foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 1 M, pH 6,8 contendo glicerol 30 %, SDS 1 %, EDTA 0,5 M, EGTA 0,2 M e azul de bromofenol 0,1 %. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g, 10 °C por 10 min, e em seguida aplicadas no gel (100 μ g). A corrida foi realizada sob amperagem constante de 25 mA por gel. O zimograma foi revelado após tratamento com 0,01 % de calcoflur MR 28 e a visualização foi feita sob a luz ultravioleta no sistema de vídeo (UV ITF LABORTECHNIK, Wasserburg, Germany).

Determinação da atividade proteolítica e inibição por E-64 e TPCK

Para avaliar quais as classes de enzimas proteolíticas estão presentes nas Proteínas do Látex, ensaios de inibição utilizando TPCK e E-64 foram feitos utilizando azocaseína, BANA e BApNA como substratos em pH específicos (Xavier-Filho et al., 1989).

Os ensaios de inibição para proteinases serínicas foram realizados em pH 7,5 utilizando como substrato azocaseína 1 % ou BapNA 1,25 mM, seguindo a metodologia empregada para o ensaio de inibição da atividade quimotripsínica (descrito abaixo), onde 150 µg da amostra foram incubadas com 7 µl de N-Tosyl-L-Phenylalanine Chlorometryl Ketone 0,1 mM (TPCK).

A inibição para proteases cisteínicas foi testada em pH 6,0, seguindo a metodologia empregada para o ensaio de inibição da atividade da enzima papaína, onde foram utilizados 150 µg das Proteínas do Látex incubadas com 7 µl de E-64 (0,01 mM) utilizando como substratos azocaseína 1 % ou BANA 1 mM.

Zimograma para detecção de atividade proteolítica

A eletroforese em gel de poliacrilamida foi feita de acordo com Laemili, 1970, enquanto a metodologia empregada para a detecção da atividade proteolítica no gel foi realizada de acordo com Macedo et al., 2004, utilizando como substrato gelatina 0,1%.

Após a corrida eletroforética, os géis foram incubados em uma solução de Triton X-100 2,5 % por duas vezes, sendo 20 min cada a 25 °C. Depois os géis foram incubados em uma solução ativadora (tampão fosfato de sódio 250 mM, pH 6,0 contendo DTT 2 mM e EDTA 1 mM) por 60 min a 37 °C em banho-maria. Em seguida os géis foram corados com uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250.

Inibição da atividade proteolítica do tipo cisteínica

Para determinação da atividade anti-papainásica na fração sobrenadante, que foi obtida após centrifugação das Proteínas do Látex aquecidas por 30 min a 98 °C, como citado posteriormente, 20 µl da solução de papaína (0,2 mg/mL fosfato de sódio monobásico 25 mM pH 6,0) foi pré-incubada com 47,2 e 94,4 µg de proteínas da amostra e com 40 µl de tampão fosfato de sódio monobásico 25 mM pH 6,0 contendo DTT 3 mM e EDTA 2 mM e o volume ajustado para 500 µL com o mesmo tampão acima e incubado por 10 minutos a 37 °C. Após esse período a reação foi iniciada adicionando-se 200 µl de BANA (1,0 mM em fosfato de sódio monobásico 25 mM, pH 6,0). A reação processou-se por mais 20 minutos nas mesmas condições de incubação. A reação foi interrompida com a adição de 500 µl de solução HCl 2 % em etanol e foi adicionado 500 µl de p-dimetilaminocianomaldeído 0,06 % em etanol em cada tubo, os quais ficaram em descanso por 40 minutos. Os ensaios foram realizados em triplicata e provas em branco foram feitas. A absorbância foi medida a 540 nm (Abe et al., 1992).

Inibição da atividade proteolítica do tipo serínica

Para determinação da inibição de atividade enzimática do tipo serínica nas proteínas látex, a tripsina e a quimiotripsina bovina foram utilizadas (Xavier-Filho et al., 1989).

Inicialmente, 20 µl da solução de tripsina (0,3 mg/ml em HCl 2,5 mM) foram pré-incubados, por 15 minutos a 37°C, com 10, 50, 100 e 200 µg da amostra dissolvida em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5, adicionado 110 µl de HCl 2,5 mM e o volume ajustado para 370 µl com o mesmo tampão em que a amostra foi dissolvida. Após esse período a reação foi iniciada adicionando-se 500 µl de BApNA (1,25 mM em Tris-HCl 50 mM, pH 7,5). A

reação processou-se por mais 10 minutos nas mesmas condições de incubação e interrompida com a adição de 120 µl de solução de ácido acético 30 %. Os ensaios foram realizados em triplicata e provas em branco foram feitas. A absorbância foi medida a 405 nm.

Para determinação da atividade anti-quimotripsínica na fração das Proteínas do Látex, 30 µl da solução de quimotripsina bovina (0,3 mg/mL em Tris- HCl 5 mM pH 7,5) foram pré-incubados, por 15 minutos a 37 °C, com 10, 50, 100 e 200 µg da amostra, dissolvida em 470 µl com tampão Tris-HCl 5 mM pH 7,5. Após esse período a reação foi iniciada adicionando-se 200 µl de Azocaseína (1 % em Tris-HCl 5 mM pH 7,5). A reação processou-se por mais 30 minutos nas mesmas condições de incubação. A reação foi interrompida com a adição de 300 µl de solução de TCA 20 %. Transcorridos 10 minutos, a suspensão foi centrifugada por 15 min a 12000 x g, à temperatura ambiente. Aliquotas de 400 µl do sobrenadante foram alcalinizadas com 400 µl de NaOH 2 N. A atividade azocaseinolítica foi medida pela absorbância dos peptídeos diazotizados produzidos a 420 nm. O ensaio controle foi realizado na ausência da fração inibidora nas mesmas condições acima descritas. Os ensaios foram realizados em triplicata e provas em branco foram feitas.

Bioensaios

*Bioensaios com os insetos *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus**

Para examinar os efeitos das proteínas do látex de *C. procera* no desenvolvimento desses insetos, foi usado um sistema de sementes artificiais, constituídas de cápsulas de gelatina transparente (nº 1), contendo farinha de feijão de corda (EPACE-10) e as Proteínas do Látex em diferentes concentrações.

Bioensaio N. 1 – Desenvolvimento larval e tempo de emergência

Sementes artificiais contendo as Proteínas do Látex nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1 % (m/m) foram obtidas através da mistura dessas com a farinha do feijão (EPACE-10) em um moedor elétrico. As misturas foram adicionadas às cápsulas de gelatina e prensadas, usando-se uma encapsuladora manual. Cada tratamento conteve 40 sementes artificiais (\pm 600 mg cada), sendo quatro repetições com 10 sementes. As sementes foram ofertadas a insetos de 2-3 dias de idade por 2 dias para a oviposição e o número de ovos por semente foi ajustado para representar de 5 à 8. Seguindo a incubação por 20 dias, as sementes foram abertas e a massa e o número de larvas determinadas. Foram utilizados dois controles: um com sementes contendo Albumina Sérica Bovina (Albuma Bovina Fração V, INLAB) na concentração de 1 % (p/p) e outro com sementes contendo apenas farinha de feijão. Um segundo experimento, realizado em paralelo e seguindo rigorosamente as mesmas condições e neste as sementes não foram abertas no vigésimo dia. A eclosão de insetos foi acompanhada durante 17 dias após a primeira emergência, sendo então calculado o tempo médio de desenvolvimento e percentual de emergência de insetos relacionado ao número de ovos efetivamente eclodidos.

*Bioensaio N.2 - Avaliação do desenvolvimento do *Callosobruchus maculatus* quando alimentado por seis gerações seguidas com as proteínas do látex*

A geração F₁ foi determinada como a primeira geração de insetos que nasceram a partir das sementes artificiais contendo as Proteínas do Látex ou das sementes contendo apenas farinha de feijão. As concentrações testadas foram 0,05; 0,1; 0,25 (p/p), sendo 80, 80, 100 sementes, respectivamente, por grupo. Os insetos recém emergidos da geração F₁ foram

colocados para ovipositar em sementes artificiais, até que a quantidade de ovos fosse de 5-8 por semente, contendo as Proteínas do Látex na mesma concentração em que emergiram e em sementes controle contendo apenas farinha de feijão. Nesse caso os insetos emergidos destas sementes foram denominados de F₂.

Outro experimento foi realizado, em que os insetos recém emergidos das sementes contendo as Proteínas do Látex na concentração de 0,05 % foram colocados para ovipositar (5-8 ovos/semte) em sementes contendo as proteínas do látex na mesma concentração por seis gerações seguidas. Para isso, foram utilizadas 80 sementes, divididas em 4 repetições de 20. Um ensaio controle contendo apenas farinha de feijão foi realizado nas mesmas condições. O tempo de desenvolvimento e o porcentual de emergência foram determinados durante as seis gerações seguidas a partir do número de insetos emergidos durante 17 dias, após a primeira emergência.

Bioensaios N. 3 e N. 4 – Avaliação da ação inseticida das proteínas do látex desnaturadas ou digeridas

As Proteínas do Látex foram aquecidas com o objetivo preliminar de avaliar se possíveis efeitos deletérios encontrados nos bioensaios poderiam ser atribuídos às proteínas. Para isso as Proteínas do Látex (150 mg dissolvidos em 50 ml de água destilada) foram incubadas em banho-maria por 30 min a 98 °C. Após o resfriamento, a mistura foi centrifugada a 5.000 x g por 10 min a 25 °C, o que resultou em um sobrenadante e um precipitado. Essas frações foram separadamente liofilizadas e adicionadas a farinha de feijão (EPACE-10) a uma concentração de 0,1 % (p/p) para se avaliar o desenvolvimento das larvas do *C. maculatus* após 20 dias da eclosão dos ovos. Foram utilizadas 20 sementes, divididas em 4 repetições. Proteínas do látex não aquecidas foram usadas no grupo controle, além do

grupo contendo apenas farinha de feijão. O sobrenadante obtido foi analisado em ensaios enzimáticos e inibitórios como descritos abaixo.

Uma outra forma utilizada para avaliar se possíveis efeitos tóxicos encontrados na fração Proteínas do Látex eram de origem protéica foi promover a digestão destas com uma protease de *Streptomyces griseus*, denominada de pronase, que cliva inespecificamente as ligações peptídicas. Para isso, as Proteínas do Látex (200 mg) foram dissolvidas em 20 ml de tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,5 e adicionado a essa mistura 2 mg da pronase dissolvida em 1 ml do mesmo tampão, nos tempos 0, 8 e 16 horas. Após 24 h de incubação a 37 °C em banho-maria, a mistura foi colocada em água fervente por 4 min, para desnaturar a pronase. Um controle contendo apenas as proteínas do látex foi feito e submetido nas mesmas condições anteriores. As amostras foram então liofilizadas, avaliadas em eletroforese em gel de poliacrilamida e adicionadas à farinha de feijão a uma concentração 0,1 % (p/p) para se avaliar o desenvolvimento das larvas do *C. maculatus* após 20 dias da eclosão dos ovos. Foram utilizadas 20 sementes, divididas em 4 repetições.

Avaliação da digestibilidade in vitro das proteínas do látex frente às enzimas das larvas do C. maculatus e Z. subfasciatus

50 larvas de 18-20 dias de idade desenvolvidas em feijão de corda (EPACE-10) foram homogeneizadas em 500 µl de tampão acetato de sódio 100 mM, pH 5,6 e centrifugado a 3.000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado em algodão e atividade proteolítica determinada. Para o ensaio da atividade proteolítica, 100 µl dos homogenatos foram adicionados a uma solução de azocaseína (2 % em tampão formiato de amônio 50 mM pH 5,6) e incubado por 3 horas a 37 °C em banho-maria. Uma mili-unidade de atividade azocaseinolítica foi determinada como a quantidade de enzima capaz de aumentar a

absorbância em 0,001 a 420 nm por hora a 37 °C. Foi utilizada uma relação de 0,5 mU de atividade azocaseinolítica por hora/μg de proteínas do látex. Aliquotas (200 μl) foram retiradas em diferentes tempos (0, 2, 4 e 8 h) para serem analisadas igualmente em eletroforese e Western blotting (somente no caso do *C. maculatus*).

Os resultados das reações dos homogenatos das larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* foram avaliados em géis de poliacrilamida. Para isso foram preparados géis de concentração 5% e de separação de 12,5 %. 20μl da mistura foram aplicados no gel de modo que continham 8 μg das Proteínas do Látex. A corrida foi feita a 40 mA e 150 V por 30 min e 40mA a 200 V por duas horas a 4°C.

Após o término da corrida eletroforética, os géis foram colocados em uma solução que continha metanol 50 %, ácido acético 12 % e formaldeído 0,5 ml/L durante 1 h. Depois, em uma solução de etanol 50 %, por 20 min, com três trocas cada. Os géis foram então colocados em uma solução de tiosulfato de sódio (0,2 g/L) durante 1 min e lavados com água destilada, para retirar o excesso de tiosulfato. Depois foi adicionado uma solução de nitrato de prata (2 g/L) contendo formaldeído (0,75 ml/L), por 20 min, e lavados com água destilada. Finalmente, foi adicionada uma solução de carbonato de sódio (60 g/L) contendo formaldeído (0,5 ml/L) e tiosulfato de sódio (0,4 mg/L) até a revelação. A solução de parada foi metanol 50 % e ácido acético 12 % (Blum et al., 1987).

Bioensaio com Dysdercus peruvianus

Possíveis efeitos tóxicos das proteínas do látex foram avaliados em um bioensaio com ninfas do terceiro estágio de *Dysdercus peruvianus*. Neste procedimento foram avaliados os parâmetros de massa dos indivíduos e sobrevivência destes após exposição à dieta contendo diferentes conteúdos de proteínas do látex durante 14 dias.

As sementes artificiais foram feitas a partir da farinha de cotilédones de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*), que foram oriundas de plantações livres de agrotóxico, obtidas da EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA-ALGODÃO (IAC-Instituto Agrônômico de Campinas). Cápsulas de gelatina transparentes (n° 1) foram preenchidas manualmente com 300 mg de farinha fina de cotilédones de sementes de algodão, contendo ou não as proteínas do látex. As Proteínas do Látex foram dissolvidas em 400 µl de água destilada e adicionadas a 300 mg de farinha fina de cotilédones de sementes de algodão. As misturas foram então congeladas e liofilizadas. As concentrações testadas foram 0,1; 0,5; 1 e 2 %, expressas como porcentagem (p/p) em relação a 300 mg de farinha de algodão. Sementes controle foram feitas da mesma maneira, onde foram adicionados apenas 400 µl de água a 300 mg da farinha de algodão (Stanisçuaski et al., 2005).

Para avaliar o efeito das proteínas do látex sobre o desenvolvimento do inseto foram utilizadas 45 ninfas no 3° estágio, sendo divididas em 3 grupos de 15. As ninfas tiveram livre acesso a água e foram mantidas à temperatura de 25 °C em frascos de vidros cobertos com um pano de malha fina. As ninfas foram deixadas em jejum por 24 horas antes de ser oferecido as sementes artificiais. A massa e a sobrevivência dos indivíduos nos grupos foram determinadas de 2 em 2 dias, até se completar 14 dias.

Avaliação da digestibilidade in vitro das proteínas do látex frente às enzimas intestinais do D. peruvianus

Intestinos de ninfas do 4° estágio foram dissecados em microscópio estereoscópico para se determinar a capacidade das proteínas do látex a resistirem à proteólise por parte de enzimas digestivas presentes nesse inseto. Para isso, 25 intestinos foram homogeneizados em 500 µl de tampão formiato de amônio 50 mM, pH 5,6, centrifugado a 3.000 g por 20 min a 4

°C. O sobrenadante foi filtrado em algodão e atividade proteolítica determinada como no ensaio com o inseto *C. maculatus*, descrito acima.

Para o ensaio foi determinado uma relação de 0,5 mU de atividade azocaseinolítica por hora/ μ g de Proteínas do Látex. O extrato intestinal foi então misturado com as Proteínas do Látex e incubado a 37 °C em banho-maria. Aliquotas (200 μ l) foram retiradas em diferentes tempos (0, 2, 4 e 8 h) para serem analisadas em eletroforese e western blotting.

O resultado da reação de hidrólise do homogenato intestinal do inseto *D. peruvianus* e as Proteínas do Látex foi avaliado em géis de poliacrilamida. Para isso foram preparados dois géis de concentração 5 % e de separação 12 %. 20 μ l da mistura foram aplicados no gel de modo que continham 8 μ g das proteínas do látex. A corrida foi feita a 40 mA e 150 V por 30 min e 40 mA a 200 V por duas horas a 4 °C. Um gel foi corado com prata como citado acima e o outro foi utilizado para o ensaio de Western blotting.

Produção de anticorpos policlonais contra as proteínas do látex

Anti-soros contra as Proteínas do Látex foram produzidos em coelhos albinos adultos para posterior utilização em ensaios de Western blotting. A sensibilização inicial foi feita por via intramuscular, com uma emulsão contendo as Proteínas do Látex (10 mg) dissolvidas em 0,5 ml de NaCl 0,15 M e 0,5 ml do adjuvante completo de Freund. Nos dias 21, 36 e 42, após a primeira aplicação, foi administrado subcutaneamente, nas costas do animal, uma dose de 10 mg das Proteínas do Látex em 1 ml de solução salina 0,15 M. Os soros não-ímmunes foram coletados a partir da veia marginal da orelha antes da primeira sensibilização e o anti-soros foram coletados nos dias 36 e 42 de da mesma forma. O sangue coletado foi deixado em repouso por uma hora em estufa a 37 °C e centrifugado em centrífuga de bancada a 5.000 g por 10 min a 25°C. Os sobrenadantes obtidos foram dialisado contra água em membranas de

diálise de “Cut off” 8.000 Da, à temperatura ambiente (1:10, v/v) durante 60 horas e liofilizados (Harboe & Inglid, 1973).

Western Blotting

Para avaliar se as Proteínas do Látex foram resistentes à hidrólise por parte das enzimas proteolíticas do homogenato intestinal do inseto *Dysdercus peruvianus* e do extrato das larvas do *Callosobruchus maculatus*, estas foram submetidas a uma eletroforese, com descrito acima, e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, para análise em Western blotting. As transferências eletroforéticas das proteínas dos géis para as membranas de PVDF (Hybond-P, Amersham Life Science) foram feitas de acordo com o método originalmente descrito por Towbin et al, 1979. Para cada ensaio foram realizadas duas eletroforeses, uma para a visualização após coramento com prata e outra para a transferência. As membranas de PVDF foram tratadas com metanol 100 % por 5 min e depois com tampão de corrida contendo 20 % de metanol por 10 min. Os géis de eletroforese foram colocados em contato com a membrana por 14 horas a 25 °C em tampão de corrida contendo 20 % de metanol. Após esse período, as membranas foram incubadas com uma solução bloqueadora composta de TBS (Tris-HCl 0,05M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,5% e azida sódica 0,02 %) contendo leite desnatado 5 %, sob agitação a 25 °C por 2 horas. Decorrido esse período, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana foi lavada três vezes consecutivas com TBS contendo 1,5 % de leite desnatado. Os anticorpos primários foram adicionados na diluição de 1:30.000 na solução bloqueadora e a incubação foi feita a temperatura ambiente sob agitação por 2 horas. Após três lavagens, com tampão TBS contendo 1,5 % de leite desnatado, cada uma por 2 min e sob agitação, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo na diluição de 1:30.000 (Anti IgG de coelho desenvolvido em cabra conjugado com fosfatase alcalina)

por 2 horas a temperatura de 25 °C. Finalmente, após três lavagens sucessivas idênticas as anteriores, a reação de revelação foi desenvolvida utilizando o substrato 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate/Nitro Blue Tetrazolium (BCIP/NBT) que constitui-se de uma solução de Tris-HCl 0,2 M, pH 9,0, NaCl 0,1 M, MgCl 2,5 mM, NBT 10 mg/ml e BCIP 25 mg/ml. As membranas foram deixadas sob agitação com a solução do substrato até o aparecimento das bandas. A reação foi parada com água destilada.

Ensaio de Inibição da atividade proteolítica cisteínica do extrato total das larvas do C. maculatus e do extrato intestinal de ninfas no 4 ° estágio de Dysdercus peruvianus por proteínas do látex tratadas a 98 °C.

O extrato das larvas do *C. maculatus* e o extrato intestinal de ninfas no 4° estágio do *D. peruvianus* foram obtidos como descrito anteriormente. Para determinação da atividade antiproteolítica dos extratos desses insetos na fração sobrenadante, 100 e 120 µl da solução dos extratos de *C. maculatus* e *D. peruvianus*, respectivamente, foram pré-incubados, por 10 minutos a 37 °C, com 47,2 e 94,4 µg da amostra por 10 min a 37 °C em banho-maria. O restante do ensaio seguiu-se como descrito para inibição da atividade da papaína.

Bioensaio com Ceratitis capitata

Para examinar o efeito das proteínas do látex sobre as larvas de *C. capitata*, uma dieta artificial (500 mg cada) foi preparada a partir de uma mistura de 10,4 % de pó de fibra de cana de açúcar, 3 % de gérmen de trigo, 6,5 % de farinha de trigo, 12 % de açúcar cristal, 9,9 % de levedo, 0,3 % de benzoato de sódio, 0,9 % de HCl e 57 % de água (Gomes et al., 2005). As Proteínas do Látex nas concentrações de 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 %

(p/p) foram adicionadas na dieta e ofertadas a sete larvas no primeiro estágio e mantidas em frascos de vidro escuro a 28 °C e umidade relativa de 60-70 %. Depois de 4 dias, as dietas foram abertas e a massa e o número de larvas vivas determinados. O experimento foi feito com quatro replicatas e a média foi calculada. Dietas controles foram feitas sem adição das proteínas do látex.

Bioensaio com Spodoptera frugiperda e Anticarsia gemmatalis

Dietas artificiais, com aproximadamente 2 g cada, foram preparadas a partir de uma mistura de 125 g de farinha de feijão, 100 g de germen de trigo, 50 g de proteína de soja, 50 g de caseína, 62,5 g de extrato de levedura, 6 g de ácido ascórbico, 3 g de ácido sórbico, 35 g de ágar, 5 g de nipagin, uma cápsula de tetraciclina, 15 ml de uma solução de vitaminas, 6 ml de formol 40 %, a mistura foi então fervida e o volume ajustado para 2 litros com água destilada (Hoffmann-Campo et al, 1985). As proteínas do látex liofilizadas foram dissolvidas em água destilada e uma líquota de 200 µl foi adicionada a dieta, de modo que a concentração final das proteínas do látex fosse 0,1, 0,5 e 1% (p/p) em relação a 2 g de dieta. Dietas controles foram feitas sem adição das proteínas do látex. As dietas foram ofertadas às lagartas no terceiro estágio e mantidas em frascos plásticos de 50 mL, tampadas com papel e mantidas a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas de luz e umidade relativa de 60-70 %.

No experimento com a *A. gemmatalis*, cinco lagartas no 3º estágio foram reunidas em cada frasco, sendo em triplicata. Os valores de massa e sobrevivência foram determinados a partir da média entre as três repetições durante 5 dias seguidos e o início do experimento foi determinado como dia zero.

Como as lagartas de *S. frugiperda* mostraram comportamento de canibalismo, estas foram colocadas isoladamente em cada frasco contendo a dieta artificial. A massa e a

sobrevivência foram determinadas a partir da média de nove lagartas, durante 17 dias seguidos.

Análise estatística

Todos os dados foram examinados utilizando a análise de variância (ANOVA). O teste de múltiplas comparações de Tukey-Kramer foi utilizado para identificar as médias que diferiram no teste de ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados ser estatisticamente diferentes. O programa utilizado foi o GraphPAD InStat DEMO.

III. RESULTADOS

O protocolo de fracionamento do látex de *Calotropis procera* realizado nesse trabalho já havia sido desenvolvido no laboratório, sendo esta parte constituinte de outro trabalho de dissertação em fase de conclusão. Este procedimento foi mostrado ser muito eficiente em separar as proteínas totais do látex de metabólitos de baixa massa molecular e principalmente de sua fração poliisopreno, a borracha. A fração protéica recuperada nesse procedimento foi alvo de todas as análises bioquímicas, enzimáticas e biológicas realizadas neste trabalho.

Entre os componentes do látex de *C. procera*, o principal constituinte é a borracha, representando 85 % da matéria seca, enquanto as proteínas solúveis representam 10 %. A fração proteínas do látex, obtida após diálise contra água e centrifugação, apresentou um valor médio de 8,18 mg/ml e após liofilização 71,33 % (p/p) de proteínas solúveis. Essa fração é constituída de proteínas com diversas massas moleculares, variando de 10-66 KDa, prevalecendo as de aproximadamente 25-30 KDa (Figura 4).

As proteínas do látex não apresentaram atividade α -amilásica nem a capacidade de inibir a α -amilase, tripsina e quimotripsina, mesmo quando testado 200 μ g de proteína.

Quando as proteínas do látex foram avaliadas para inibir a quimotripsina, foi notado que houve um aumento da atividade azocaseinólítica. Dessa forma, a fração parece não conter inibidor para essa enzima e sim proteases capazes de degradar a azocaseína, assim como a quimotripsina.

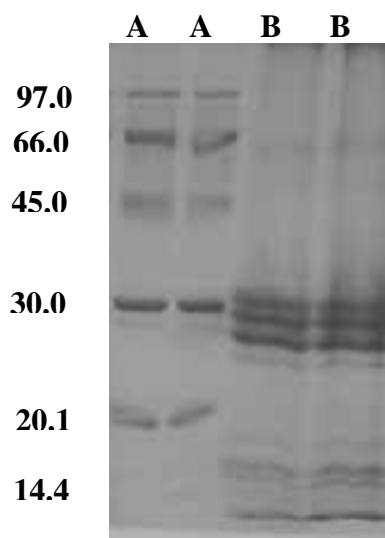


Figura 4: Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) da fração proteínas do látex de *Calotropis procera*. (A) Marcadores de massa molecular: Fosforilase B (97.0 KDa), Albumina Sérica Bovina (66.0 KDa), Ovalbumina (45.0 KDa), Anidrase Carbônica (30.0 KDa), Inibidor de Tripsina (20.1 KDa), Alfa-Lactalbumina (14.4 KDa). (B) proteínas do látex de *C. procera* (30 µg).

Em vista disso, as proteínas do látex foram avaliadas quanto à capacidade de degradar substratos específicos como BapNA e BANA, além da azocaseína, e com isso determinar quais os tipos de enzimas proteolíticas estão presentes na amostra.

As proteínas do látex não foram capazes de degradar o substrato BapNA mesmo utilizando 200 µg de proteína, mostrando que não há enzimas serínicas do tipo tripsina, mas foram capazes de degradar o BANA que é um substrato específico para proteinases cisteínicas, o que foi confirmado quando a amostra foi incubada com E-64, que levou a 100 % de inibição da atividade proteolítica das proteínas do látex (Tabela 1). As proteínas do látex mostraram diferentes atividades específicas utilizando azocaseína em pH 6,0 e 7,5, que foram

de 18,6 e 28,9 UA/mg de proteína, e foram inibidas 70 e 86 % por E-64 e TPCK, respectivamente (Tabela 1).

Esses resultados mostram que o látex de *C. procera* possui enzimas cisteínicas e sérnicas do tipo quimotripsina, pois tiveram a capacidade de degradar os substratos BANA e azocaseína em pH 7,5 e serem inibidas por E-64 e TPCK, respectivamente.

Tabela 1: Avaliação da atividade proteolítica da fração protéica do látex de *C. procera* para diferentes substratos e na presença de inibidores.

Substratos	pH	Atividade enzimática /mg de proteína	Inibidores Específicos	Percentagem de Inibição
Azocaseína 1%	6,0	18,60 ± 0,11	E-64	70,15
Azocaseína 1%	7,5	28,90 ± 0,83	TPCK	86,56
BapNA	7,5	ND	-	-
BANA	6,0	10,6 ± 0,72	E-64	100,00

ND= Não Detectado

A partir dos dados preliminares que mostraram que as proteínas do látex apresentam proteinases do tipo cisteínicas, as proteínas foram avaliadas em eletroforeses contendo gelatina, com o objetivo de se identificar as bandas protéicas referentes a essas enzimas.

As proteínas do látex apresentaram atividade proteolítica em gel (Figura 5), o que confirmou a atividade *in vitro* (Tabela 2), mas não foi possível identificar as bandas protéicas referentes às proteinases.

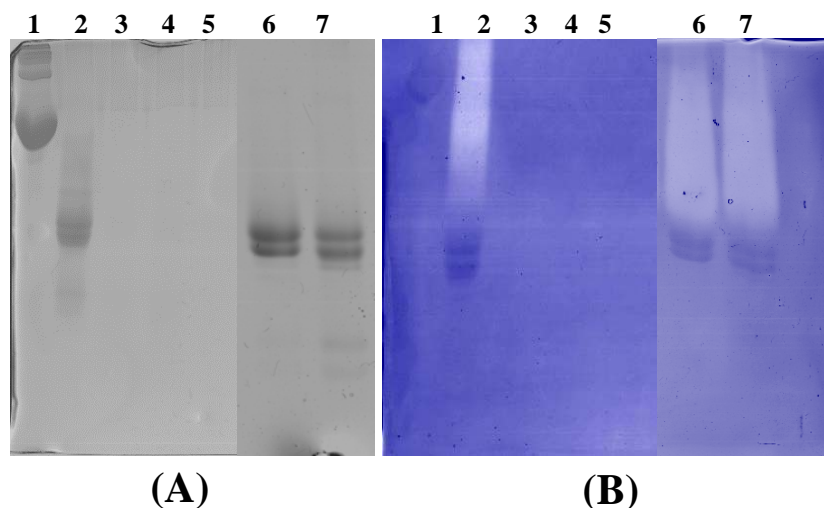


Figura 5: (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) e (B) Zimograma para proteases cisteínicas das proteínas do látex. (1) BSA; (2) proteínas do látex não aquecidas; (3) proteínas do látex aquecidas a 98 C por 30 min; (4) sobrenadante; (5) precipitado; (6) PI-Q e (7) PII-Q. Foram adicionados 25 μ L em cada poço a partir de uma solução de 1 mg/ml em tampão de amostra sem agente redutor.

Na realidade, vários zimogramas para avaliar a atividade proteolítica em gel contendo gelatina foram realizados. O fato é que a atividade proteolítica do látex é de tal forma intensa que não foi alcançado um resultado do qual se pudesse inferir bandas protéicas diretamente relacionadas à proteólise. Quando essa amostra foi previamente aquecida a 98 °C por 30 min, a atividade proteolítica em gel foi perdida totalmente (Figura 5).

As proteínas do látex foram avaliadas quanto à capacidade de ligação à quitina. Para isso, amostras de proteínas do látex 2 mg/ml foram submetidas a cromatografias em coluna de quitina. As proteínas foram divididas em dois picos, denominados de PI-Q, contendo as proteínas que não interagiram com a coluna, e PII-Q representando as proteínas que de alguma forma interagem e ficaram retidas na coluna (Figura 6a). O pico não retido na coluna

(PI-Q) foi eluído com a mesma solução de equilíbrio, NaCl 0,15 M, e o pico retido (PII-Q), eluído com ácido acético 1 M. Os picos PI-Q e PII-Q apresentam proteínas com massas moleculares aparentes muito parecidas, mas se destacam três bandas no PII-Q que não aparecem do PI-Q, duas com alta massa molecular e uma com massa molecular em volta de 25 KDa, apresentadas por setas (Figura 6b).

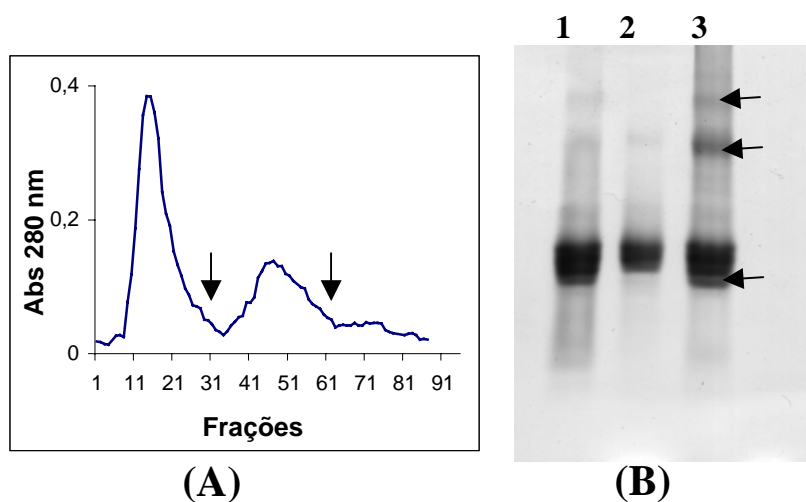


Figura 6: (A) Perfil cromatográfico das proteínas do látex em coluna de quitina.. Foram aplicados em cada cromatografia 2 mg de proteínas dissolvidas em 1 ml de NaCl 0,15 M. O pico não retido (PI-Q) foi eluído com a mesma solução de equilíbrio da coluna (NaCl 0,15 M) e o pico retido (PII-Q), eluído com ácido acético 1 M. Fluxo de 15 ml/h e frações de 1 ml. As setas indicam quando as soluções ácido acético 1 M e HCl 0,1 N foram aplicadas, respectivamente. (B) Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) das proteínas do látex (1), PI-Q (2) e PII-Q (3). Foram aplicados em cada poço 20 µg de proteína, sem agente redutor.

As proteínas do látex apresentaram atividade quitinásica *in vitro* sendo de 59,28 nKat/ml (Figura 7a) e em gel contendo glicol quitina (Figura 7b). O zimograma mostra a presença de pelo menos três quitinases no látex. Os picos obtidos após cromatografia em coluna de quitina PI-Q e PII-Q também apresentaram atividade quitinásica em gel. O

zimograma mostra que no látex apresenta pelo menos três quitinases com massas moleculares aparentes de aproximadamente 25-30 KDa (Figura 7b).

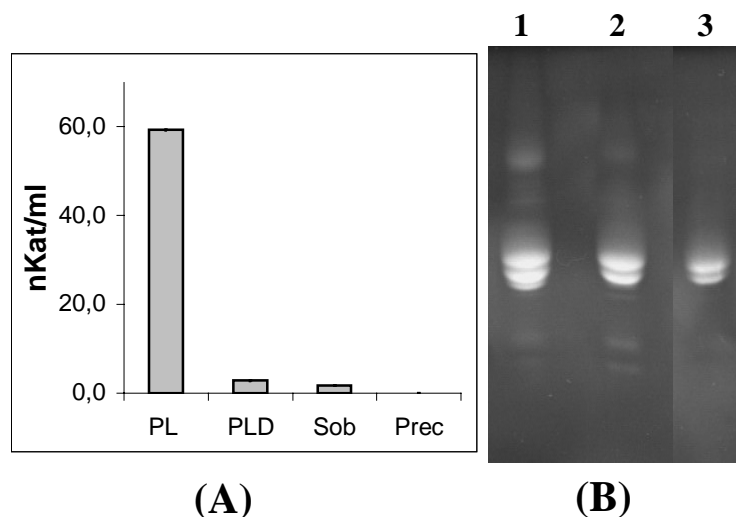


Figura 7: (A) Atividade quitinásica *in vitro* das proteínas do látex, proteínas do látex aquecidas a 98 °C por 30 min (PLD), sobrenadante (sob) e precipitado (Prec), obtidos após centrifugação das proteínas do látex aquecidas. Foi utilizado uma líquota de 250 µl a partir de uma solução de 1 mg/ml. (B) Zimograma para quitinase. Proteínas do látex (1), PI-Q (2) e PII-Q (3). Foi aplicado uma líquota de 30 µl a partir de soluções de 3 mg/ml.

Depois de caracterizar as atividades das proteínas do látex com respeito a atividades enzimáticas endógenas de proteases e atividade quitinolítica, além da possível presença de inibidores para enzimas proteolíticas, a fração foi avaliada quanto à capacidade de produzir efeitos inseticidas em diferentes grupos de insetos, todos relacionados a problemas de infestação de plantas cultivadas de valor agrícola. As proteínas foram avaliadas em vários bioensaios distintos e o objetivo maior era investigar se haveria efeitos deletérios sobre tais

modelos estudados, no intuito de especular sobre uma atividade de defesa destas proteínas no fluido laticífero de *Calotropis procera*.

O primeiro grupo de bioensaios envolveu dois gorgulhos do feijão de corda com características bem similares quanto ao hábito alimentar e prevalência de ataque sobre grãos em armazenamento.

No ensaio com *Callosobruchus maculatus*, sementes com percentual de 0,1 % das proteínas do látex reduziram significativamente a sobrevivência e peso das larvas ($p < 0,05$). No ensaio com *Zabrotes subfasciatus*, o mesmo perfil foi verificado para a sobrevivência larval, porém as larvas tiveram o peso significativamente reduzido em sementes com 0,05 % de proteínas do látex (Figura 8).

A sobrevivência das larvas do *C. maculatus* caiu de 100 para 2,63 % quando as proteínas do látex estavam presentes em uma concentração de 0,5 %. No caso do *Z. subfasciatus*, não houve sobrevivência de larvas nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5 e 1 % das proteínas do látex (Figura 8).

O peso das larvas desses dois insetos foi também afetado. Na concentração de 0,5 % de proteínas do látex, o peso médio das larvas do *C. maculatus* foi de 0,43 mg, enquanto as das larvas controle foi de 4,64 mg. Nenhuma larva de *Z. subfasciatus* se desenvolveu em uma concentração cinco vezes menor (0,1 %).

Os resultados com o controle contendo BSA 1 % não diferiram ($p > 0,05$) com os do controle contendo apenas a farinha do feijão, para ambos os insetos. As larvas do *C. maculatus* desenvolvidas em sementes contendo BSA 1 % apresentaram sobrevivência de 95,3 % e peso de 3,85 mg, enquanto as do inseto *Z. subfasciatus* foram de 100 % e 2,06 mg. Isso demonstra que o simples fato de se adicionar uma proteína exógena na dieta do inseto não causa efeito deletério.

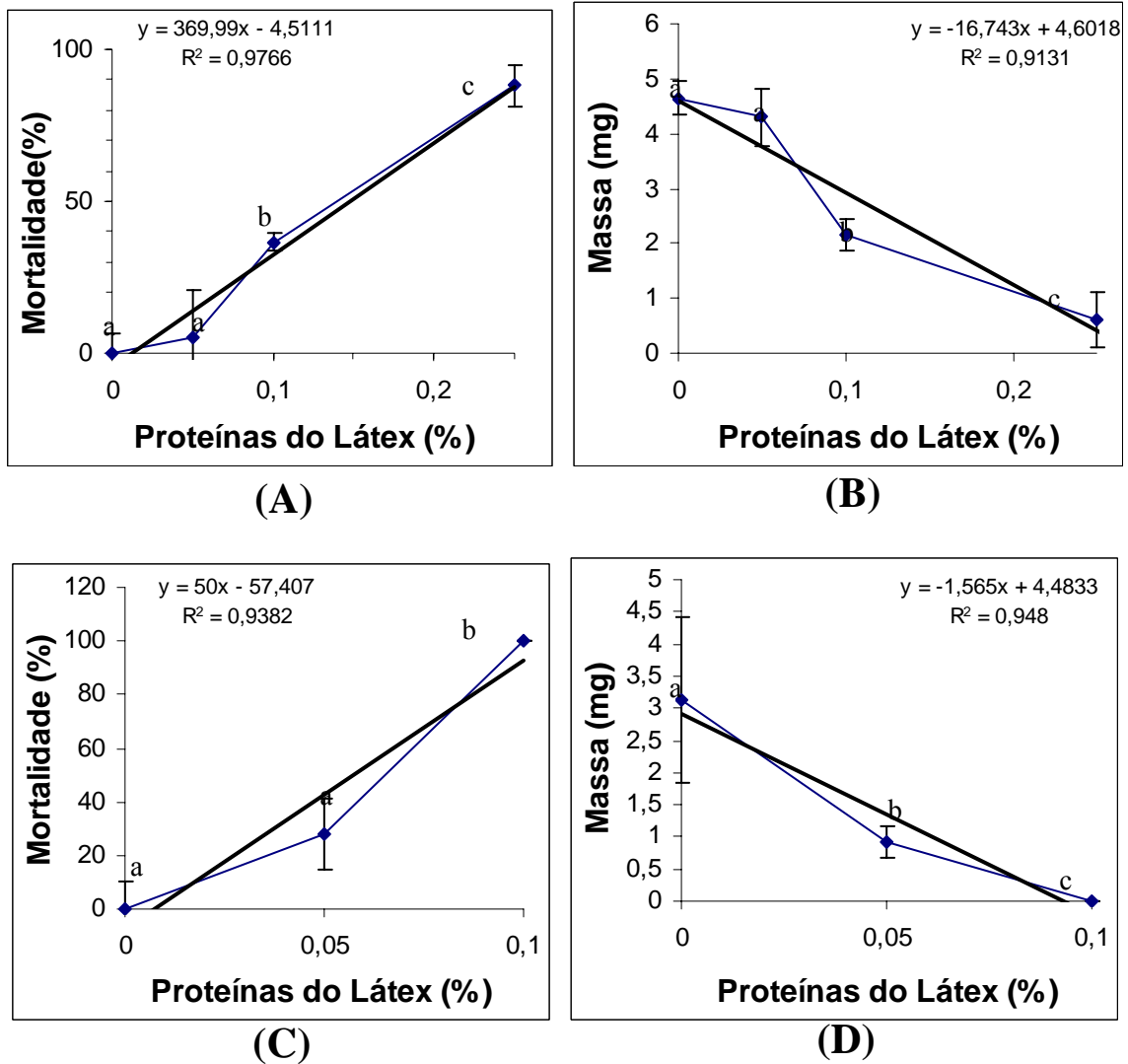


Figura 8: Avaliação das proteínas do látex de *C. procera* na sobrevivência e na massa das larvas do *C. maculatus* (A) e (B) e do *Zabrotes subfasciatus* (C) e (D), respectivamente. Valores com a mesma letra não são significamente diferentes ($p > 0,05$). Teste utilizado foi o de múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

O modelo de infestação de sementes artificiais foi muito problemático com o inseto *Z. subfasciatus*, visto que os mesmos apresentavam resistência em ovipositar nas referidas sementes e embora houvesse eclosão de ovos, poucas larvas se desenvolviam, o que

comprometia a análise estatística dos dados. Deste modo apenas os insetos de *C. maculatus* foram avaliados nos ensaios subsequentes.

O tempo de desenvolvimento e emergência de adultos foram os parâmetros avaliados no novo bioensaio. Os resultados estão apresentados na Figura 9.

O percentual de emergência e o tempo médio de desenvolvimento de *C. maculatus* desenvolvidos em sementes contendo as proteínas do látex foram muito afetados, quando comparados com aqueles desenvolvidos em sementes contendo apenas farinha de feijão (Figura 9a e b). A concentração de 0,1 % das proteínas do látex inibiu 50 % a emergência e aumentou o tempo de desenvolvimento em cinco dias do *C. maculatus*, quando comparado com o controle.

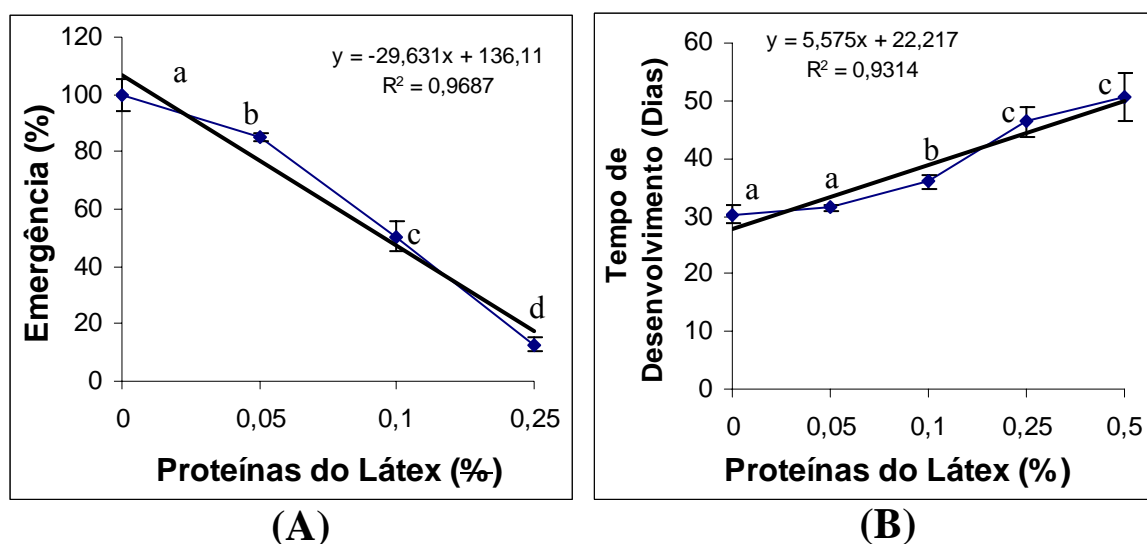


Figura 9: Avaliação das proteínas do látex de *Calotropis procera* no percentual de emergência (A) e no tempo de desenvolvimento (B) do inseto *Callosobruchus maculatus*.

Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Teste utilizado foi o de múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

Em uma concentração 5 vezes maior, apenas 3,83 % dos insetos conseguiram se desenvolver. Além disso, o tempo de desenvolvimento foi aumentado em 20 dias. Na concentração de 1 % nenhum inseto conseguiu se desenvolver, mesmo após 120 dias. Estes

dados mostram que as proteínas do látex são extremamente deletérias ao desenvolvimento deste inseto.

Um novo bioensaio foi realizado para avaliar o comportamento de insetos nascidos de sementes contendo proteínas do látex quando induzidos a ovipositar em novas sementes contendo proteínas do látex na mesma concentração em que emergiram. Foram utilizadas sementes contendo proteínas do látex nas proporções de 0,05; 0,1 e 0,25 %, pois era sabido que insetos nasceriam destas sementes. Como controle, parte dos insetos nascidos destas sementes foi colocada para ovipositar em sementes controle (sem proteínas do látex).

As emergências dos insetos nascidos nas sementes com concentrações 0,05, 0,1 e 0,25 % de proteínas do látex foram de 68,72; 54,87 e 20,05 %, respectivamente, enquanto a do controle foi de 94,84 % (Tabela 2). Insetos nascidos dessas sementes (F_1) foram colocados para ovipositar em sementes contendo as proteínas do látex na mesma concentração em que se desenvolveram. Os percentuais de emergência de insetos dessa geração (F_2) foram de 65,42; 43,66 e 6,35 nas sementes contendo 0,05; 0,1 e 0,25 % de proteínas do látex, respectivamente. Esses resultados mostram o pequeno efeito acumulativo das proteínas do látex sobre esse inseto, mas não foram estatisticamente diferentes ($P > 0,05$).

Os insetos da geração F_2 que se desenvolveram em sementes contendo apenas farinha de feijão, cujas gerações F_1 se desenvolveram em sementes contendo as proteínas do látex, tiveram os percentuais de emergência iguais ao dos insetos desenvolvidos em sementes controle (Tabela 2).

Os insetos que se desenvolveram em sementes contendo as proteínas do látex por duas gerações seguidas tiveram seus tempos de desenvolvimento aumentados em relação àqueles que se desenvolveram em apenas uma geração, sendo estatisticamente diferentes nas concentrações de 0,1 e 0,25 % das proteínas do látex (Tabela 2).

O terceiro parâmetro utilizado para avaliar o efeito acumulativo das proteínas do látex sobre esse inseto foi o peso destes insetos recém emergidos das sementes. O peso dos insetos machos das gerações F₁ e F₂ não diferiram em nenhuma das concentrações de proteínas do látex avaliadas, embora as massas das fêmeas da geração F₁ tenham sido diferentes nas concentrações de 0,05 e 0,25 %, quando comparadas com o controle. Entretanto, quando os insetos emergidos da geração F₁ dessas concentrações foram colocados para ovipositar em sementes controle os insetos emergidos apresentaram massa igual ao do controle (Tabela 3).

Esses resultados sugerem que as proteínas do látex podem afetar o desenvolvimento do *C. maculatus* em três parâmetros distintos: aumentando o tempo de desenvolvimento e diminuindo o percentual de emergência e o peso de insetos fêmeas.

Devido aos indícios mostrados no experimento anterior de que as proteínas do látex poderiam ter um efeito acumulativo sobre o desenvolvimento dos insetos *C. maculatus*, outro experimento foi feito em que os mesmos parâmetros anteriores foram avaliados durante seis gerações seguidas, com o objetivo de avaliar se uma exposição mais prolongada e contínua às proteínas do látex produziria efeitos tóxicos mais graves nas gerações sucessivas do inseto.

A concentração escolhida foi a de 0,05 %, pois foi mostrado causar uma pequena diminuição no percentual de emergência (Figuras 9) desse inseto.

Tabela 2: Avaliação das proteínas do látex de *C. procera* sobre o percentual de emergência e o tempo médio de desenvolvimento das gerações F₁ e F₂ do inseto *C. maculatus*.

Concentração % (p/p)	Percentual de emergência			Tempo médio de desenvolvimento (Dias)		
	Geração F1	Geração F2	Controle F2	Geração F1	Geração F2	Controle F2
Controle	94,8 ± 12,02 ^a	100 ± 8,96 ^a	-	30,4 ± 1,41 ^a	32,1 ± 0,46 ^a	-
0,05	68,7 ± 4,18 ^b	65,4 ± 9,1 ^b	98,7 ± 8,01 ^a	35,2 ± 1,56 ^b	39,1 ± 1,27 ^b	32,6 ± 0,57 ^a
0,1	54,8 ± 6,21 ^c	43,6 ± 10,38 ^c	86,6 ± 13,37 ^a	36,8 ± 1,54 ^c	42,4 ± 3,88 ^d	31,4 ± 1,43 ^a
0,25	20,0 ± 1,37 ^d	6,3 ± 2,09 ^{d,e}	87,1 ± 9,46 ^a	48,3 ± 2,34 ^e	57,9 ± 3,13 ^f	30,3 ± 0,7 ^a
0,5	2,7 ± 1,78 ^e	-	-	50,6 ± 4,07 ^e	-	-

*Valores com a mesma letra não são significamente diferentes (p>0,05). Teste utilizado foi o de múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

Tabela 3: Peso dos insetos machos e fêmeas das gerações F₁ e F₂ do *C. maculatus* emergidos das sementes contendo as proteínas do látex de *C. procera*.

Concentração % (p/p)	Peso dos insetos machos (mg)*			Peso dos insetos fêmeas (mg)*		
	Geração F1	Geração F2	Controle F2	Geração F1	Geração F2	Controle F2
Controle	1,17 ± 0,32 ^a	1,33 ± 0,43 ^a	-	2,46 ± 0,66 ^a	3,00 ± 0,81 ^a	-
0,05	1,38 ± 0,43 ^a	1,29 ± 0,37 ^a	1,42 ± 0,33 ^a	3,01 ± 0,68 ^b	1,78 ± 0,32 ^c	2,73 ± 0,59 ^{a,b}
0,1	1,53 ± 0,52 ^a	1,29 ± 0,36 ^a	1,32 ± 0,27 ^a	2,85 ± 0,66 ^a	2,74 ± 0,76 ^a	3,17 ± 0,64 ^a
0,25	1,05 ± 0,4 ^a	Nd**	1,35 ± 0,27 ^a	2,13 ± 0,8 ^d	Nd**	2,71 ± 0,46 ^a

* Valores obtidos a partir da média de 20 insetos. ** Não determinado, devido à pequena quantidade de insetos. Valores com a mesma letra não são significamente diferentes (p>0,05). Teste utilizado foi o de múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

Mesmo após seis gerações os parâmetros testados não apresentaram diferença significativa quando comparados com o controle da mesma geração contendo somente farinha de feijão (Figura 10). Esses resultados não foram surpreendentes, pois o efeito causado pelas proteínas do látex na concentração de 0,05 % sobre esse inseto é marginal. Isso demonstra que em concentrações sub-letais, as proteínas do látex não têm efeitos sobre a fecundidade e fertilidade dos adultos, também demonstra que as larvas não seqüestram as proteínas no organismo.

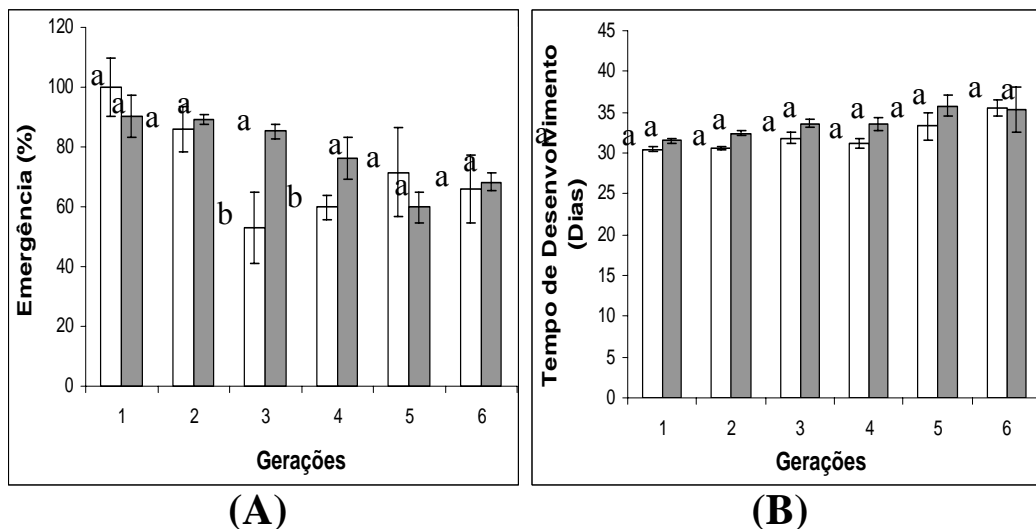


Figura 10: Porcentual de emergência (A) e Tempo de desenvolvimento (B) dos insetos *Callosobruchus maculatus* desenvolvidos em sementes artificiais contendo apenas farinha de feijão ou 0,05 % das proteínas do látex de *Calotropis procera* por 6 gerações seguidas. Valores com a mesma letra não são significamente diferentes ($p > 0,05$). Teste utilizado foi o de múltiplas comparações de Tukey-Kramer. Barras preenchidas representam o grupo experimental 0,05 % e as barras vazias o controle sem as proteínas do látex.

Com o objetivo de avaliar se o efeito tóxico encontrado na fração de estudo era de origem protéica, a fração foi aquecida por 30 min a 98 °C em banho-maria e liofilizada. Essa amostra foi então adicionada à farinha de feijão em uma concentração de 0,1 % (p/p), para avaliar a massa e a sobrevivência das larvas de *C. maculatus*.

A amostra mesmo aquecida mostrou efeito deletério sobre as larvas do *C. maculatus*. A massa média das larvas desenvolvidas em sementes contendo as proteínas do látex aquecidas foi de 2,06 mg, enquanto as do controle foram de 4,45 mg (Figura 11). Em uma segunda estratégia, quando as proteínas do látex aquecidas foram centrifugadas elas foram separadas em um sobrenadante e um precipitado. Essas duas frações foram liofilizadas e adicionadas separadamente à dieta do *C. maculatus*, na concentração de 0,1 % (p/p), como anteriormente.

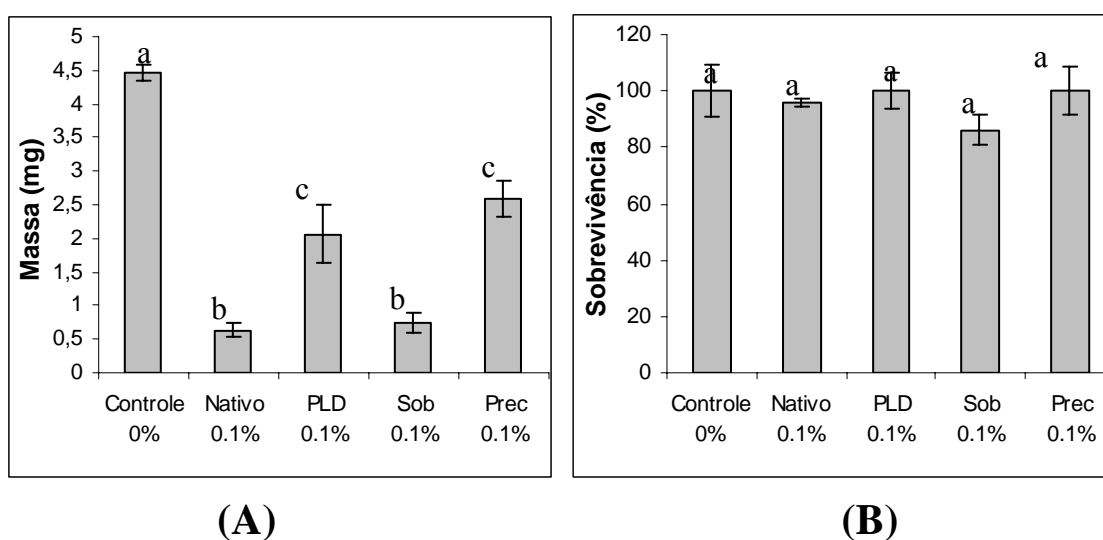


Figura 11: Avaliação das proteínas do látex de *C. procerca* aquecidas por 30 min a 98 °C em banho-maria no desenvolvimento do *C. maculatus*. **(A)** Massa e **(B)** sobrevivência das larvas. Cont = Controle; PLN = Proteínas do látex não aquecidas; PLA = Proteínas do látex aquecidas; Sob = Sobrenadante; Prec = Precipitado, nas concentrações de 0,1 % (p/p). Valores com a mesma letra não são significamente diferentes ($p > 0,05$). Teste utilizado foi o de múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

A Figura 11 mostra que a amostra do precipitado teve um efeito tóxico menor sobre a massa das larvas se comparada com as frações proteínas do látex não aquecidas.

O ensaio com o sobrenadante produziu efeitos tóxicos sobre as larvas estaticamente iguais às proteínas do látex não aquecidas. Este dado foi intrigante, pois revelou que um possível componente envolvido nos efeitos deletérios aos insetos em desenvolvimento produzia tais efeitos mesmo após aquecimento da amostra durante 30 minutos a 98 °C. Assim, tal (ais) molécula(s) deve(m) ser termoestável (eis). É relevante lembrar que este aquecimento eliminou por completo a atividade proteolítica. Portanto, as proteinases provavelmente não têm relação com o efeito inseticida.

O fato da amostra do precipitado ainda ter tido efeito sobre a massa das larvas pode ser devido à contaminação do principio ativo que está presente na fração sobrenadante e que pode contaminar o precipitado no processo de coleta após a centrifugação. O percentual de sobrevivência das larvas não foi afetado por nenhuma das frações, quando comparado com o controle.

A mesma amostra aquecida que teve efeito sobre as larvas do *C. maculatus* foi avaliada quanto à capacidade de se ligar à quitina, da mesma forma feita com as proteínas do látex não aquecidas. As proteínas do látex aquecidas mostraram a capacidade de se ligar à quitina (Figura 12a), o que foi também observado com a amostra sobrenadante (Figura 12b), mas em muito menor proporção que a amostra não aquecida. Essa diferença no perfil cromatográfico pode ter sido ocasionada pelo fato das proteínas que se ligam à quitina terem precipitado ou por elas terem perdido a capacidade de se ligar à quitina, provavelmente devido a uma mudança na sua conformação tridimensional.

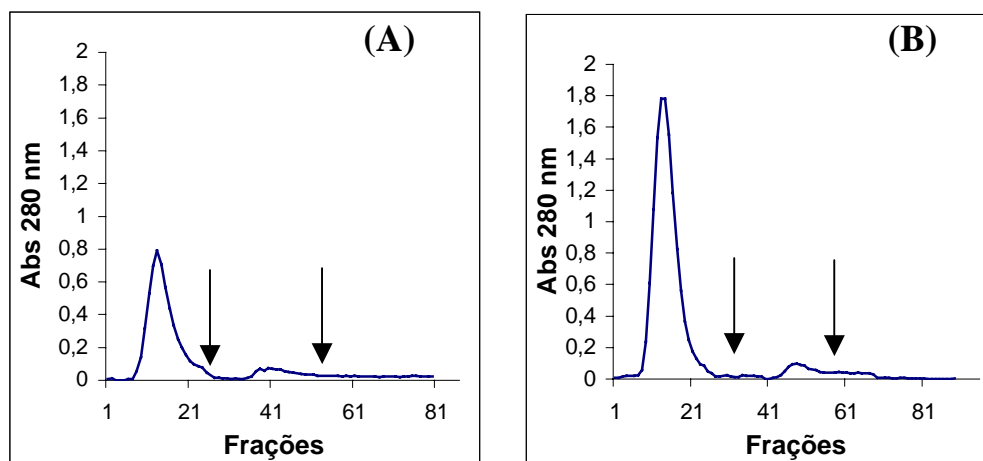


Figura 12: Perfil cromatográfico em coluna de quitina das proteínas do látex aquecidas (A), e sobrenadante (B). Foram aplicados em cada cromatografia 2 mg de proteínas em 1 ml de NaCl 0,15 M.. A coluna foi equilibrada com NaCl 0,15 M. O pico não retido (PI) foi eluído com o mesmo tampão de equilíbrio da coluna e o pico retido (PII) foi eluído com Ácido Acético 1 M. Fluxo de 15 ml/h e frações de 1 ml. Abs 280 nm. As setas indicam quando as soluções de ácido acético 1 M e HCl 0,1 N foram aplicadas, respectivamente.

As proteínas do látex aquecidas além de terem perdido a maior parte da capacidade de ligar-se à quitina, perderam também as atividades enzimáticas encontradas quando elas não foram aquecidas. A atividade quitinásica foi perdida em aproximadamente 95 % (Figura 7a) e nenhuma atividade proteolítica em gel foi observada (Figura 5b). Mesmo assim, essa fração continuou causando efeitos deletérios para as larvas de *C. maculatus*.

Em vista desses resultados, as proteínas do látex foram submetidas à digestão com pronase, enzima proteolítica que cliva inespecificamente ligações peptídicas, com o objetivo de avaliar se o efeito deletério encontrado era realmente de origem protéica.

A pronase digeriu parcialmente as proteínas do látex após 24 horas de incubação, como mostra a figura 13.

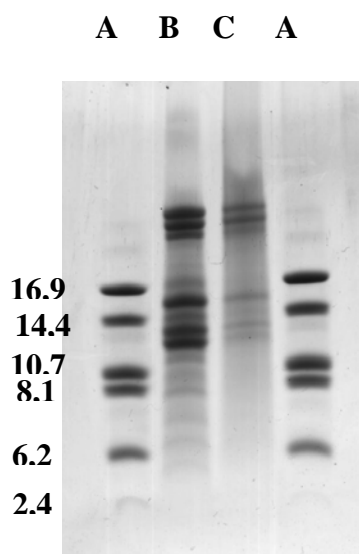


Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida 16,5% da hidrólise das proteínas do látex de *Calotropis procera* sobre diferentes tempos com a protease de *Streptomyces griseus*. (A) Marcadores de massa molecular; (B) Proteínas do látex sem digestão e (C) Proteínas do látex após 24 h de digestão com a pronase. Foram adicionados 40 µg de proteína em cada poço.

As proteínas do látex parcialmente digeridas pela pronase foram então liofilizadas e adicionadas à farinha de feijão a uma concentração de 0,1 % (p/p) e avaliada a massa e a sobrevivência das larvas do *C. maculatus*. A massa média das larvas desenvolvidas em sementes contendo as proteínas do látex foi de $1,20 \pm 0,37$ mg, significativamente igual às das larvas desenvolvidas em sementes contendo as proteínas do látex incubadas com a pronase por 24 h, que foi de $1,36 \pm 0,36$ mg. A sobrevivência das larvas igualmente não foi afetada. Esse resultado supõe que a(s) molécula(s) responsável (eis) pelo(s) efeito(s) deletério(s) encontrado (s) é (são) resistente (s) a hidrólise pela pronase. Essa amostra mesmo após tratada com a pronase foi capaz de inibir a atividade proteolítica da papaína. Com isso, esse resultado

reforça que o inibidor presente no látex pode ser o principal responsável pelo efeito deletério encontrado nas proteínas do látex para o inseto *C. maculatus*.

Quando as frações PI-Q e PII-Q obtidas após cromatografia em coluna de quitina com as proteínas do látex não aquecidas foram avaliadas sobre o desenvolvimento do *C. maculatus*, todo o efeito deletério sobre as larvas desse inseto foi centrado na fração que não se liga à quitina (Figura 14). O PI-Q reduziu a massa das larvas em 98 % e a sobrevivência em 40 %, enquanto o PII-Q não apresentou nenhum efeito sobre os dois parâmetros avaliados (Figura 14).

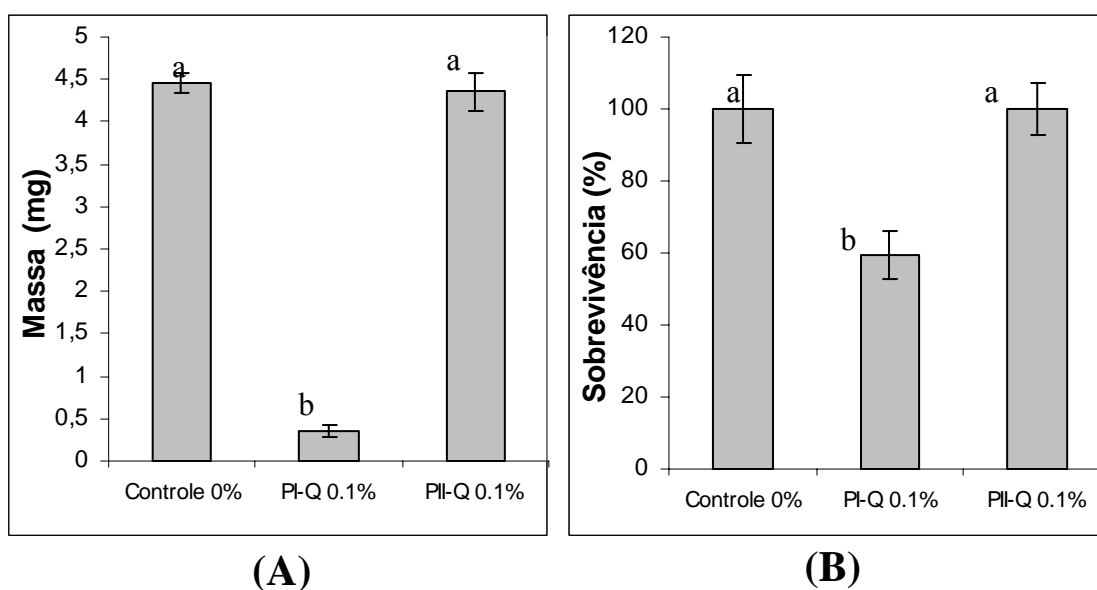


Figura 14: Avaliação dos picos PI-Q e PII-Q obtidos após cromatografia em coluna de quitina com as proteínas do látex não aquecidas de *C. procerca* na (A) massa e (B) sobrevivência das larvas do *C. maculatus*. Valores com a mesma letra não são significamente diferentes ($p > 0,05$). Teste utilizado foi o de múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

Esses resultados sugerem que enzimas presentes no látex, como as proteinases e quitinases não são as principais responsáveis pelo efeito deletério mostrado no PI-Q e nas proteínas do látex aquecidas sobre o *C. maculatus*, já que as duas frações PI-Q e PII-Q apresentam ambas as atividades enzimáticas e na amostra aquecida ambas as atividades foram perdidas (Figuras 5 b e 7 b).

A estratégia seguida para investigar a ação das proteínas do látex sobre *C. maculatus* envolveu a análise de susceptibilidade das proteínas do látex a digestão pelo extrato larval.

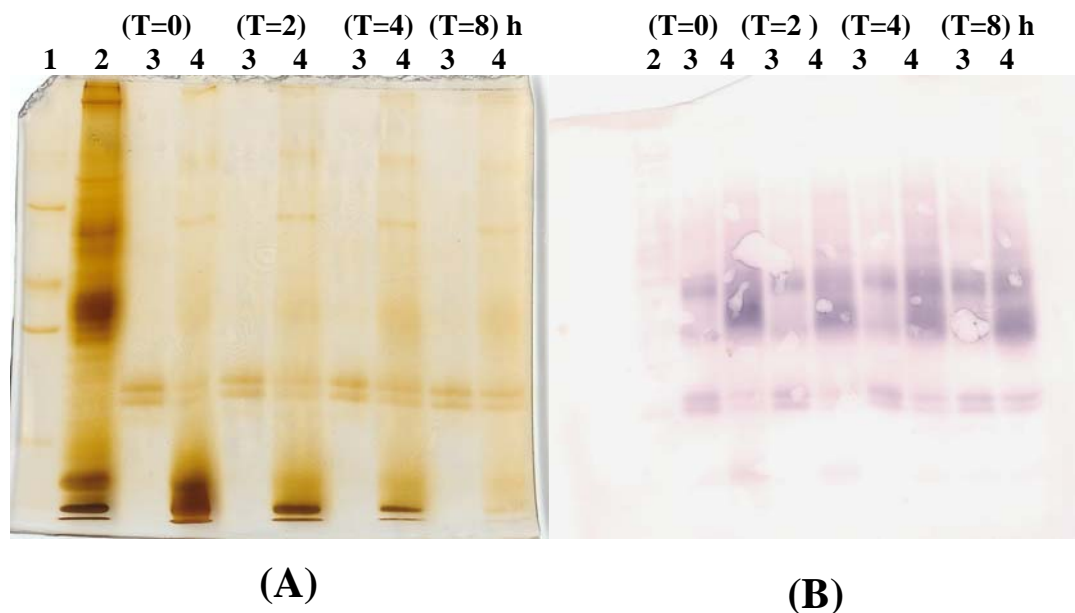


Figura 15: (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) das proteínas do látex de *Calotropis procera* quando incubadas a 37 °C por diferentes tempos com o homogenato de larvas do inseto *Callosobruchus maculatus*. 1= Marcadores; 2= Homogenato (74 µg); 3= Látex (8µg); 4= Látex + Homogenato. (B) Western blotting. A membrana de PVDF foi incubada com anticorpos anti-proteínas do látex e revelados com anticorpos secundários de cabra anti-IgG de coelho marcados com fosfatase alcalina.

As proteínas do látex resistiram à proteólise frente às proteases da larva do *C. maculatus*, mesmo após 8 horas de incubação, como mostra o Western blotting (Figura 15). Esse resultado mostra que as proteínas do látex ao resistirem à proteólise poderiam livremente agir sobre o intestino dessas larvas e causar o forte efeito deletério encontrado nos bioensaios.

Além das proteínas do látex serem resistentes a proteólise, elas foram capazes de degradar as proteínas das larvas desse inseto (Figuras 15a), sendo necessários apenas alguns minutos, já que no tempo zero os perfis protéicos das larvas praticamente desapareceram.

A hidrólise foi ocasionada realmente pelas proteases do látex e não por uma auto-hidrólise do homogenato das larvas. Isso pode ser demonstrado na Figura 16, onde mostra o perfil protéico intacto do homogenato das larvas do *Z. subfasciatus* em diferentes tempos de incubação sem as proteínas do látex, assim como foi o do *C. maculatus* (dado não mostrado).

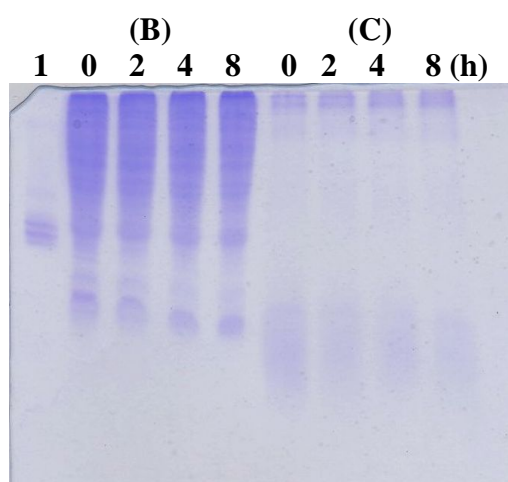


Figura 16: Eletroforese em gel de poliacrilamida (15 %) das proteínas do látex de *Calotropis procera* quando incubadas a 37 °C por diferentes tempos com o homogenato de larvas do inseto *Zabrotes subfasciatus*. 1= proteínas do látex (8μg); (B) Homogenato (120 μg); (C) Látex + Homogenato, incubado por diferentes tempos.

As proteínas do látex causaram efeito tóxico sobre as ninfas do *Dysdercus peruvianus*, sendo a massa afetada apenas no 14° dia de experimento, nas concentrações de 1 e 2 %, cujos valores médios foram de 22,93 mg e 19,69 mg, respectivamente enquanto a massa média das

ninfas alimentadas sem as proteínas do látex foi de 43,82 mg (Figura 17 d). A sobrevivência não foi afetada em nenhuma concentração testada ($p>0,05$).

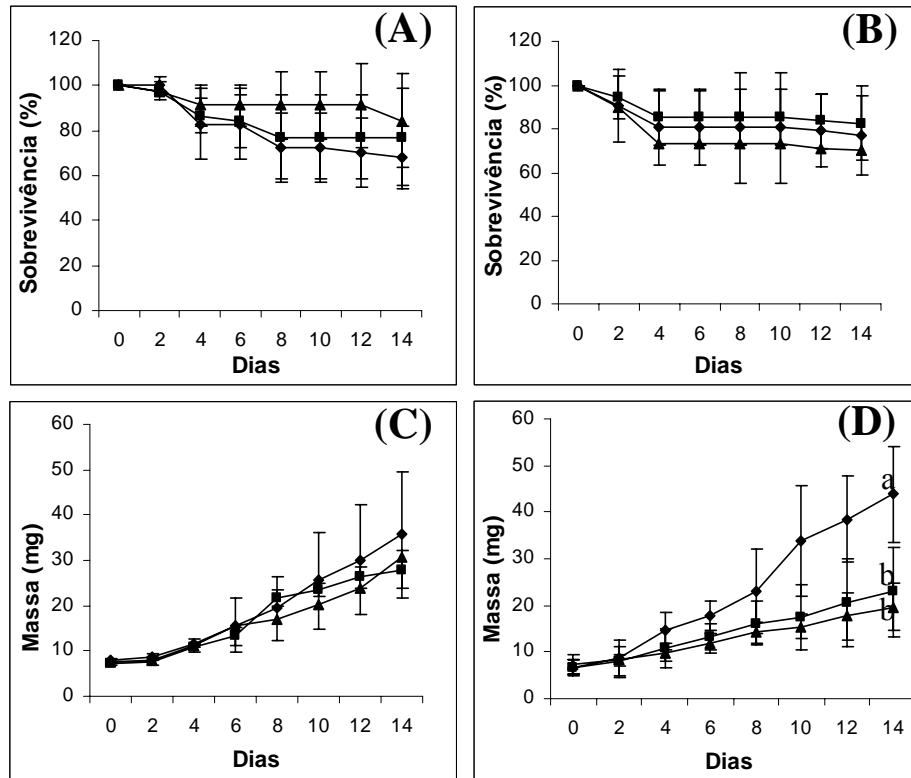


Figura 17: Avaliação das proteínas do látex de *Calotropis procera* na sobrevivência (A e B) e na massa (C e D) das ninfas do inseto *Dysdercus peruvianus*. Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p>0,05$). Teste utilizado foi o de múltiplas comparações de Tukey-Kramer. (A e C) —◆— Controle 1, —■— Látex 0,1%, —▲— Látex 0,5%; (B e D) —◆— Controle 2, —■— Látex 1%, —▲— Látex 2% .

Assim como nas ninfas, nenhum efeito sobre a sobrevivência dos insetos adultos machos foi observado na concentração de 1 % (Figura 18). No 16° dia, a sobrevivência dos

insetos adultos alimentados com a dieta controle foi de 93,33 %, enquanto a sobrevivência dos insetos alimentados com uma dieta contendo as proteínas do látex 1 % foi de 96,66.

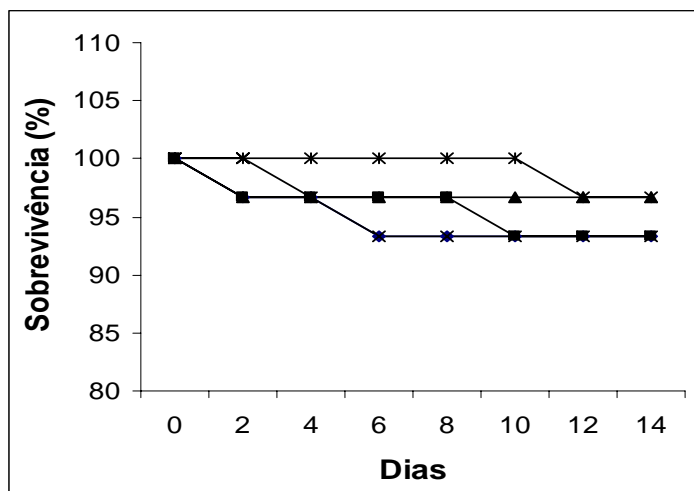


Figura 18: Avaliação das proteínas do látex de *C. procera* sobre a sobrevivência dos insetos adultos machos de *D. peruvianus*. —●— Controle, —■— Látex 0,1%, —▲— Látex 0,25%, —*— Látex 0,5% —*— Látex 1%.

As proteínas do látex também foram resistentes às proteases intestinais de ninfas de *D. peruvianus*, mesmo após 8 horas de incubação, mas o interessante é notar que as proteínas intestinais desse inseto também foram resistentes a ação proteolítica endógena do látex (Figura 19).

A sobrevivência média e a massa das larvas da mosca das frutas, *C. capitata*, alimentadas com a dieta controle foram de 90 % e 6,28 mg. As proteínas do látex não alteraram estes parâmetros significativamente nas concentrações até 1 %. As dietas de 2 e 4 % das proteínas do látex alteraram os valores de sobrevivência para 77,5 e 47,5 % e de massa para 5,11 e 1,47 mg ($p < 0,05$), respectivamente (Figura 20).

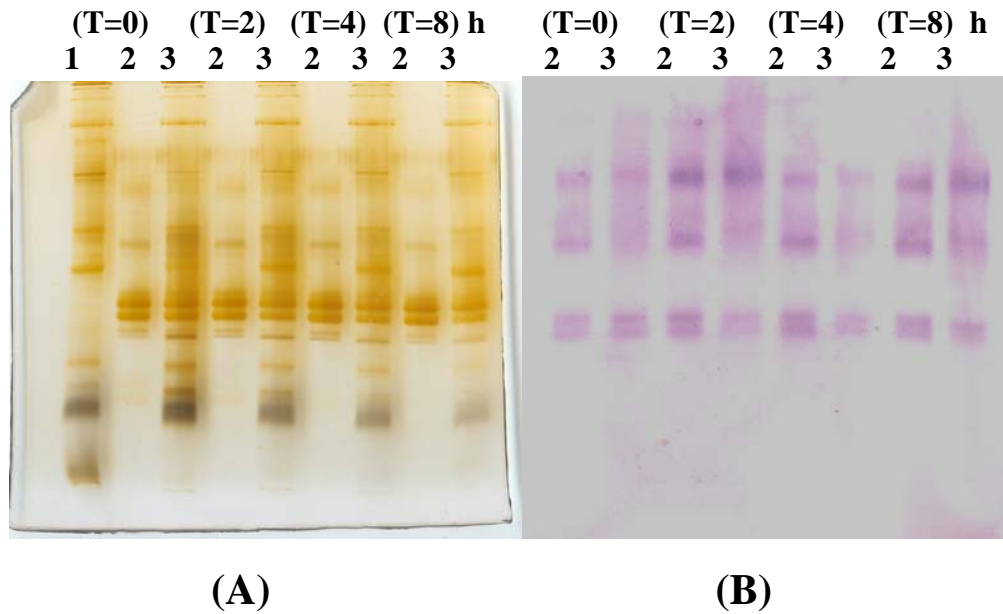


Figura 19: (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %) das proteínas do látex de *Calotropis procera* quando incubadas a 37 °C por diferentes tempos com o homogenato intestinal de ninfas do 4° estágio de *D. peruvianus*. (B) Western blotting. 1= Homogenato (56 µg), 2= Proteínas do látex (8 µg); 3= Homogenato + proteínas do látex após diferentes tempos de incubação. A membrana de PVDF foi incubada com anticorpos anti-proteínas do látex e revelados com anti-corpos secundários de cabra anti-IgG de coelho, marcados com fosfatase alcalina.

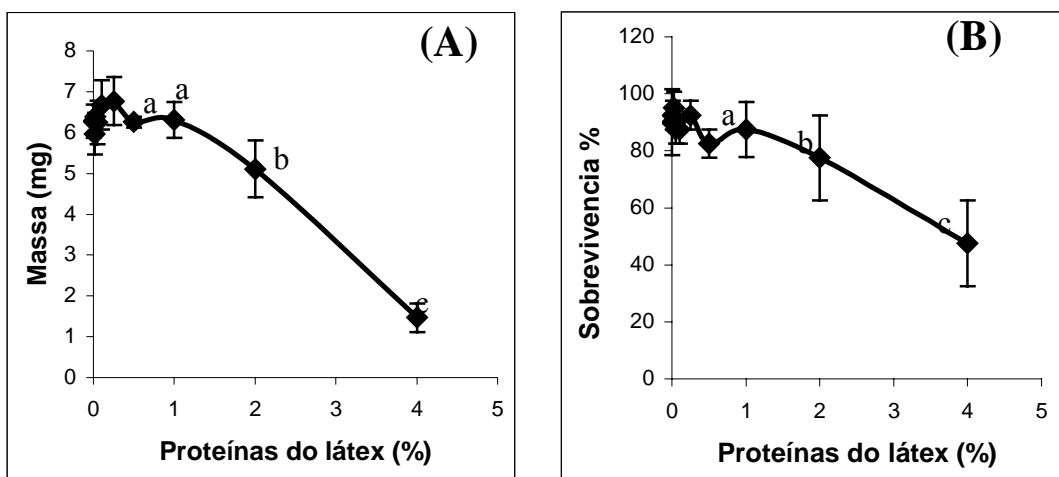


Figura 20: Avaliação das proteínas do látex de *C. procera* na massa (A) e na sobrevivência das larvas (B) do inseto *C. capitata*. Valores com a mesma letra não são significativamente diferentes ($p > 0,05$). Teste utilizado foi o de múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

Nos bioensaios com a lagarta da soja, já no 1º dia de experimento as lagartas alimentadas com uma dieta contendo as proteínas do látex tiveram uma inibição do desenvolvimento em aproximadamente 54 e 100 %, nas concentrações de 0,1 e 0,5 %, respectivamente quando comparado ao grupo controle (Figura 21a). No 5º dia, as lagartas alimentadas com a dieta controle apresentaram uma massa de aproximadamente 6,87 vezes maior que aquelas alimentadas com uma dieta contendo 0,1 % das proteínas do látex. Durante os cinco dias de experimento as lagartas não ganharam massa, quando alimentadas com uma dieta contendo 0,5 e 1 % das proteínas do látex.

Em contraste a esse forte efeito sobre o ganho de peso das lagartas, a sobrevivência só foi alterada no 6º dia e nas concentrações de 0,5 e 1 %, que foram de 46,6 e 40 %, respectivamente, enquanto que a sobrevivências das lagartas que se alimentaram de dietas sem as proteínas do látex foi de 93,33 % (Figura 21b).

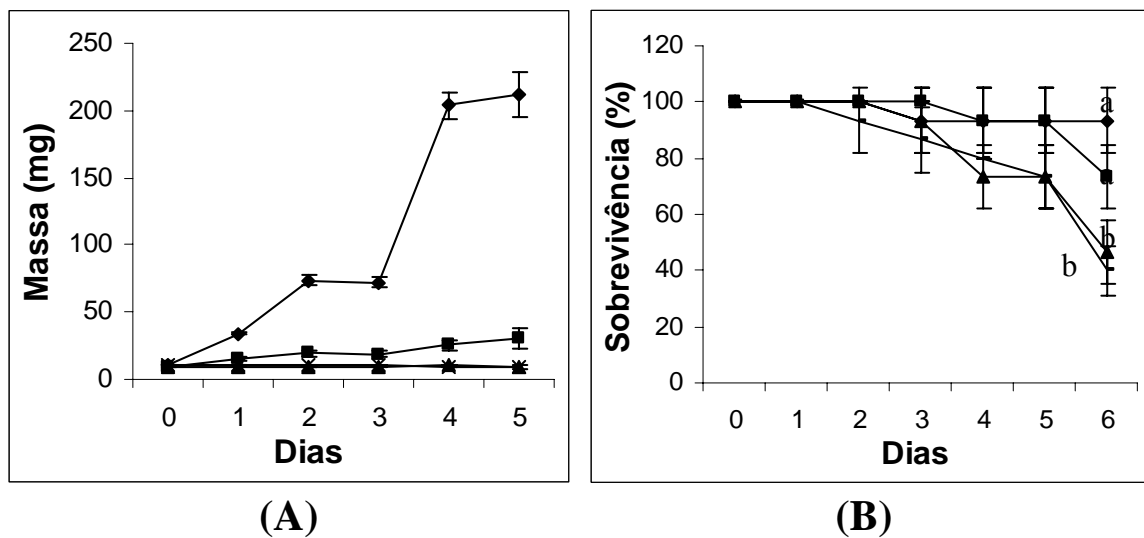


Figura 21: Avaliação das proteínas do látex de *C. procerca* na massa (A) e na sobrevivência das larvas (B) do inseto *Anticarsia gemmatalis*. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ($p < 0,05$). Teste utilizado foi o de múltiplas comparações de Tukey-Kramer.

—◆— Controle —■— Látex 0,1% —▲— Látex 0,5% —✕— Látex 1%

Diferente do ensaio com as lagartas de *A. gemmatalis*, as proteínas do látex não tiveram nenhum efeito sobre a massa e a sobrevivência das lagartas de *S. frugiperda*, mesmo após 17 dias e na concentração de 1 % (Figura 22). A capacidade das lagartas em transformarem-se em pupa e depois em borboletas também não foram alterados em nenhuma das concentrações avaliadas.

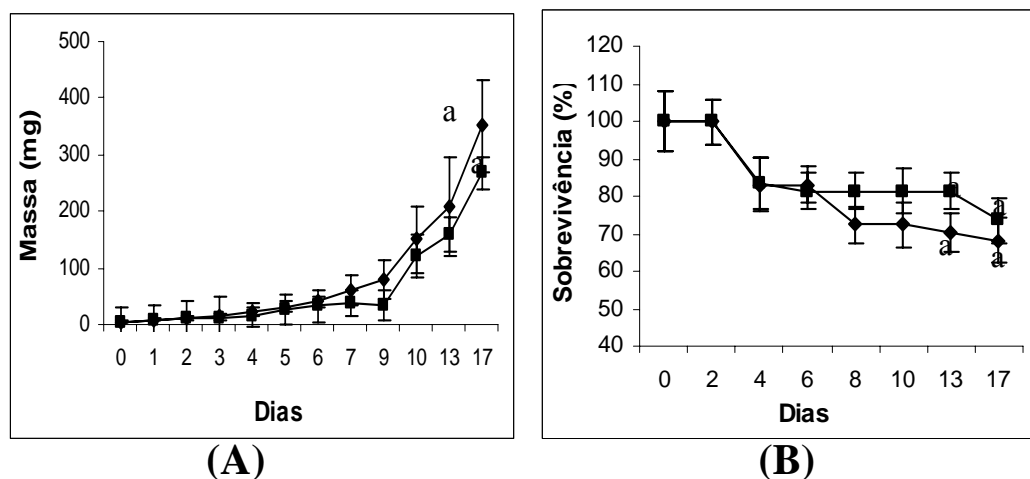


Figura 22: Avaliação das proteínas do látex de *C. procerca* na massa (A) e na sobrevivência (B) das lagartas do inseto *Spodoptera frugiperda*. Valores com a mesma letra são significativamente diferentes iguais ($p > 0,05$). Teste utilizado foi o de múltiplas comparações de Tukey-Kramer. —◆— Controle, —■— Látex 1%.

O aquecimento das proteínas do látex a 98 °C por 30 min foi o suficiente para eliminar as atividades enzimáticas encontradas, entre elas a quitinásica e a proteolítica, mesmo assim essa amostra continuou retardando o desenvolvimento do *C. maculatus*, quando a massa das larvas foi avaliada. Uma nova hipótese para avaliar tal resultado foi verificar novamente a presença de inibidores de proteases na amostra visto que muitos inibidores de proteases são descritos como resistentes a tratamento térmico. Além disto, a ausência de atividade proteolítica nas proteínas do látex aquecidas favoreceria a detecção de um inibidor. Dessa forma, a amostra denominada de sobrenadante, recuperada como fase solúvel da solução de proteínas do látex após aquecimento, foi desafiada a inibir a papaína e proteases cisteínicas oriundas do extrato das larvas de *C. maculatus* e intestinal de *D. peruvianus*.

Uma massa de 47,2 µg das proteínas do látex oriundas do sobrenadante solúvel recuperado após aquecimento e centrifugação foi capaz de inibir 81,10; 33,33 e 52,32 % da atividade cisteínica da papaína, das larvas de *C. calosobruchus* e *D. peruvianus*,

respectivamente (Figura 23). Aumentando-se esta massa para 94,4 µg de proteína a inibição foi pouco alterada, sendo de 88,00; 47,71 e 58,14 % da atividade cisteínica da papaína, das larvas de *C. calosobruchus* e *D. peruvianus*, respectivamente. Esses resultados mostram efetivamente que há um inibidor de proteases do tipo cisteínica no látex de *Calotropis procera*. A presença desse inibidor pode ser um dos principais fatores responsáveis por tal efeito deletério encontrado no desenvolvimento do inseto *C. maculatus* nas proteínas do látex depois de aquecidas.

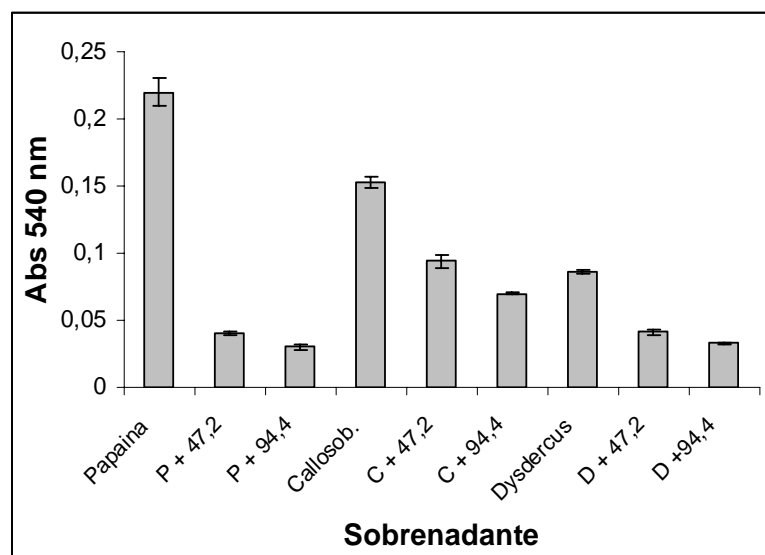


Figura 23: Inibição da atividade cisteínica da papaína, do extrato das larvas do *C. maculatus* e do intestino de ninfas de *D. peruvianus* com a amostra sobrenadante em diferentes concentrações. P =Papaína; C =extrato de *C. maculatus* e D= extrato intestinal de *D. peruvianus*, incubados com 47,2 e 94,4 µg proteína da amostra sobrenadante.

IV. DISCUSSÃO

A planta *Calotropis procera* é muito encontrada no Estado do Ceará. Sua ocorrência é muito comum na zona litorânea embora a planta seja muito encontrada na beira de lagoas e terrenos desocupados dentro da cidade. Uma característica interessante de *Calotropis procera* é que a planta não se desenvolve sob sombreamento. Daí está muito encontrada sobre as dunas. As sementes de *Calotropis* se desenvolvem protegidas dentro de um fruto globoso que lembra uma bola inflada e assim as sementes são protegidas quanto ao ataque direto de predadores. Quando amadurecidos, os frutos se abrem e as sementes, dotadas de fibras finas, que lembram fios de seda, são dispersas pelo vento garantindo sua propagação. A presença destas fibras brilhosas dá origem a um dos nomes populares da planta que é flor de seda.

Em muitos ambientes onde o látex de *Calotropis* foi coletado, foi observado a presença de muitos insetos, inclusive sobre suas folhas. Entretanto atividade predatória foi apenas observada por uma lagarta conhecida como monarca (*Danaus plexippus*). Esta lagarta, pertencente à família Nymphalidae, subfamília Danainae, geralmente utiliza plantas laticíferas como hospedeiras. Aproximadamente 45 espécies pertencentes principalmente à família Asplepiadaceae têm sido reportadas serem atacadas por essa lagarta (Ackery & Vane-Wright, 1984).

Esta lagarta, apresentada na figura 24, alimenta-se através de um aparelho bucal mastigador e é muito voraz. Por atacar fortemente as folhas de *Calotropis procera*, que apresentam canais laticíferos bem distribuídos, fortalece a idéia de que esta lagarta não é afetada pelo consumo desse fluido. Alguns trabalhos mostram que *D. plexippus* armazena compostos secundários oriundos de látex, usando-os para sua própria defesa contra

predadores (Martin et al., 1992) ou como estímulo para oviposição (Haribal & Renwick, 1996).



Figura 24: Lagarta de *Danaus plexippus* se alimentando de folhas de *Calotropis procera*. Fortaleza-Ce.

Após as plantas laticíferas sofrerem algum dano mecânico, o látex é rapidamente exudado e coagulado. Esse passo parece ser o primeiro mecanismo de defesa dessas plantas, uma vez que impede a área injuriada ser penetrada por patógenos. O látex também tem uma ação colante que pode imobilizar pequenos insetos ou mesmo uma lagarta (Moursy, 1997), entretanto, além deste efeito mecânico, a composição química do látex parece ser também objeto de defesa.

Em vista que alguns trabalhos estipulam o látex como parte de um mecanismo de defesa de plantas, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a função de proteínas do látex de *C. procera* na defesa contra insetos. Para isso, o látex foi fracionado para eliminar pequenos metabólitos e sua fração poli-isopreno, a borracha.

A coleta em água, centrifugação e diálise contra água foram métodos simples e eficientes utilizados para separar o látex de *C. procera* em duas frações principais: uma fração solúvel e destituída de borracha e outra composta de borracha.

A fração destituída de borracha apresentou valores de proteínas solúveis de 8,18 mg/ml. Valor bem superior daqueles encontrados no látex de variedades de manga que foram de 2,0-3,5 mg/ml (John et al., 2003). Em valores de matéria seca, o látex de *C. procera* apresentou 10 % de proteína, mesmo valor encontrado no látex de *Carica papaya* (Azarkan et al., 2003) e próximo ao do látex de *Manihot glaziovii*, que foi 8,2 % (Pereira et al, 1999). Essa fração é constituída de proteínas com diversas massas moleculares, variando de 10-66 KDa, prevalecendo as de aproximadamente 25-30 KDa. Isso mostra que o látex de *C. procera* 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 parecidos com aqueles encontrados no látex de diversas variedades de *Hevea brasiliensis* (Arreguin et al. 1988).

Esses resultados mostram que os fluidos laticíferos são ricos em proteínas. Várias proteínas e enzimas têm sido descritas em látex. Como exemplos de enzimas podemos citar as lisozimas (Dahlquist, et al., 1969), quitinases (Azarkan et al., 1997), β -1-3-glucanases (Wilson, 1974), lipase (Giordani et al., 1991), glutaminil ciclase (Zerhouni et al., 1998), além das proteinases cisteínicas (Azarkan et al., 2003).

As proteínas do látex de *C. procera* apresentaram alta atividade proteolítica do tipo cisteínica, confirmando os resultados anteriores de Dubey & Jagannadham (2003). Além dessa atividade cisteínica, foi encontrada atividade proteolítica do tipo serínica, assim como da quimotripsina, o que ainda não tinha sido relatado.

Proteinases cisteínicas são descritas em látex de diversas plantas. Entre elas podemos citar *Ficus glabrata*, *F. carica*, *Calotropis gigantea*, *Funastrum clausum*, *Hevea brasiliensis* e

Carica papaya (Abraham & Joshi, 1979; Sgarbieri et al., 1964; Glazer & Smith, 1971). Em *Carica papaya*, 6 % da matéria seca de seu látex é constituído de enzimas, das quais 80 % são proteases cisteínicas (Azrkan et al., 2003), entre elas: papaína, quimopapaína, caricaína e glicil-endopeptidase. Assumindo o fato que essas proteinases circulam livremente dentro dos laticíferos, elas constituem um dano potencial para a planta. Em vista disso, as plantas desenvolveram mecanismos para regular essas proteases. Um destes mecanismos foi fabricá-las como zimogênios (Taylor et al., 1999), que são rapidamente ativados apenas após a liberação do látex dos canais laticíferos, quando a planta sofrer algum dano mecânico (Moutim et al., 1999).

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 da planta tem sido proposto. Essa proposta tem sido levantada, pois essas proteinases são requeridas no processo de coagulação do látex (Moutim et al.1999). Além disso, elas podem agir diretamente sobre as proteínas do trato intestinal de insetos (Mohan et al., 2006; Konno et al., 2004; Moussaoui et al., 2001).

Esse último fato foi observado quando as proteínas do látex de *C. procera* foram incubadas *in vitro* com os extratos das larvas de *Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus* e os resultados avaliados em gel de poliacrilamida. A hidrólise das proteínas das larvas pelas proteínas do látex foi devastadora, ocorrendo em poucos minutos de incubação. Esse fato pode explicar, em parte, o forte efeito deletério encontrado quando as proteínas do látex foram adicionadas na dieta desses insetos. O papel dessas proteinases sobre o desenvolvimento do *C. maculatus* pode ser evidenciado, se compararmos os resultados encontrados no látex de *C. procera* e *Manihot galziovii*. O látex de *M. galziovii* foi capaz de inibir o desenvolvimento desse inseto em 50 % em uma concentração de 2,9 % (p/p), enquanto nas proteínas do látex foi necessária uma concentração 29 vezes menor (0,1 %) para

causar o mesmo efeito. Em relação à massa das larvas, o látex de *M. galziovii* as reduziu em 50 % na concentração 0,7 % (Pereira et al., 1999), enquanto o látex de *C. procera* foi necessário apenas uma concentração sete vezes menor para causar o mesmo efeito.

Dessa mesma forma, o forte efeito deletério das proteínas do látex nas lagartas de *Anticarsia gemmatalis* pode ser parcialmente atribuído às proteinases cisteínicas. Essa hipótese foi levantada, já que Konno e colaboradores (2004) mostraram que proteinases cisteínicas presentes em folhas de *Carica papaya* e em espécies de *Ficus* estão diretamente relacionadas com a toxicidade encontrada para a lagarta *Samia ricini*.

Quando as proteínas do látex foram incubadas com o extrato intestinal de ninfas de *Dysdercus peruvianus*, as proteínas intestinais deste foram resistentes à hidrólise pelas proteinases presentes no látex, mesmo após 8 horas de incubação. Fato esse que pode, em parte, explicar por que as proteínas do látex causaram efeito sobre o desenvolvimento desse inseto apenas em uma concentração de 1 e 2 % e no 14º dia de ensaio. A resistência das proteínas do extrato intestinal de *D. peruvianus* à hidrólise por parte das proteínas do látex pode ter ocorrido devido ao tempo de incubação ter sido pequeno (8 horas) ou pela pequena quantidade de proteínas do látex utilizada no ensaio de hidrólise. É importante lembrar que a quantidade de proteínas do látex incubadas com o extrato intestinal desse inseto foi igual àquela incubada com os extratos das larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*.

Mesmo o látex apresentando uma grande quantidade de proteinases cisteínicas, ele não foi capaz de causar nenhum efeito sobre as lagartas de *Spodoptera frugiperda*. Fato esse interessante, já que alguns trabalhos mostram que proteinases cisteínicas estão envolvidas na resistência de milho a essa lagarta (Mohan, et al., 2006; Pechan et al., 2000). A capacidade dessas lagartas em degradarem as proteínas do látex ou suas proteínas intestinais serem resistentes a elas pode ter sido o fator que limitou o efeito deletério.

Outra classe de enzimas hidrolíticas relacionadas com a defesa das plantas contra patógenos e insetos são as quitinases. Essas enzimas têm a capacidade de degradar a quitina presente nas paredes celulares de fungos e na membrana peritrófica de insetos. Quitinases são descritas ser distribuídas em diversos tecidos das plantas, entre eles raízes e folhas (Burketova et al, 2003; Kästner et al., 1998). Em látex, as quitinases foram descritas em *Hevea brasiliensis*, *Manihot glaziovii* e *Carica papaya* (Azarkan et al., 1997; Pereira et al., 1999; Bokma et al., 1997).

Nesse trabalho foi mostrado pela primeira vez evidências de quitinases no látex de *C. procera*, que apresentou atividade quitinolítica *in vitro* e em gel contendo glicol quitina. Os efeitos deletérios das proteínas do látex encontrados sobre os insetos *C. Maculatus*, *Zabrotes subfasciatus*, *C. capitata* e *A. gemmatalis* podem ser atribuídos, também em parte, a essas enzimas. Assim como as proteinases cisteínicas, as quitinases presentes nas proteínas do látex podem ter sido degradadas pelas proteinases dos insetos *D. peruvianus* e *S. frugiperda*, dessa forma não podendo causar efeitos.

Um alvo potencial para proteinases e quitinases é a membrana peritrófica, já que é constituída de proteínas e quitina. Essa membrana serve como a primeira linha de defesa dos insetos, protegendo-os de toxinas e patógenos (Barbehenn, 2001). Além disso, ela auxilia na digestão e protege o epitélio intestinal de partículas abrasivas da dieta. Devido essa importância na defesa e na digestão, sua destruição é muitas vezes deletéria, se não letal, para os insetos que a possuem (Wang & Granados, 2001).

Um efeito sinérgico entre as proteinases cisteínicas e as quitinases encontradas nas proteínas do látex sobre as membranas peritróficas desses insetos pode ocorrer. O efeito sinérgico entre duas moléculas é relatado na literatura. Como exemplos: as quitinases e as β -1-3 glucanases, juntas podem degradar a parede celular de fungos, já que são constituídas de

quitina e β -1-3-glucanos (Salzer, 1997), e inibidores de α -amilase com atividade quitinolítica, que junto podem ter fortes efeitos sobre insetos da ordem coleoptera (Dayler et al., 2005).

As proteínas do látex de *Calotropis procera* mesmo depois de aquecidas por 30 min a 98 °C e incubadas com a pronase por 24 h, ainda mostraram efeitos deletérios sobre as larvas de *C. maculatus*. Nas proteínas do látex aquecidas, as atividades proteolíticas e quitinásicas foram perdidas, dessa forma essa amostra foi investigada quanto à presença de inibidores de proteinases, já que são conhecidos como moléculas muito estáveis ao tratamento térmico e de estarem relacionadas com a defesa da planta contra insetos (Gomes et al., 2005). Para isso, a amostra sobrenadante, obtida após aquecimento das proteínas do látex e centrifugação, e a amostra tratada com foi desafiada a inibir a papaína, uma proteinase cisteínica. A papaína teve sua atividade inibida em 81 % com 47,2 μ g de proteínas do látex que permaneceram solúveis após o tratamento térmico. Este resultado revelou a presença de um inibidor de proteinase cisteínica no látex. Inibidor de proteinases cisteínicas também já foi descrito no látex de *Carica papaya* (Monti et al., 2004). A partir desse resultado a mesma amostra foi desafiada a inibir as enzimas das larvas do *C. maculatus*, que foram inibidas em 33,33 % com 47,2 μ g do sobrenadante. Assim, este inibidor endógeno poderia ser pelo menos em parte, o causador do efeito deletério encontrado nas larvas de *C. maculatus* na amostra aquecida, já que as principais classes de enzimas digestivas desse inseto pertencem a proteinases cisteínicas (Campos et al., 1989).

As proteínas do látex após incubadas por 24 h com a pronase ainda mantiveram o efeito inseticida sobre o *C. maculatus*. Este resultado foi considerado surpreendente, visto que após digestão com pronase era esperado que a ação inseticida da amostra fosse pelo menos diminuída. A análise eletroforética do material digerido, mostrado na figura 13, mostra que as proteínas do látex não sofreram considerável digestão. Essa amostra tratada com pronase foi capaz ainda de inibir a atividade proteolítica da papaína, indicando que o inibidor de protease

cisteínica presente no látex manteve-se ativo e capaz de causar o efeito deletério encontrado para as larvas de *C. maculatus*.

Além das proteinases e quitinases, esse inibidor pode também estar relacionado com os efeitos deletérios mostrados nas larvas de *Z. subfasciatus*, já que apresentam também como principal classe de enzimas proteolíticas as do tipo cisteínicas (Silva & Xavier-Filho, 1991). No caso das lagartas de *A. gemmatalis*, os efeitos deletérios encontrados podem ser atribuídos principalmente às proteinases cisteínicas e/ou as quitinases, já que a principal classe de enzimas digestivas encontradas nesse inseto é do tipo serínicas e assim o inibidor encontrado poderia ser pouco ativo (Oliveira et al., 2005). O fraco efeito das proteínas do látex sobre o *D. peruvianus* poderia ser atribuído em parte pelas quitinases e ao inibidor de proteinases cisteínicas, que inibiu a atividade cisteínica do extrato intestinal desse inseto em 52,32 % utilizando 47,2 µg do sobrenadante, embora esse inseto use como principal classe de enzimas digestivas as aspárticas, além das cisteínicas (Stanisçuaski, 2005).

As larvas de *Ceratitis capitata* apresentam como principais classes de enzimas hidrolíticas as do tipo serínicas (Gomes et al., 2005). Dessa forma, o efeito causado nessas larvas pelas proteínas do látex pode ter sido ocasionado principalmente às quitinases e proteinases cisteínicas presentes na amostra de estudo.

Embora não tenham sido encontradas no látex de *C. procera* as enzimas do tipo α -amilase e tripsina e nem inibidores para essa última enzima, essas proteínas são relatadas em látex de diferentes plantas (Stritanyarat et al., 2006; John et al., 2002; Pereira et al., 1999; Lin & Lu, 1994; Lynn & Clevette-Radford, 1987b; David et al., 1981). Inibidores para α -amilase não foi detectado no látex de *C. procera*, assim como ainda não foi relatado em látex em geral.

V. CONCLUSÃO

O látex de *Calotropis procera* possui proteínas com atividades catalíticas e que são descritas como relacionadas ao metabolismo de defesa vegetal. Entre elas, pelo menos três quitinases e proteinases do tipo cisteínica e serínica, além de possuir um inibidor do tipo cisteínico.

Assim, em resposta a hipótese formulada, é sugerido que dentre proteínas expressas nos laticíferos de *Calotropis procera* algumas constituem parte integrante de seus sistema de defesa. Não deve ser esquecido que metabólitos outros de baixa massa molecular, além de sua fração predominante de poli-isopreno podem fazer parte adicional desta atividade integrada de defesa.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M. & ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. **Eur J Biochem.**,**209(3)**: 933-937, 1992.

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.

ABRAHÃO, J. T. M.; D'ARCE, M. A. B. R.; FONSECA, H. Algodão: produção, pré-processamento e transformação industrial. São Paulo: **Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia** (Série Extensão Agroindustrial, 2). 96 p, 1982.

ACKERY, P. R. & VANE-WRIGHT, R. I. Milkweed Butterflies, p 201. **British Museum, London**, 1984.

AGRIOS, G.N.. How plants defend themselves against pathogens. **In Plant Pathology**. 3° ed. 97-115, Academic Press, New York. 1988.

ALENCAR, N. M. N.; FIGUEIREDO, I. S. T.; VALE, M. R.; BITENCURT, F. S.; OLIVEIRA, J. S.; RIBEIRO, R. A. & RAMOS, M. V. Anti-inflammatory effect of the latex

from *Calotropis procera* in three different experimental models: peritonitis, paw edema and hemorrhagic cystitis. **Planta med.**, **70**: 1144-1149, 2004.

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

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

ASHTON, F.M. Mobilization of storage proteins of seeds. **Ann. Rev. Plant Physiol.** **27**: 95-117, 1976.

AVROVA, A.O.; STEWART, H.E; DE JONG, W.D. & HEILBRONN, J.; LYON, G.D & BIRCH, P.R. A cysteine protease gene is expressed early in resistant potato interactions with *Phytophthora infestans*. **Mol Plant Microbe Interact** **12**: 1114–1119, 1999.

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.

AZARKAN M., AMRANI A., NIJS M., VANDERMEERS A., ZERHOUNI S. & SMOLDERS N. *Carica papaya* latex is a rich source of a class II chitinase. **Phytochemistry** **46**: 1319– 1325, 1997.

BALDWIN, I.T., HALITSCHKE, R., KESSLER, A., SCHITTKO, U. Merging molecular and ecological approaches in plant-insect interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 351–358, 2001.

BARBEHENN, R.V. Roles of peritrophic membranes in protecting herbivorous insects from ingested plant allelochemicals. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **47**: 86–99, 2001.

BARBOSA, S.; BRAGA SOBRINHO, R.; LUKEFAHR, M.J. & BEINGOLEA, G.O. Relatório sobre a ocorrência do bicudo do algodoeiro *Anthonomus grandis* Boheman, Boll weevil, no Brasil, e recomendações para a sua erradicação. **Campina Grande:Embrapa-CNPA**. 12p. 1983.

BARRETT, A.T. The cystatins: a new class of peptidase inhibitors. *Trends in Biochemistry Science*, **12**: 193-196, 1986.

BELITZ, H. D. & WEDER, J. K. P. Protein inhibitors of hydrolases in plants foodstuffs. *Food Rev. Int.* **6**: 151-211. 1990.

BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H.J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **8**: 93-99, 1987.

BODE, W & HUBER, R. Structural basis of the endoproteinases-protein. *Biochimica et Biophysica Acta* **1477**: 241-252, 2000.

BOHLMANN, H. The role of thionins in plant protection. **Crit. Rev. Plant Sci.** **13**: 1–16, 1994.

BOKMA, E.; GERRIT, A.; KONINGSVELD, V.; JERONIMUS-STRATINGH, M. & BEINTERMA, J.J. Hevamine, a chitinases from the rubber tree *Hevea brasiliensis*, cleaves peptidoglycan between the C-1 of N-acetylglucosamine and C-4 of N-acetylmuramic acid and therefore is not a lysozyme. **FEBS Letters**, **411**: 161-163, 1997

BOLLER, T. "Roles of proteolytic enzymes in interactions of plants with other organisms." **Plant Proteolytic Enzymes. 1**: 67 - 96, 1986.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and beta-1-3-glucanase. In: **Molecular Plant Pathology: A practical Approach**. Edited by S. J. Gurr, M.J. Mc Pherson, and D.J.Bowles. v. II. 1992.

BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and beta-1-3-glucanase. In: **Molecular Plant Pathology**: S. J. Gurr, M.J. Mc Pherson and D.J.Bowles. eds. IRL Press New York, p. 23-29, 1993.

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.

BRUIN, J. & DICKE, M. Chemical information transfer between wounded and unwounded plants: backing up the future. **Biochem. Syst. Ecol.** **29**: 1103–1113, 2001.

BURKETOVA, L.; STILLEROVA, K. & FELTLOVA, M. Immunohistological localization of chitinase and β -1,3-glucanase in rhizomania-diseased and benzothiadiazole treated sugar beet roots. **Physiol Mol Plant Pathol** **63**: 47–54, 2003.

CAMPOS, F. A.P.; XAVIER-FILHO, J. SILVA, C.P.; ARY, M.B. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.) **Comp. Biochem. Physiol.** **92**: 51-57, 1989.

CHANG, M.M.; HOROVITZ, D.; CULLEY, D. & HADWIGER, L.A. Molecular cloning and characterization of a pea chitinase gene expressed in response to wounding fungal infection and the elicitor chitosan. **Plant Mol. Biol.** **28**: 105-111, 1995.

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.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. **Sete Lagoas: Embrapa-CNPMS. Circular Técnica**, **21**: 1-45, 1995.

DAHLQUIST F. W., BORDERS C. L. JR, JACOBSON G. & RAFTERY M. A. The stereospecificity of human, hen and papaya lysozymes. **Biochemistry** **8**: 694–700, 1969.

DAVID, D.; BIESBOER, P. & MAHLBERG, G. A Comparison of Alpha-Amylases from the Latex of Three Selected Species of Euphorbia (Euphorbiaceae). **American Journal of Botany**, **68** (4): 498-506, 1981.

DAYLER, C.S.A.; MENDES, P.A.M.; PRATES, M.V. BLOCH, C. FRANCO, O. L. & GROSÍ-DE-SÁ, M.F. Identification of the novel bean α -amilase inhibitor with chitinolytic activity. **FEBS Letters**, **579**: 5616-5620, 2005.

DE MORAES, C.M.; LEWIS, W.J.; PARE, P.W.; ALBORN, H.T. & TUMLINSON, J.H. Herbivore-infested plants selectively attract parasitoids. **Nature** **393**: 570–573, 1998.

DEWAN, S.; SANGRAULA, H. & KUMAR, V.L. Preliminary studies on the anagelsic activity of latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacology** **73**: 307-311. 2000.

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. **Journal of Stored Products Research**, **32**: 201-204, 1996.

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

EBEL, J. & COSIO, E. G. Elicitors of plant defense responses. **International Review of Cytology**, **48**: 1-36, 1994.

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.

FERREIRA, C.; CAPELLA, A. N.; SITNIK, R.; TERRA W. R. Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepdoptera) larvae. **Comp. Biochem. Physiol.** **107 A:** 631-640, 1994a.

FLACH, J.; PILET, P. E. & JOLLES, P. What's new in chitinases research? **Experientia** **48:** 1-7, 1992

FRANCO, O.L.; MELO, F.R.; SILVA, M.C.M. Resistência de plantas a insetos. **Bioteecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.11, p.36-40, 1999.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BATISTA, G.C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J.R.P.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S. & OMOTO, C. Manual de entomologia agrícola. **Piracicaba: FEALQ**, 920p. 2002.

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

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

GIORDANI R., MOULIN A. & VERGER R. Tributyrolylglycerol hydrolase activity in *Carica papaya* and other latices. **Phytochemistry** **30:** 1069–1072, 1991.

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

GOMES, C.E.M.; BARBOSA, A.E.A.D.; MACEDO, L.L.P.; PITANGA, J.C.M.; MOURA, F. T, OLIVEIRA, A.S., MOURA, R.M.; QUEIROZ, A. F.S.; MACEDO, F. P.; ANDRADE, L. B.S.; VIDALE, M. S. & SALES, M.P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). **Plant Physiol Biochem.** **43(12):** 1095-102, 2005.

GRAHAM, L.S. & STICKLEN MB. Plant chitinases. **Can J Bot** **72:** 1057–83. 1994.

GRANT, G. & MANSFELD, J. Early events in host-pathogen interactions. **Curr. Opin. Plant Biol.** **2:** 312–319, 1999.

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.

HACKMAN, R.H. & GOLDBERG, M. New substrates for use with chitinases. **Anal. Biochemistry**, **8:** 397-401.

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

HARBOE, N & INGLID, A. Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. In: **A Manual quantitative immunoelectrophoresis**. Axelsen, N. H. et al. eds., Blackell Scientific Publications, London, 1973.

HARIBAL, M. & RENWICK. A. A. Oviposition stimulants for the monarch butterfly: flavonol glycosides from *asclepias curassavica*. **Phytochemistry**, **41(1)**: 139-144, 1996.

HOFFMANN-CAMPO, C.B.; OLIVEIRA, E.B. & MOSCARDI, F. Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*). EMBRAPA-CNPSo. Documentos, 23p. 1985.

IBRAF (INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS). **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.ibraf.org.br/x-es/f-esta.html>> Acesso em: 02/05/2005.

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 J.** **8**: 97-109, 1995.

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. Hoppe seyer**, **370(5)**: 450-434, 1989.

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.

KAMATH, J.V. & RANA, A.C. Preliminary study on antifertility activity of *Calotropis procera* roots in female rats. **Fitoterapia**, **73**: 111-115, 2002.

KARBAN, R.; BALDWIN, I.T.; BAXTER, K.J.; LAUE, G. & FELTON, G.W. Communication between plants: induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. **Oecologia** **125**: 66–71, 2000.

KÄSTNER, B.; TENHAKEN, R. & KAUSS, H. Chitinase in cucumber hypocotyls is induced by germinating fungal spores and by fungal elicitor in synergism with inducers of acquired resistance. **Plant J** **13**: 447–454, 1998.

KEMBHAVI, A.A.; BUTTLE, D.J.; KNIGHT, C.G. & BARRETT, A.J. The two cysteine endopeptidases of legume seeds: purification and characterization by use of specific flurometric assay. **Arch. Biochem. Biophys.** **303**: 208-213, 1993.

KIRTIKAR, K.R. & BASU, B.D. In: Indian Medicinal Plants. **Lolit Mohan Basu, Allahabad**. 1606 p. 1935.

KOIWA, H.; BRESSAN, R.A. & HASEGAWA, P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, **2**: 379-384. 1997.

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

KREBS, S.L. & GRUMET, R. Characterization of celery hydrolytic enzymes induced in response to infection by *Fusarium oxysporum*. **Physiol. Mol. Plant Pathol.** **43**: 193-208, 1993.

KRAMER, K.J.; MUTHUKRISHNAN, S.; JOHNSON, L. & WHITE, F. Chitinases for insect control. In: N. Carozzi and M. Koziel, Editors, *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*. **Taylor and Francis Publ, Bristol, PA**. pp. 185–193, 1997.

KRÜGER, J.; THOMAS, C.M.; GOLSTEIN, C.; DIXON, M.S.; SMOKER, M.; TANG, S.; MULDER, L.; JONES, J.D.G. A tomato cysteine protease required for *Cf-2*-dependent disease resistance and suppression of autonecrosis. **Science** **296**: 744–747, 2002

KUMAR, H.S. & BASU, N. Anti-inflammatory activity of the latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacology**, **44(2)**: 123-125, 1994.

KUMAR, H.S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H. & KUMAR, V.L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **J. Ethnopharmacology** **76**: 115-118, 2001.

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

LAJOLO, F. M.; FINARDI-FILHO, F. & MENEZES, E. W. Amylase inhibitors in *Phaseolus Vulgaris* beans. **Food Technol.** **45**: 119-121, 1991.

LAM, E., PONTIER, D. & DEL POZO, O. Die and let live-programmed cell death in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.** **2**: 502–507, 1999.

LARHSINI, M.; OUMOULID, L.; LAZREK, H.B.; WATALEB, C.S.; BOUSAID, M.; BEKKOUICHE, K.; MARKOUK, M. & JANA, M.. Screening of antibacterial and antiparasitic activities of six Moroccan medicinal plants. **Therapie**, **54(6)**: 763-765, 1999.

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.

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 umguiculata*) seeds. *Entomol. Exp. Appl.* **56**, 219-227.

LEPPLA, N.C.; ASHLEY, T.R.; GUY, R.H. & BUTLER, G.D. Laboratory life history of the velvetbean caterpillar. **Annals of the entomological society of America**, **70(2)**: 217-220, 1977.

LIN, Y.H. & HOU, W.C. Sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam) trypsin inhibitors, the major root storage proteins, inhibit one endogenous serine protease activity. **Plant Science**. **163 (4)**: 733-739, 2002.

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. **Miscellaneous Publication 77**. Entomological Society of America, Lanham, MD. 1991.

LIU, Y.; DAMMANN, C. & BHATTACHARYYA, M.K. The matrix metalloproteinase gene GmMMP2 is activated in response to pathogenic infections in soybean. **Plant Physiol 127**: 1788–1797, 2001.

LOECK, A.E.; MARTINS, J.F.S. & BOTTON, M. Método de avaliação de inseticidas para o controle da lagarta-da-folha na cultura do arroz irrigado. In: Reunião da cultura do arroz irrigado, 20. Anais. Pelotas: EMBRAPA, CPACT, p. 222-224, 1993.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Instituto Plantarum. São Paulo**. 315p, 2002.

LUGINBILL, P. The fall armyworm. **USDA TECH. BULL. 34**: 1-91. 1928.

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

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

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

LYNN, K.R. & CLEVETTE-RADFORD, N.A. Two proteases from the latex of *Elaeophorbium drupifera*. **Phytochemistry**, **24(12)**: 2843-2845, 1985.

LYONET, P. Traite Anatomique de la Chenille. **La Haye: Grosse Pinet**, 1762.

MACEDO, M.L.; AS, C.M.; FREIRE, M.D. & PARRA, JR. 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.

MAGALHÃES, J. S. B. Mercado de algodão: perspectivas no Brasil e no mundo. In: Encontro sobre a cultura do algodoeiro. Ituverava. **Anais Jaboticabal: Funep** 121-134, 1998.

Malavasi, A.; Zucchi, R.A. (eds.) Moscas-das-frutas de importância econômica no Brasil. Conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: Holos, 1999. 327p.

MAO, W. W. & KINSELLA, J.E. Amylase activity in banana frits: properties and change in activity with ripening. **J. Food Sci.** **46**: 1400-1403, 1981.

MARTIN, R.A.; LYNCH, S.P.; BROWER, L.P.; MALCOLM, S.B.; VAN HOOK, T. "Cardenolide Content, Emetic Potency, and Thin-Layer Chromatography Profiles of Monarch Butterflies, *Danaus plexippus*, and their Larval Host-Plant Milkweed, *Asclepias humistrata* Walt, in Central Florida", **Chemoecology** (3): 1-13, 1992

MATIOLI, J.C. Moscas das frutas, situação e perspectivas de controle no Brasil. Defesa Vegetal & Animal, São Paulo, 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.

METCALFE, C.R. Distribution of latex in the plant kingdom. **Economic Botany** **21**: 115-127, 1967.

MINGOIA, Q. Química Farmacêutica. **Editora Melhoramentos. São Paulo**. 787p. 1965.

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

MONTI, R.; CONTIERO, J & GOULART, A.J. Isolation of natural inhibitors of papain obtained from carica papaya Latex. **Brazilian Archives of biology and technology** **47(5)**: 747-754, 2004.

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

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.

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

MOUSSAOUI, A. EL; NIJS, M.; PAUL, C.; WINTJENS, R.; VINCENELLI, J.; AZARKAN, M. & YVAN LOOZE. Revisiting the enzymes stored in the laticifers of *Carica papaya* in the context of their possible participation in the plant defence mechanism. **Cell. Mol. Life Sci.** **58**: 556–570, 2001.

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

OLIVEIRA, M.G;A.; SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *A. gemmatalis*. Comparative biochemistry and physiology. **Biochemistry and molecular biology**, **140**: 369-380, 2005.

PECHAN, T.; YE, L.; CHANG, Y.; MITRA, A.; LIN, L.; DAVIS, F.M.; WILLIAMS, W.P.; LUTHE, D.S. A unique 33-kD cysteine proteinase accumulates in response to larval feeding

in maize genotypes resistant to Fall Armyworm and other lepidoptera. **Plant Cell** **12**: 1031–1040, 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. Arg. Ver. **Bras. Bot.** **22(1)**: 1-8, 1999.

PIMBERT, M. Comparaison du comportement de ponte de *Zabrotes subfasciatus* Boh. (Col., Bruchidae) en présence de gousses ou de graines de *Phaseolus vulgaris* L. **Biology of Behaviour**, **10**: 309-319, 1985c.

PINEDO, M.L., SEGARRA, C. & CONDE, R.A. Occurrence of two endoproteinases in wheat leaf intercellular washing fluid. **Physiol. Plant.**, **88**: 287-293, 1993.

PULVER, E.L. Brecha de rendimento de arroz en America Latina y la region del caribe. In: Congresso brasileiro de arroz irrigado, 2., e reunião da cultura do arroz irrigado, 24. Porto Alegre-RS, Anais. Porto Alegre, RS. IRGA, p. 448, 2001.

RAMOS, M. V.; MOTA, D. M.; BONFIM, L. R. AND MADEIRA, S. V. F. Proteínas inativadoras de ribossomos: um veneno vegetal com aplicações farmacológicas. Características físico-químicas, estruturais e biológicas. **RECCS**. **10**: 42-50, 1998.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F. AND EICHHORN, S. E. Biologia Vegetal. **Editora Guanabara Koogan**. 6° edição. **RJ**. 906 p. 2001.

RICHARDSON, M.; CAMPOS, F. A. P.; XAVIER-FILHO, J.; MACEDO, M. L. R.; MAIA, G. M. C. & YARWOOD, A. The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin inhibitor (DE5) isolate from seeds of the Brazilian carolina tree (*Adenanthera pavonia* L.). **Biochemistry et Biophysics Acta**, 872:134-140, 1986.

RYAN, C. A. & WALKER-SIMMONS, M. Plant proteinases. In: Marcus, A. (ed). *The Biochemistry of Plants*. New York. **Academic Press**, v.6. 321-350. 1981.

ROUGE, P.; LE BERRE-ANTON, V.; BOMPARD-GILLES, C. & PAYAN, F. Characterization and functional properties of the alpha-amylase inhibitor (alpha AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds. **Biochim. Biophys. Acta**. **1343 (1)**: 31-40, 1997.

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

RUDENSKAYA¹, G. N.; BOGDANOVA¹, E. A.; REVINA, L. P; GOLOVKIN, B. N. & STEPANOV, V. M. Macluralisin - a serine proteinase from fruits of *Maclura pomifera* (Raf.) Schneid. **Planta** **196(1)**: 174 – 179, 1995.

RYAN, C.A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annual Review of Phytopathology (28)**: 425-449, 1990.

RYAN, C.A. & WALKER-SIMMONS, M.K. Plant proteinases. In: Stumpf PK, Conn EE (eds) **The biochemistry of plants**. Academic Press, New York: 321–350, 1981.

SALZER, P.; HUEBNER, B.; IRRENBURG, A. & HAGER, A. Differential Effect of Purified Spruce Chitinases and B-1,3-Glucanases on the Activity of Elicitors from Ectomycorrhizal Fungi. **Plant Physiol.**, **114**: 957-968, 1997.

SGARBIERI, V.C.; GUPTE, S. M.; KRAMER, D.E. AND WHITAKER, J.R. Ficus enzymes: Separation of proteolytic enzymes of *Ficus glabrata* and *Ficus carica*. **J. Chem.**, **239**: 2170-2177, 1964.

SHARMA, P.; DEVI, J. & SHARMA, J. D. In vitro hemolysis of human erythrocytes – by plant extracts with antiplasmodial activity. **J. Ethnopharmacology**, **74**: 239-243, 2001.

SHARMA, P. & SHARMA, J.D. In-vitro schizonticidal screening of *Calotropis procera*. **Fitoterapia**, **71**: 77-79, 2000.

SHOJI, T., YAMADA, Y. & HASHIMOTO, T. Jasmonate induction of putrescine N-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana sylvestris*. **Plant Cell Physiol.**, **41**: 831–839. 2000.

SILVA, C.P. & XAVIER-FILHO, J. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Both.) (Coleoptera:Bruchidae). **Comp. Biochem. Physiol.** **99b**: 529-533, 1991.

SINGH, H.; KUMAR, S.; DEWAN, S. & KUMAR, V.L. Inflammation induced by latex of *Calotropis procera* – a new model to evaluate anti-inflammatory drugs. **J. Pharmacol. and Toxicol. Methods**, **43**: 219-224, 2000.

SOARES, P. M.; LIMA, S. R.; MATOS, S. G.; ANDRADE, M. M.; PATROCÍNIO, M. C.A., FREITAS, C. D.T.; RAMOS, M. V.; CRIDDLE, D. N.; CARDI, B. A.; CARVALHO, K.M. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice . **Journal of Ethnopharmacology**, **99 (1)**: 125-129, 2005.

SOLOMON. M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E. & LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell** **11**: 431–443, 1999.

SRITANYARAT, W.; PEARCE G.; SIEMS, W. F.; RYAN, C. A.; WITITSUWANNAKUL R. & WITITSUWANNAKUL, D. Isolation and characterization of isoinhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. **Phytochemistry**, 2006 (Article in press).

STANISÇUASKI, F.; FERREIRA-DASILVA, C.T.; MULINARI, F.; PIRES-ALVES, M. & C.R. CARLINI. Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (hemiptera: pyrrhocoridae). *Toxicon*, **45(6)**: 753-760, 2005.

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.

TAYLOR M. A. J., AL-SEIKH M., REVELL D. F., SUMNER I. G. AND CONNERTON I. F. cDNA cloning and expression of *Carica papaya* prochymopapain isoforms in *Escherichia coli*. **Plant Sci.** **145**: 41–47, 1999.

TELLAM, R.L.; WIJFFELS, G. & WILLADESEN, P. Peritrophic matrix proteins. **Insect Biochemistry and Molecular Biology** **29**: 87-101, 1999.

[The Wealth of India](#), In: Raw Materials 3, **Publication and Information Directorate, CSIR, New Delhi**, 78–84, 1992.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T. & GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets-procedure and some applications. **Proceedings Of The National Academy Of The Sciences of The United**, **76**: 4354-4354, 1979.

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.

WANG, P. & GRANADOS, R.R. Molecular structure of the peritrophic membrane (PM): identification of potential PM target sites for insect control. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology** **47**: 110–118, 2001

WANG, X.; DING, X.; GOPALAKRISHNAN, B.; MORGAN, T.D.; JOHNSON, L.; WHITE, F.F.; MUTHUKRISHNAN, S. & KRAMER, K.J. Characterisation of a 46 kDa insect chitinase from transgenic tobacco. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, **26**: 1055–1064, 1996.

WILSON G. Some properties of an endo-1,3-b-glucanase. *Biochem. Soc. Trans.* **2**: 1115–1116, 1974.

WINK, M. Modes of action of alkaloids. In: Roberts, M.F., Wink, M. (Eds.), *Alkaloids. Plenum Press, New York*, 301–326, 1998.

XAVIER-FILHO, J.; CAMPOS, F.; MARIA, A. P.; ARY, B.; PERES SILVA, C.; CARVALHO, M. M. M.; MACEDO, M.; LIGIA R., LEMOS, F. J. A. Poor correlation between the levels of proteinase inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *J. Agric. Food Chem.*, **(37)**: 1139-1143, 1989.

XAVIER-FILHO, J. & CAMPOS, F. A. P. In *Protease Inhibitors and Toxicants of Plant Origin* (Cheek, P. R., ed.), CRC Press. Boca Raton, Florida, Vol. 3. 1–27, 1989.

XAVIER-FILHO, J. & VENTURA, M. M. Trypsin inhibitors in cowpea: A review. *Comments on Agricultural & Food Chemistry*, **1**:239-264, 1988.

XAVIER-FILHO, J. & CAMPOS, F.A.P. Inibidores de enzimas proteolíticas em plantas. *Arq Biol. Tecnol.*, **27(3)**: 407-417, 1984.

ZERHOUNI S., AMRANI A., NIJS M., SMOLDERS N., AZARKAN M., VINCENTELLI J. Purification and characterization of papaya glutamine cyclotransferase, a plant enzyme highly

resistant to chemical, acid and thermal denaturation. **Biochim. Biophys. Acta 1387**: 275–290, 1998.