

Resposta bioquímica e comportamental de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibidor de serino protease benzamidina

Anderson Martins Pilon¹, Liliane Evangelista Visôto², Camila Rocha Silva², Rafael de Almeida Barros³, Maria Goreti de Almeida Oliveira^{4*}

Resumo

Na coevolução entre plantas e insetos inúmeros mecanismos de resposta vegetal foram desenvolvidos, dentre eles destaca-se a produção de inibidores de proteases (IP). Sabe-se que quando uma planta é atacada ou ferida ela aumenta os níveis de IP na região ferida (resposta local) e/ ou em toda planta (resposta sistêmica). Neste contexto, o presente trabalho fundamentou-se em averiguar os efeitos bioquímico e comportamental de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) submetida a plantas de soja, *Glycine max* L. (Fabaceae), pulverizadas com diferentes concentrações do inibidor de protease, benzamidina. A partir da concentração de 0,15 % (p/v) de benzamidina houve uma redução na atividade amidásica de serino-protease (tripsinas-like) da lagarta ao longo do tempo. Verificou-se que plantas de soja pulverizadas com benzamidina, em presença de *A. gemmatalis*, tiveram crescente aumento na inibição trípica, devido à elevação do conteúdo de inibidor endógeno. A benzamidina também afetou a resposta comportamental de lagartas e mariposas de *A. gemmatalis*, as quais tiveram preferência por plantas que foram pulverizadas com 0 % de benzamidina. Esses resultados sugerem que a pulverização de plantas com inibidor benzamidina auxiliou positivamente no processo de defesa da planta uma vez que ocorreu aumento de inibidor endógeno e não preferência do inseto por plantas com a presença do inibidor. Assim, considera-se que o uso de IP é uma estratégia promissora no controle de *A. gemmatalis* na cultura da soja.

Palavras-chave: Fitossanidade. Controle alternativo de pragas. Lagarta da Soja.

Biochemical and behavioral response of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) the inhibitor of serine proteinase benzamidine

Abstract

In coevolution of plants and insects several mechanisms of plant response they were developed, among which there is the production of protease inhibitors (PI). It is known that when a plant is attacked or wound it enhances IP level in the wound region (local response) and / or throughout the plant (systemic response). In this context, the present work was based on ascertaining the biochemical and behavioral effects on *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) subjected to soybean plants, *Glycine max* L. (Fabaceae), sprayed with different concentrations of the protease inhibitor, benzamidine. From the concentration of 0.15 % (w/ v) benzamidine there was a decrease in amidolytic activity of serine protease

¹INCAPER - Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural

²Docente da Universidade Federal de Viçosa / Campus Rio Paranaíba

³Discente da Universidade Federal de Viçosa / Campus Viçosa

⁴Docente da Universidade Federal de Viçosa / Campus Viçosa

* Autor para correspondência: malmeida@ufv.br

Recebido para publicação em 28 de janeiro de 2016

Aceito para publicação em 25 de abril de 2016

(trypsin-like) caterpillar over time. It was found that soybean plants sprayed with benzamidine, in the presence of *A. gemmatalis* had increasing the tryptic inhibition due to elevation of endogenous inhibitor content. The benzamidine also affect the behavioral response moth and caterpillars *A. gemmatalis*, which had a preference for plants which were sprayed with 0 % benzamidine. These results suggest that spraying plants with benzamidine inhibitor positively assisted in plant defense process since there was an increase endogenous inhibitor of insect and not a preference for plants in the presence of inhibitor. Thus, it is considered that the PI is a promising strategy to control *A. gemmatalis* in soybeans.

Keywords: Plant health. Alternative pest control. Soybean caterpillar.

Introdução

Um dos principais desafios da agricultura moderna é aumentar e sustentar a produtividade e ao mesmo tempo reduzir a dependência do uso de agroquímicos. Atualmente, vários estudos se concentram nos mecanismos de defesa endógena das plantas na tentativa de desenvolver culturas cada vez mais sustentáveis.

Para se defender de ataques de herbívoros, as plantas desencadeiam uma série de mecanismos bioquímicos que auxiliam na sua sobrevivência. Muitos são os compostos que participam da interação planta-inseto, entre eles os inibidores de proteases (IP) os quais auxiliam na resistência aos insetos praga. É comum e amplamente distribuída a ocorrência de IP no reino vegetal, que são moléculas pequenas, estáveis e que podem atuar como proteínas de reserva, reguladores de enzimas e na defesa da planta contra insetos e patógenos (GREEN; RYAN, 1972).

Inúmeros trabalhos constataram que as plantas respondem ao ataque de insetos através da via das lipoxigenases, que culmina na produção de ácido jasmônico, responsável pela ativação de genes que codificam IP (GARDNER, 1991; FARMER; RYAN, 1992; LATITHA *et al*, 2005). A ingestão dos IPs pelos insetos interfere no processo de degradação das proteínas no intestino médio sendo, portanto considerados agentes antimetabólitos por causarem deficiência protéica nos mesmos. A redução da disponibilidade de aminoácidos prejudica a síntese de novas proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução dos herbívoros (MOREIRA *et al.*, 2011). Há ainda outra hipótese de que os inibidores afetem o desenvolvimento de forma indireta, através de um mecanismo de “feedback”, que levaria a uma hiperprodução de proteases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos biodisponíveis, deslocando aminoácidos para a síntese de mais protea-

ses em detrimento de outras proteínas essenciais (PILON *et al.*, 2009).

Os principais IPs naturais caracterizados até hoje são os da soja, *Glycine max* L. (Fabaceae), (Inibidor de Tripsina Kunitz - KTI e Inibidor de Tripsina e Quimotripsina Bowman-Birk - BBI) (SAGILI; PANKIWAND; ZHU-SALZMAN, 2005). Cerca de 80 % da inibição da atividade trípica de grãos de soja é causada pela ação do KTI. Outros trabalhos relatam a eficiência do uso de inibidores sintéticos, como a benzamidina no controle de insetos praga (PILON; OLIVEIRA; GUEDES, 2006; MARINHO *et al.*, 2010). A benzamidina é uma amidina aromática, que atua como inibidor sintético competitivo de tripsina, apresentando K_i de 1,0 mM.

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é um dos principais insetos pragas da cultura de soja, sendo que agroquímicos permanecem como método de escolha no controle dessa lepidóptera. Resultados do potencial inseticida já foram constatados em condições laboratoriais, quando lagartas da soja foram tratadas com dieta artificial adicionada de benzamidina. Neste contexto, o presente trabalho realizou um estudo a respeito do efeito da benzamidina pulverizada em plantas de soja sobre a bioquímica e o comportamento de *A. gemmatalis* e se a aplicação foliar desse inibidor influencia na produção endógena de IP na soja.

Materiais e métodos

Criação de *Anticarsia gemmatalis*

Os insetos foram criados com dieta artificial (HOFFMAN-CAMPO; OLIVEIRA; MOSCARDI, 1985) e mantidos no Laboratório de Criação de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa.

Cultivo das plantas de soja

Foram cultivadas três plantas de soja variedade comercial CAC-1 em cada vaso com capacidade para 4,0 kg de solo, em condições de casa de vegetação. Vinte e quatro vasos contendo três plantas de soja no estágio V2, com histórico livre de aplicação de qualquer produto foliar, foram acondicionados em gaiolas com dimensões de 1m x 1m x 1m, recobertas com organza. Cada tratamento foi delineado em uma gaiola em particular.

Tratamentos

Ao alcançar o estágio V3, o primeiro trifólio de cada planta foi submetido ao ataque de uma lagarta de 4^o ou 5^o instar. Após a inserção das lagartas foi realizada a pulverização das mudas de acordo com os tratamentos. No tratamento controle as plantas foram pulverizadas somente com uma solução aquosa de Triton X-100 0,01 % (v/v), já as plantas dos tratamentos testes foram pulverizadas com a solução aquosa contendo Triton X-100 0,01 % (v/v) acrescida de 0,15, 0,30, 0,45, 0,60 e 0,75 % (p/v) de benzamida.

Obtenção dos extratos foliares da soja e do trato intestinal do inseto

Após a pulverização foram retirados seis vasos de cada tratamento nos seguintes tempos 6, 12, 24 e 48 horas. As mudas retiradas não retornaram às gaiolas. Para obtenção do extrato foliar, três folíolos de cada planta foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C, para a determinação da concentração dos inibidores de proteases endógenos da soja. O preparo do extrato bruto foi realizado a 4°C, de acordo com o método descrito por Ohta *et al.* (1986). O extrato obtido foi utilizado para as determinações da concentração de proteína total e da concentração de inibidor de proteases.

Os intestinos médios de dezoito lagartas de cada tratamento e em cada tempo especificado, foram extraídos em presença de 1 mL de HCl 10⁻³ M a 4°C e acondicionados em microtubos de 2 mL. O extrato enzimático foi obtido pelo rompimento celular resultante de nove ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. Após os ciclos, frações de 1 mL do extrato foram centrifugadas a 100.000 g por 30 min. a 4°C. O sobrenadante contendo o material solúvel foi re-

tirado e mantido a -20°C para determinação da concentração de proteína e atividade de serino protease.

Determinação da concentração protéica

A concentração de proteínas foi realizada de acordo com método do ácido bicinonínico (SMITH *et al.*, 1985), utilizando como padrão uma solução 2,0 mg/ mL de soro albumina bovina. As análises foram feitas numa série de três repetições.

Determinação de inibidores de proteases da soja e da atividade de serino protease do inseto

A atividade tríptica na presença de inibidores foi determinada utilizando-se tripsina bovina, seguindo o protocolo de Kakade *et al.*, (1974). A absorvância da solução foi determinada a 410 nm durante 2,5 minutos de reação.

A atividade de serino protease foi realizada pelo método descrito por Erlanger; Kokowsky; Cohen (1961), utilizando-se o substrato cromogênico L-BApNA, a 25°C em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2 contendo 20 mM de CaCl₂ e 1 % (v/v) de dimetilformamida.

Todas as análises foram realizadas numa série de três repetições.

Teste de preferência de lagartas, pouso e oviposição de *A. gemmatilis* em plantas de soja com ou sem a benzamida

Para a realização dos três testes de preferência, plantas de soja da variedade CAC-1 no estágio V3 foram cultivadas em tubetes de 8 cm de diâmetro e 20 cm de profundidade e pulverizadas com solução contendo o inibidor benzamida nas concentrações 0,00; 0,15; 0,30; 0,45; 0,60 e 0,75 % (p/v). As plantas foram acondicionadas em gaiola de 1m x 1m x 1m de forma circular e equidistantes, sendo cada planta correspondente a um tratamento.

Para a análise de preferência de lagartas por folhas com ou sem benzamida, trinta lagartas de 4^o instar foram liberadas no centro da arena, sendo a observação e contagem do número de lagartas por tratamento realizadas ao fim de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 12 horas.

No teste de pouso e oviposição foram liberadas dez fêmeas por gaiola e após 15, 30,

45, 60, 75, 90, 105, 120 minutos observaram-se em quais plantas elas estavam pousadas. Como as mariposas da lagarta da soja são de hábito noturno estes testes foram realizados às 21 horas, sendo utilizada uma lanterna com luz ultravioleta para a visualização e contagem dos mesmos. Lepidópteros desta espécie não são capazes de perceber luz neste comprimento de onda. Após 24 horas da soltura das mariposas, as plantas foram retiradas e as posturas foram contadas.

Todos os ensaios de preferência foram realizados em cinco repetições.

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de regressão utilizando o programa Table Curve 3D Windows 2.0 e os modelos escolhidos foram plotados no programa Sigma Plot, versão 7.0 (SPSS, 2001).

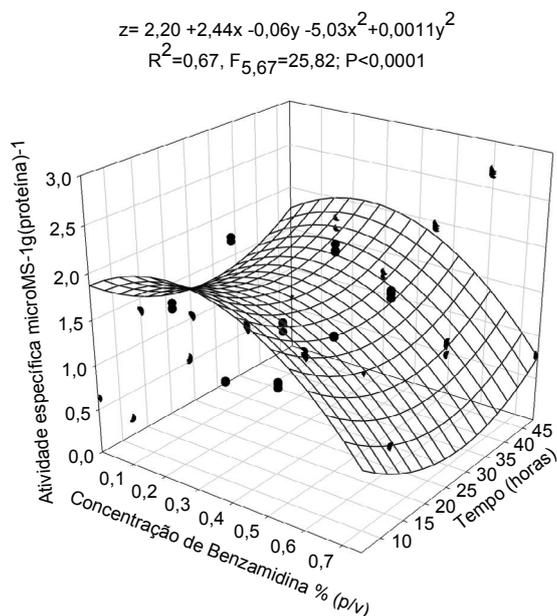
Resultados e discussão

As proteases catalisam a produção de peptídeos e aminoácidos de uma dieta protéica e são encontradas na região do intestino médio do trato digestivo dos insetos. As serino-proteases são as enzimas mais estudadas e foram identificadas em várias famílias de herbívoros, em especial de Lepidópteros (KIPGEN; AGGARWAL, 2014). Mediante a atividade dessas enzimas há liberação de aminoácidos essenciais que são direcionados a síntese de proteínas necessárias para o crescimento, desenvolvimento

e reprodução dos herbívoros. Uma das defesas constitutivas da planta baseia-se na produção de inibidores de proteases pela rota octadecanóide, a qual utiliza lipídeos de membrana para síntese de IP e compostos voláteis. Os IPs são reconhecidos compostos de defesa e muitos já foram bem caracterizados. Estes inibem a atividade de proteases digestivas, afetando o crescimento do inseto (MENDOZA-BLANCO; CASARETTO, 2012).

No presente trabalho observou-se uma redução na atividade amidásica de serino-protease (tripsinas-like) da lagarta ao longo do tempo, a partir da concentração de 0,15 % (p/v) de benzamidina (GRÁFICO 1). Efeito semelhante foi observado por Moreira *et al.* (2011), que verificaram uma queda na atividade trípica a medida em que se aumentava a concentração do inibidor berenil em lagartas de *A. gemmatalis* alimentadas com dieta artificial acrescida do IP. Broadway (1995), estudando as espécies de lepidópteros *Pieris rapae* (Pieridae), *Pieris napi* (Pieridae), *Plutella xylostella* (Plutellidae), *Trichoplusia ni* (Noctuidae), *Lymantria dispar* (Lymantriidae) e *Helicoverpa zea* (Noctuidae) observou que estes insetos apresentaram atividades de tripsina e quimiotripsina, sendo que índices muito maiores de atividade eram atribuídas a tripsinas. Do mesmo modo, inibidores de tripsina mostraram-se muito mais eficientes. Esses resultados sugerem que inibidores de serino-protease (tripsina) na defesa de plantas ao ataque de lepidópteros são muito eficientes, uma vez que a digestão desses insetos é mais dependente de tripsinas-like.

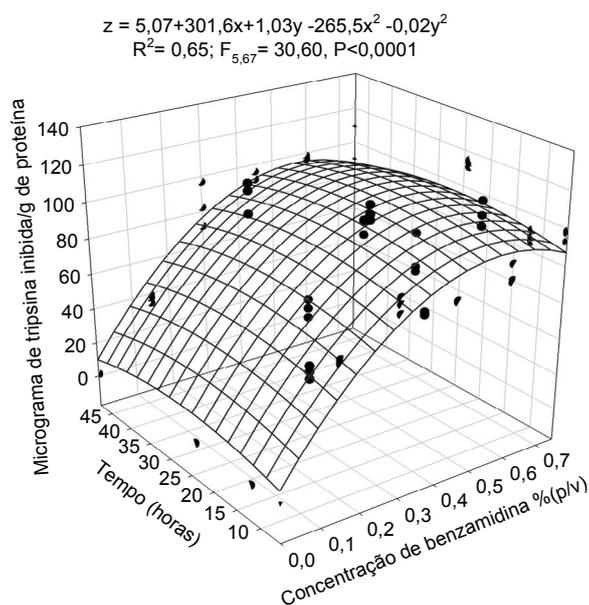
Gráfico 1 - Atividade de serino-protease (tripsinas-like) obtidas do intestino médio de *Anticarsia gemmatalis* alimentadas com plantas de soja pulverizadas com diferentes concentrações de benzamidina e analisadas nos períodos de 6, 12, 24 e 48 horas.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2015.

No Gráfico 2 é possível verificar que plantas de soja pulverizadas com benzamidina, em presença de *A. gemmatalis*, tiveram crescente aumento na inibição triptica. Esses resultados sugerem que as plantas de soja respondem ao ataque do inseto através da produção endógena de inibidores de proteases uma vez que ocorreu aumento da inibição triptica com o tempo. Além da benzamidina pulverizada na planta ocorreu também a produção de inibidor endógeno da soja. Tal resultado também justifica a redução na atividade amidásica de serino-protease (tripsinas-like) da lagarta ao longo do tempo, apresentada no Gráfico 1.

Gráfico 2 - Determinação dos níveis de inibidores em folhas de soja, pulverizadas com inibidor de protease benzamidina nas concentrações de benzamidina 0, 0.15, 0.30, 0.45, 0.60 e 0.75 % (p/v) e coletadas nos tempos 6, 12, 24 e 48 horas de ataque de lagartas *Anticarsia gemmatalis*.



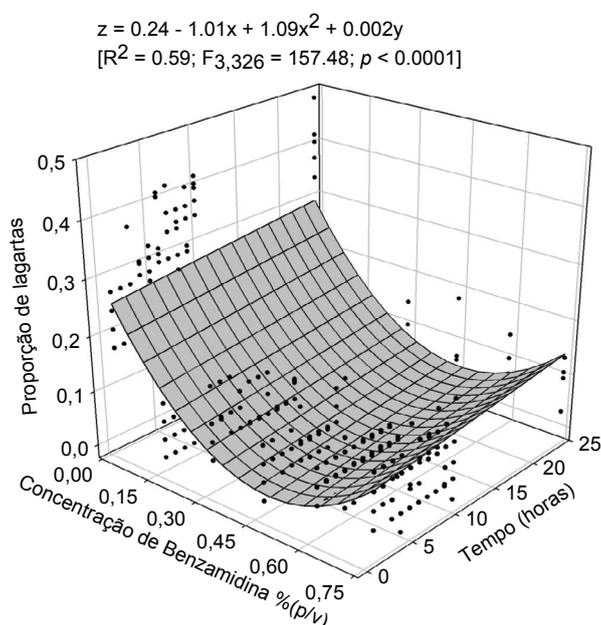
Fonte: Elaborado pelos autores, 2015.

Marinho *et al.* (2010) observaram aumento na produção de inibidores em plantas de eucalipto e goiaba após a aplicação de benzamidina e ataque de *Thyrinteina leucoceraea* (Lepidoptera: Geometridae). A atividade lipoxigenase (LOX) e a produção de IP também foram avaliadas em três cultivares de soja sendo, um susceptível e dois resistentes ao ataque de *A. gemmatalis*. Atividade de LOX apresentou um incremento de aproximadamente 80 % nos três cultivares após 24 h do ataque e pulverização com berenil, incremento este observado também para a produção de PI (PAIXÃO *et al.*, 2013). Com os resultados obtidos nesse estudo, pode-se inferir que, independentemente da aplicação de benzamidina, ocorreu à produção de inibidores endógenos, os quais são relatados na literatura, serem componentes de defesa das plantas. Estes dados sugerem que pulverização de plantas com inibidor benzamidina auxiliou positivamente no processo de defesa da planta uma vez que ocorreu aumento de inibidor endógeno.

No teste de preferência lagartas a folhas sem ou com inibidor, houve um efeito signifi-

cado entre a proporção de lagartas versus a concentração de inibidor e o tempo de exposição (GRÁFICO 3). A proporção de lagartas nas plantas controle (0 % de benzamidina) foi maior do que nas plantas pulverizadas com o inibidor, em todos os tempos avaliados. Esses dados indicam que lagartas de *A. gemmatalis* apresentam uma não preferência por plantas de soja que receberam aplicações do inibidor. Esse efeito foi mais acentuado na concentração de 0,45 % de benzamidina. Em soja, Lin; Fischer (1990) avaliaram o efeito sobre a preferência alimentar do coleóptero *Epilachna varivestis* (Coccinellidae) por plantas sadias e após o ataque do lepidóptero *Pseudoplusia includens* (Noctuidae). Os autores verificaram que as plantas injuriadas por *P. includens* foram rejeitadas pelo coleóptero, possivelmente em decorrência do acúmulo de metabólitos secundários, como o PIIF (fator indutor de inibidor de protease), no sistema vascular da planta. Os compostos de plantas, especialmente aqueles produzidos após danos por herbívoros podem afetar o desenvolvimento e causar mortalidade, especialmente em larvas de primeiro instar, que são mais susceptíveis (SCOTT; THALER; SCOTT, 2010).

Gráfico 3 - Preferência de lagartas por plantas de soja pulverizadas com diferentes concentrações de benzamidina e analisadas em diferentes tempos.

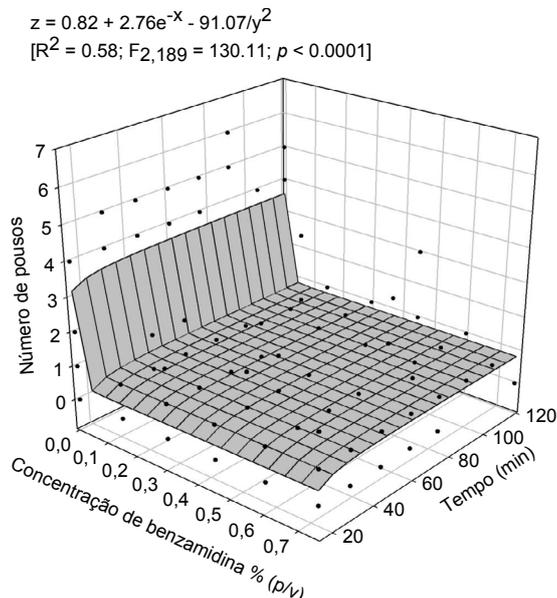


Fonte: Elaborado pelos autores, 2015.

Com relação à visitação de mariposas verificou-se um efeito significativo entre a visitação versus a concentração de inibidor e o tempo de exposição (GRÁFICO 4). Também se pode notar que a proporção de mariposas em plantas

controle (0 % de benzamidina) foi bem maior do que em plantas pulverizadas com o inibidor, em todos os períodos testados.

Gráfico 4 - Preferências de pouso de mariposas em plantas de soja pulverizadas com diferentes concentrações do inibidor de protease benzamidina e analisadas em diferentes tempos.

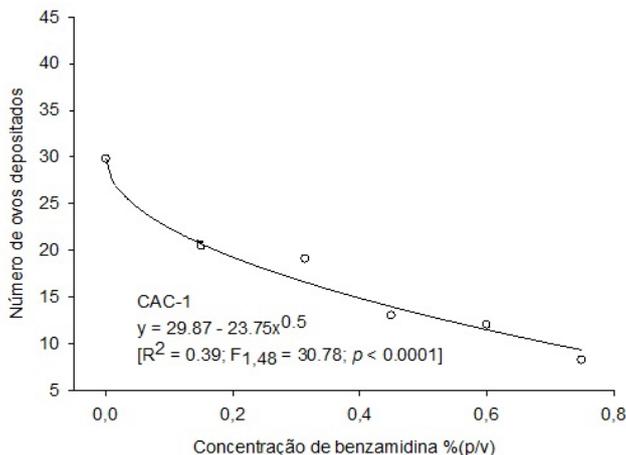


Fonte: Elaborado pelos autores, 2015.

O número de ovos ovipositados na planta e a concentração de inibidor apresentaram efeito significativo (GRÁFICO 5). Trata-se de uma correlação negativa, ou seja, quanto maior

a concentração de benzamidina aplicada menor a quantidade de ovos depositados nas plantas de soja, portanto, menor oviposição em folhas tratadas com inibidores de proteases.

Gráfico 5 - Avaliação da preferência para oviposição em plantas de soja pulverizadas com diferentes concentrações do inibidor de protease benzamidina.



Fonte: Elaborado pelos autores, 2015.

Provavelmente as fêmeas de *A. gemmatalis* perceberam a presença do inibidor benzamidina sobre as folhas das plantas, evitando realização de posturas, uma vez que os IPs podem reduzir o desenvolvimento e desempenho de seus descendentes. A seleção de um hospedeiro seja pela qualidade ou ausência de inimigos naturais é normalmente realizada pela fêmea. O sucesso dos descendentes está liga-

do ao comportamento de escolha dos sítios de oviposição, já que lagartas apresentam baixa mobilidade. Isso é importante, pois compostos produzidos por plantas após o ataque dos herbívoros podem afetar o seu crescimento tendo um efeito negativo significativo, principalmente, em lagartas de primeiro estágio de desenvolvimento (SCOTT; THALER; SCOTT, 2010).

Conclusão

A benzamidina reduz a atividade amidásica de serino-protease presente no intestino médio de *A. gemmatalis* e altera o comportamento de lagartas e mariposas deste inseto, as quais apresentam preferência alimentar, de pouso e oviposição, por plantas pulverizadas com 0 % de benzamidina.

Plantas de soja pulverizadas com benzamidina respondem com aumento nos níveis inibidores endógenos.

O uso de IP é uma estratégia promissora no controle de *A. gemmatalis* na cultura da soja.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Planta-Praga (INCT-PP) pelo suporte financeiro.

Referências

- BROADWAY, R. M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? **Journal of Insect Physiology**, Langford Lane, v. 41, p. 107-116, 1995.
- ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, San Antonio, v. 95, p. 271-278, 1961.
- FARMER, E. E.; RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, Rockville, v. 4, p. 129-134, 1992.
- GARDNER, W. H. Recent investigation into the lipoxygenase pathway of plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, San Francisco, v. 1084, p. 221-239, 1991.
- GREEN, T. R.; RYAN, C. A. Wound-induced proteinase inhibitor in plants leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, Washington, v. 175, p. 776-777, 1972.
- HOFFMAN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B.; MOSCARDI, F. **Criação massal da lagarta da soja (*Anticarsia gemmatalis*)**. EMBRAPA-CNPSo, Londrina. Serviço de Produção de Informação, Documentos, 23 p. 1985.
- KAKADE, M. L. *et al.* Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry Journal**, Madison, v. 51, p. 376-382, 1974.
- KIPGEN, L.; AGGARWAL, K. K. Gut protease profiles of different instars of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **International Journal of Tropical Insect Science**, Cambridge, v. 34, p. 172-178, 2014.
- LATITHA, S. *et al.* Effectiveness of recombinant soybean cysteine proteinase inhibitors against selected crop pests. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, New York, v. 140, p. 227-235, 2005.
- LIN, H. M.; FISCHER, D. Induced resistance in soybean to the Mexican bean beetle (Coleoptera: Coccinellidae): comparisons of inducing factors. **Environmental Entomology**, Annapolis, v. 19, p. 1852-1857, 1990.
- MARINHO, J. S. *et al.* Resposta bioquímica de *Thyreteina leucoceraea* a inibidor de proteases em plantas de goiaba. **IDESIA**, Arica, v. 28, n. 3, p. 101-109, 2010.
- MENDOZA-BLANCO, W.; CASARETTO J. A. The serine protease inhibitors and plant-insect interaction. **IDESIA**, Arica, v. 30, p. 121-126, 2012.
- MOREIRA, L. F. *et al.* Survival and developmental impairment induced by the trypsin inhibitor bis-benzamidine in the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*). **Crop Protection**, Langford Lane, v. 30, p. 1285-1290, 2011.
- OHTA, H. *et al.* Changes in lipoxygenase components of rice seedling during germination. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 911-918, 1986.
- PAIXÃO, G. N. P. *et al.* Biochemical responses of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) in soybean cultivars sprayed with the protease inhibitor berenil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, v. 61, n. 34, p. 8034-8038, 2013.
- PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor, benzamidine. **Pesticide, Biochemistry and Physiology**, San Diego, v. 86, n. 1, p. 23-29, 2006.
- PILON, A. M. *et al.* Adaptação da lagarta de soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 6, p. 744-748, 2009.
- SAGILI, R. R.; PANKIWAND, T.; ZHU-SALZMAN, K. Effects of soybean trypsin inhibitor hypopharyngeal gland protein content, total midgut protease activity and survival of the honey bee (*Apis mellifera* L.). **Journal of Insect Physiology**, Langford Lane, v. 51, n. 9, p. 953-957, 2005.
- SCOTT, I. M.; THALER, J. S.; SCOTT, J. G. Response of a generalist herbivore *Trichoplusia ni* to jasmonate-mediated induced defense in tomato. **Journal of Chemistry Ecology**, San Francisco, v. 36, p. 490-499, 2010.
- SMITH, P. K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 15, p. 76-85, 1985.