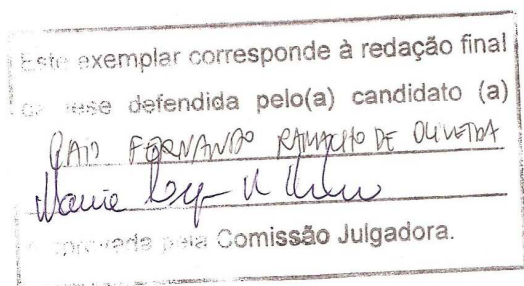


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAIO FERNANDO RAMALHO DE OLIVEIRA

**“ASPECTOS FUNCIONAIS E ESTRUTURAIS DO INIBIDOR DE
TRIPSINA DE *Entada acaciifolia*”**



Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Funcional e
Molecular, na área de Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo
Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Aparício

Campinas, 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

OL42a

Oliveira, Caio Fernando Ramalho de
Aspectos funcionais e estruturais do inibidor de tripsina
de *Entada acaciifolia* / Caio Fernando Ramalho de Oliveira.
– Campinas, SP: [s.n.], 2011.

Orientadores: Maria Lígia Rodrigues Macedo, Ricardo
Aparício.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Entada acaciifolia*. 2. Interação inseto-planta. 3.
Inibidores da tripsina. I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues.
II. Aparício, Ricardo. III. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Functional and structural aspects of trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia*.

Palavras-chave em inglês: *Entada acaciifolia*; Insect-plant insect interaction; Trypsin inhibitors.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo, Maria das Graças Machado Freire, Marcio de Castro Silva Filho.

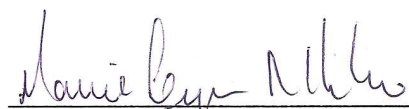
Data da defesa: 18/02/2011.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 18 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo


Assinatura

Profa. Dra. Maria das Graças Machado Freire


Assinatura

Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho


Assinatura

Profa. Dra. Maria Cristina Mattar da Silva

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Assinatura

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Maria Lígia Rodrigues Macedo pela honrosa orientação, dedicação, discussões e convívio que valeram em meu amadurecimento e tornaram possível a concretização deste trabalho.

À Prof^a Dr^a. Maria das Graças Machado Freire pela valiosa amizade, atenção e incentivo, indispensáveis nesta etapa da minha vida.

Ao Prof. Dr. Ricardo Aparício pela co-orientação e participação neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni que me acolheu em seu laboratório, oferecendo-me todo o suporte necessário para meu desenvolvimento acadêmico. Muito obrigado pela oportunidade, sou muito grato por tudo!

Ao Prof. Dr. José Roberto Postali Parra e Neide Graciano Zério, do Departamento de Entomologia/ESALq-USP, pela participação neste trabalho.

Aos professores que participaram de minha banca de qualificação, Dr^a. Maria das Graças Machado Freire, Dr^a. Gláucia Coelho de Mello e Dr. Marcelo Lancellotti, os quais apresentaram sugestões e observações, importantes para cuidadosa revisão deste trabalho.

Aos professores Dr. Marcio de Castro Silva Filho e Dr^a. Maria das Graças Machado Freire por participarem da banca examinadora desta tese, acrescentando valiosas sugestões que vieram a enriquecer o meu trabalho.

A minha querida família, que a custo de sacrifícios puderam me ofereceram uma educação de qualidade, indispensável para que eu alcançasse meus objetivos. A vocês minha eterna gratidão!

As minhas amadas esposa e filha, Luana e Luise, pela incansável ajuda, dedicação, compreensão, apoio, carinho e noites mal dormidas... por compartilharem comigo as alegrias e tristezas desta etapa de nossas vidas, amo muito vocês!

Ao Paulinho Baldasso, grande técnico e pessoa, o qual se tornou um grande amigo.

Aos queridos colegas do LAQUIP e LPPFB pelo acolhimento, companheirismo e prazerosas discussões ao longo deste período de convivência.

A todos os amigos, alunos, técnicos e professores que me auxiliaram nesta caminhada, em todo o processo de desenvolvimento deste trabalho.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica pelos ensinamentos.

A CAPES pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

ABREVIACÕES.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
I – INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – Insetos-praga.....	2
2 – Interação inseto-planta.....	4
2.1 – Proteínas vegetais inseticidas.....	5
2.2 - Inibidores de enzimas proteolíticas.....	8
2.3 - Cinética dos inibidores.....	11
2.4 - Respostas dos insetos às defesas vegetais	13
3 – Inibidores enzimáticos como ferramenta biotecnológica alternativa	17
4 - Nova geração de plantas geneticamente modificadas	21
II – OBJETIVOS	25
III – MATERIAIS	27
1.1 - <i>Entada acaciifolia</i>	27
1.2 - Insetos.....	27
1.3 – Enzimas	29
1.4 – Substratos.....	30
1.5 – Resinas	30
IV – MÉTODOS	31
1 - Isolamento e purificação do inibidor de <i>E. acaciifolia</i>	31
1.1 - Obtenção da farinha de sementes de <i>E. acaciifolia</i>	31
1.2 - Obtenção do Extrato Bruto.....	31
1.3 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75.....	32
1.4 - Cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose	32

1.5 - Cromatografia de afinidade Sepharose-tripsina	32
1.6 - Cromatografia em coluna C-18.....	33
2 - Quantificação de proteínas.....	34
3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS	34
4 - Determinação da massa acurada por espectrometria MALDI-TOF.....	35
5 - Análise da composição de aminoácidos	35
6 - Determinação da sequência N-terminal	36
7 – Estudo de homologia similaridade sequencial	36
8 - Caracterização do Inibidor de <i>E. acaciifolia</i>	37
8.1 - Atividade inibitória frente à tripsina bovina	37
8.2 - Atividade inibitória frente à quimiotripsina bovina	38
8.3 - Estequiometria de inibição	38
8.4 - Determinação da constante de inibição	39
9 - Estudos de estabilidade de EATI	39
9.1 - Estabilidade térmica	39
9.2 - Estabilidade a variação de pH.....	40
9.3 - Estabilidade ao Ditioneitol (DTT).....	40
10 - Dicroísmo circular de EATI.....	41
11 - Estudo da atividade biológica de EATI frente às proteases de diferentes insetos-praga	42
V – RESULTADOS	45
1 - Purificação de EATI.....	45
1.1 - Cromatografia em coluna Sephadex G-75.....	45
1.2 - Cromatografia em coluna DEAE-Sepharose.....	46
1.3 - Cromatografia em coluna Sepharose-tripsina.....	47
1.4 - Cromatografia em coluna C-18.....	48
1.5 - Tabela de purificação do inibidor	49

2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS	49
3 - Determinação da massa acurada por espectrometria MALDI-TOF.....	50
4 - Análise da composição de aminoácidos	51
5 - Determinação da sequência N-terminal	52
6 - Caracterização do Inibidor de <i>E. acaciifolia</i>	53
7 - Estudos de estabilidade de EATI	54
7.1 - Estabilidade ao Ditionitrito (DTT).....	54
7.2 - Estabilidade térmica	55
7.3 - Estabilidade a variação de pH.....	56
8 - Dicroísmo circular de EATI.....	57
9 - Estudo da atividade biológica de EATI frente às proteases de diferentes insetos-praga	61
VI – DISCUSSÃO.....	63
VII – CONCLUSÕES.....	77
VIII – PERSPECTIVAS FUTURAS	78
IX – REFERÊNCIAS	79

ABREVIACÕES

ACTI-A - Inibidor de tripsina de *Acacia confusa*

APTI-DE5 - Inibidor de tripsina de *Adenanthera pavonina*

BAPNA - N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide

BvTI - Inibidor de tripsina de *Bauhinia variegata*

CmTI – Inibidor de tripsina de *Curcubita maxima*

DC – Dicroísmo Circular

DTT – Ditionitrito

EATI – Inibidor de tripsina de *Entada acaciifolia*

EcTI - Inibidor de tripsina de *Enterolobium contortisiliquum*

ESTI – Inibidor de tripsina de *Entada scandens*

ETI – Inibidor de tripsina de *Erythrina caffra*

GNA – Lectina de *Galanthus nivalis*

IP – Inibidor de protease

KTI - Inibidor de tripsina de soja

LITI -Inibidor de tripsina de *Leucaena leucocephala*

SDS-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS

PjTI - Inibidor de tripsina de *Prosopis juliflora*

RIP – Proteínas Inativadoras de Ribossomos

STI – Inibidor de tripsina de soja

RESUMO

Diversas pesquisas buscam candidatos para o controle alternativo de pragas agrícolas, uma vez conhecidos os malefícios oriundos do emprego de inseticidas químicos nas lavouras. Neste trabalho, um inibidor de tripsina isolado de sementes de *Entada acaciifolia* (Mimosoideae) – (EATI) foi purificado e caracterizado sob o ponto de vista funcional e estrutural. O inibidor mostrou-se estável a variações térmicas e de pH, além de apresentar sua atividade inibitória inalterada tanto na forma oxidada quanto na forma reduzida com 100 mM de DTT. Quando submetido à cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C-18, EATI foi resolvido em 4 picos, indicando a presença de 4 isoformas, sendo que a isoforma majoritária apresentou uma massa acurada de 19.725 Daltons, revelada através de espectrometria de massa MALDI-TOF. Outras características como a estequiometria de inibição, a constante de inibição (K_i), a análise da composição global de aminoácidos e o sequenciamento N-terminal permitiram classificar EATI como membro da família Kunitz de inibidores de serinoprotease. Estudos de dicroísmo circular revelaram um alto conteúdo de folhas- β e estruturas não ordenadas além da aparente ausência de α -hélices, padrão comum a esta classe de proteínas. A incubação em 1 mM de DTT resultou em perturbações em sua cadeia polipeptídica, corroborando os ensaios *in vitro*. EATI foi resistente à desnaturação por ureia, característica relatada para outros inibidores vegetais. O inibidor apresentou uma interessante atividade inibitória *in vitro* contra as proteases de diversos insetos-praga. De acordo com estes resultados, apontamos EATI como uma ferramenta promissora no combate a pragas agrícolas.

ABSTRACT

Several studies seeking alternative candidates for the control of agricultural pests, once known harm from the use of chemical insecticides in crops. In this work, a trypsin inhibitor isolated from *Entada acaciifolia* seeds (Mimosoideae) - (EATI) was purified and characterized from the point of view functional and structural. The inhibitor was stable to thermal heat and pH range, in addition to its inhibitory activity unchanged in both the oxidized and in reduced form with 100 mM DTT. When subjected to high performance liquid chromatography on C-18 column, EATI was resolved in four peaks, indicating the presence of four isoforms, with the major isoform showing an accurate mass of 19,725 Daltons, as revealed by MALDI-TOF mass spectrometry. Other characteristic such as stoichiometry of inhibition, the dissociation constant (K_i), the analysis of global amino acid composition and N-terminal sequencing allowed to classify EATI as member of the Kunitz family of serine protease inhibitors. Circular dichroism studies revealed a high content of β -sheets and unordered structures beyond the apparent absence of α -helix, typical of this class of proteins. Incubation in 1 mM DTT resulted in small perturbations in their polypeptide chain, corroborate the *in vitro* assays. EATI was resistant to denaturation by urea, a characteristic reported for other plant inhibitors. The inhibitor presented an interesting inhibitory activity *in vitro* against the proteases of several insect pests. According to these results, we focused EATI as a promising tool in the fight against agricultural pests.

I – INTRODUÇÃO

Estatísticas dão-nos conta que em 2050 a população humana será de 9,1 bilhões de habitantes. Nestas circunstâncias, recursos básicos como água e alimentos tornar-se-ão escassos. Em especial, o fornecimento de alimento para a população em rápida expansão será um desafio para a humanidade. Dentre as possibilidades existentes, a redução dos prejuízos provocados por pragas agrícolas será de grande valia, já que uma considerável parcela de todo alimento produzido se perde desta forma. Assim, diversos pesquisadores buscam por compostos naturais que possam atuar como bioinseticidas. Os inibidores de protease (IP) constituem uma interessante classe de proteínas vegetais que apresentam atividade inseticida. Durante décadas, seu uso no combate a pragas agrícolas vêm sendo estudado e os resultados nos mostram perspectivas animadoras em sua aplicação como ferramenta biotecnológica para a proteção dos cultivos.

1 – Cenário atual

Com o aumento da população mundial estimado em 34%, a produção agrícola destinada à alimentação e produção de biocombustíveis terá de aumentar pelo menos em 70% (FAO, 2009). Ou seja, caso não haja uma considerável elevação da produtividade agrícola instalaremos uma condição permanente de déficit alimentar. Sabe-se ainda que uma considerável parcela da produção mundial de alimentos, que pode chegar a 20% para as principais culturas, perde-se devido ao ataque de insetos-praga, um fator limitante na

produção de alimento (FERRY *et al.*, 2004), isso sem contabilizarmos os prejuízos provenientes dos ataques de nematoides e microrganismos fitopatogênicos.

Esse problema é ainda mais grave nas regiões tropicais e subtropicais, onde o clima altamente propício e a imensa oferta alimentar aprovisionam um ambiente favorável à reprodução de insetos e exige grandes esforços para suprimir a densidade populacional de diferentes pragas agrícolas, a fim de alcançar um fornecimento adequado de alimento. Ainda hoje, a maior parte dos métodos disponíveis para o controle de pragas emprega inseticidas químicos, ambientalmente agressivos e altamente tóxicos ao ser humano. De acordo com Oerke *et al.* (1994), sua aplicação reduz as perdas agrícolas em apenas 7%. Este fato associado a todos os malefícios provenientes de seu uso, tanto do ponto de vista ambiental quanto de saúde pública, justificam o desenvolvimento de pesquisas que originem ferramentas alternativas para solucionar este problema.

1.1 – Insetos-praga

Consideram-se pragas insetos fitófagos capazes de provocar danos de importância econômica. Quanto a sua biologia, estes podem ser classificados em generalistas e especialistas (BERNAYS & CHAPMAN, 1994). Insetos generalistas alimentam-se de uma ampla variedade de espécies de plantas e seus mecanismos adaptativos são complexos, pois tendem responder a diferentes substâncias químicas e proteínas de plantas (RAMOS, 2008). Por outro lado, insetos especialistas hospedam-se em poucas espécies de plantas

relacionadas e podem apresentar uma eficiente forma de adaptação, envolvendo a produção de grandes quantidades de enzimas para desintoxicação de seu alimento ou ainda mecanismos de reservas das toxinas da planta hospedeira (PRICE, 1997; PATANKAR *et al.* 2001).

Insetos pertencentes às ordens Coleoptera e Lepidoptera representam os principais responsáveis por prejuízos no campo e no armazenamento. Os coleópteros da família Bruchidae são de maior importância em relação à infestação de feijões (SINGH *et al.*, 1985). Em relação aos lepidópteros, esta ordem agrupa as mariposas e borboletas, cujos adultos não podem consumir materiais sólidos, sendo os danos causados pelas larvas, que possuem aparato mastigador (VOLPICELLA *et al.*, 2003).

No cenário agrícola brasileiro podemos apontar algumas espécies de lepidópteros como de grande importância econômica, seja pela variedade de culturas que atacam, pela importância do grão atacado como produto de exportação ou até pela dificuldade de controle de sua disseminação. A monocultura extensiva de culturas como da soja e milho exige uma elevada utilização de agrotóxicos para combater o ataque de insetos-praga, especialmente as lagartas do cartucho, *Spodoptera frugiperda*, e da soja, *Anticarsia gemmatilis* (MOSCARDI & SOUZA, 2002). Já as lagartas do gênero *Helicoverpa* são as principais pragas da cultura do algodão no Brasil e outros países das Américas, Austrália e África (SADRAS, 1998). O gênero *Agrotis* constitui um sério grupo de pragas presentes em toda a Europa, Ásia e parte da África e das Américas (JAKUBOWSKA *et al.*, 2005). Suas larvas passam boa parte do tempo de vida no solo e alimentam-se de uma grande variedade de culturas incluindo o milho, beterraba, batata, repolho, cereais, tabaco, videira, e muitos

outros (IGNOFFO & GARCIA, 1979). Considerada uma das principais e mais destrutivas pragas do tabaco, a lagarta do tabaco *Heliothis virescens* ataca ainda diversas espécies do gênero *Nicotiana*. As lagartas atacam brotos e flores e na ausência de tecido reprodutivo atacam tecido foliar (PAIR, 1994). A broca da cana *Diatraea saccharalis* é a principal praga da cana-de-açúcar no Brasil, provocando danos ao caule das plantas que resulta em perda de produção para as indústrias de açúcar e álcool (FALCO & SILVA FILHO, 2003).

O custo destinado ao controle destes insetos é muitas vezes tão alto que o cultivo destas culturas pode não ser financeiramente viável (MONNERAT *et al.*, 2007). Uma vez conhecidos os prejuízos provocados e tendo-se ciência da necessidade do controle destas pragas, estudos sobre ferramentas de controle devem ser realizados junto ao melhor entendimento da interação inseto-planta, objetivando-se obter alternativas eficazes de controle.

2 – Interação inseto-planta

Interações bióticas são amplamente diversas. A complexidade de comunidades naturais é alcançada após milhares de anos de interação onde os efeitos provocados por uma espécie sobre outra irão modular mudanças e respostas adaptativas. Por coexistirem a pelo menos 100 milhões de anos, plantas e insetos desenvolveram uma variedade de interações benéficas e deletérias (STOTZ *et al.*, 1999). Muitas plantas tiveram sua disseminação facilitada por insetos polinizadores, garantindo assim o sucesso e a

perpetuação de sua espécie. Por outro lado, muitos insetos beneficiaram-se das plantas das mais variadas formas: tornaram-se local de abrigo, ovoposição, reprodução e alimentação. No intuito de evitarem uma herbivoria demasiada, as plantas desenvolveram sofisticadas defesas químicas capazes de causar uma drástica redução na alimentação dos insetos. Estas defesas têm de ser orquestradas no tempo e no espaço através de complexas redes reguladoras moduladas por interações com outras vias de sinalização (MAFFEI *et al.*, 2007). Assim, as respostas integradas levam a um padrão característico, dentre outras muitas atividades, à produção de fitoquímicos direcionados contra invasores e organismos herbívoros.

2.1 – Proteínas vegetais inseticidas

Plantas possuem muitos mecanismos de proteção contra insetos, incluindo diferentes tipos de proteínas inseticidas (CARLINI & GROSSI DE SÁ, 2002). Atualmente um grande número de proteínas vegetais que supostamente apresentam propriedades tóxicas são conhecidas e as mais bem estudadas são as lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos, canatoxinas, inibidores de α -amilase e inibidores de enzimas proteolíticas, sendo estes analisados com maiores detalhes a seguir.

Lectinas são definidas como proteínas que possuem ao menos um domínio não catalítico e se ligam reverssivelmente e especificamente a um mono ou oligossacarídeo (VAN DAMME *et al.*, 2008a; HAMSHOU *et al.*, 2009). Ao longo das duas últimas décadas, lectinas constitutivamente expressas têm sido identificadas em muitas espécies vegetais, apresentando grande diversidade estrutural e especificidade por açúcares

(MICHIELS *et al.*, 2010). Recentemente, lectinas com expressão induzida também têm sido identificadas, sendo ambos os grupos divididos dentro de 12 famílias (VAN DAMME *et al.*, 2008b).

Embora evidências mostrem que a interação com carboidratos seja necessária para a atividade inseticida, o modo de ação de lectinas sobre os insetos permanece enigmático (HAMSHOU *et al.*, 2009). Alguns autores sugerem que o efeito inseticida aconteça por estas proteínas atuarem como moléculas de reconhecimento nas interações célula-célula ou sobre a matriz celular (LIMA *et al.*, 1999; COELHO *et al.*, 2007), podendo ligar-se à membrana peritrófica e/ou estruturas quitinosas na região do intestino médio dos insetos, dificultando o trânsito de moléculas e o mecanismo de reciclagem de enzimas entre os compartimentos endo e ectoperitróficos (OLIVEIRA *et al.*, 2011). De acordo com Macedo *et al.* (2007a), outros possíveis alvos no intestino são enzimas e outras proteínas glicosiladas, causando a inibição da absorção de nutrientes e/ou ruptura das células intestinais. Sabe-se, entretanto, que um pré-requisito para a toxicidade de uma lectina é a resistência à hidrólise no intestino do inseto alvo (MACEDO *et al.*, 2010a).

Proteínas inativadoras de ribossomos (RIP) ocorrem em muitas, mas não em todas as famílias de plantas. Estas proteínas provocam danos a ribossomos, impedindo a síntese de proteínas (VARGAS *et al.*, 2009). Esta classe de proteína inseticida pode ser dividida em 3 subclasses: RIP do tipo I, constituídas de cadeias polipeptídicas simples de aproximadamente 30 kDa; de tipo II, que possuem 2 cadeias polipeptídicas: uma subunidade A enzimaticamente ativa ligada a uma subunidade B (OLSNES & PIHL, 1973)

e as RIP do tipo III, sintetizadas como precursores inativos (ProRIP), os quais necessitam sofrer um processamento proteolítico para formarem RIP ativas (PEUMANS *et al.*, 2001).

Grande parte das RIP do tipo II são altamente tóxicas e atuam intracelularmente. A subunidade B interage com receptores na superfície celular que provoca a internalização da holotoxina. Uma vez dentro do compartimento endocítico, há a separação dos domínios, liberando então a subunidade A enzimaticamente ativa, que atinge o citoplasma e danifica o RNAr, inativando os ribossomos (OLNES *et al.*, 1999). A menor toxicidade de muitas RIP de cadeia polipeptídica única tem sido atribuída à falta de uma subunidade com domínio capaz de translocar a toxina através da membrana para o citoplasma (SANDVIG & VAN DEURS, 2005).

Canatoxina é uma potente proteína neurotóxica isolada das sementes do feijão *Canavalia ensiformis*. Esta proteína comporta-se como dímeros ligados não-covalentemente de massa próxima a 95 kDa, que podem constituir até 0,5 % do peso seco das sementes (CARLINI & GROSSI DE SÁ, 2002). Além da atividade neurotóxica, a canatoxina apresenta uma atividade semelhante à das lectinas. Outra característica, o padrão de acúmulo durante o processo de maturação das sementes sugere um importante papel fisiológico, que pode ser relacionado à defesa vegetal. Carlini *et al.* (1997) realizaram um ensaio alimentar com diferentes insetos para avaliar esta hipótese e observaram uma importante atividade inseticida desta proteína para insetos pertencentes a diferentes ordens: Lepidoptera, Orthoptera, Diptera, Coleoptera e Hemiptera.

Inibidores de α -amilase ocorrem em várias espécies como parte do mecanismo de defesa vegetal. Amplamente distribuída entre os insetos que se alimentam exclusivamente

de sementes e seus derivados durante o período larval ou adulto, as amilases passaram a ser alvo em potencial para o controle de muitas pragas. Quando a ação das amilases é inibida, a nutrição do organismo é prejudicada, estabelecendo um quadro de falta de energia (CARLINI & GROSSI DE SÁ, 2002), que pode levar à morte. Os efeitos de inibidores de α -amilase de feijão sobre as amilases de diferentes organismos são bastante conhecidos, não apenas em ensaios enzimáticos *in vitro*, já que sementes transgênicas expressando o inibidor de α -amilase do feijão *Phaseolus vulgaris* já foram produzidas, mostrando completa resistência ao gorgulho da ervilha (*Bruchus pisorum*), ao gorgulho do feijão (*Callosobruchus maculatus*) e ao gorgulho do feijão azuki (*Callosobruchus chinensis*) (MORTON *et al.*, 2000; SHADE *et al.*, 1994; SCHROEDER *et al.*, 1995; ISHIMOTO *et al.*, 1996; CHRISPEELS, 1996).

2.2 - Inibidores de enzimas proteolíticas

Estes inibidores compreendem um amplo grupo de proteínas presentes em vegetais, animais e microrganismos. São capazes de inibir enzimas proteolíticas específica e competitivamente. Sua existência na natureza foi relatada pela primeira vez no século XIX por Fermi & Pernossi (1894). Estudos apontam que em plantas estas moléculas possuam variadas funções, atuando como reguladoras de proteases endógenas, proteínas de reserva e como agentes de defesa vegetal contra insetos, microrganismos e outros animais herbívoros (RICHARDSON, 1977). Devido sua gama de funções, podem ser encontrados nos mais variados tecidos vegetais, tais como sementes e tubérculos, caules, folhas e flores.

Quando insetos são submetidos a uma dieta artificial que contenha inibidores específicos para a principal classe de proteases de seus intestinos, estes têm seu crescimento e desenvolvimento retardados, bem como podem apresentar índices de mortalidade bastante significantes (FRANCO *et al.*, 1999). Acreditava-se que a distribuição vegetal destas proteínas era restrita a poucas famílias: Fabaceae, Solanaceae e Poaceae. No entanto, pesquisas recentes revelaram a presença inibidores em outras famílias botânicas, como a Cactaceae, além de relatos da presença destas moléculas em Gimnospermas (Cycadales, Coniferales e Ginkgoales) (SAWANO *et al.*, 2008; TORRES-CASTILLO *et al.*, 2009).

Os IP vegetais descobertos até o momento são específicos para cada uma das 4 classes de enzimas proteolíticas e baseados na sequência de aminoácidos e na constituição de seus sítios reativos, são classificados em inibidores de serino, cisteíno, aspártico e metaloprotease (RICHARDSON, 1977; MACEDO *et al.*, 2007b). Tradicionalmente, estas moléculas têm sido agrupadas em famílias conhecidas como Kunitz, Bowman-Birk, batata I e II, squash, cevada, cistatinas, Thaumatin-like e Ragi A1 (RICHARDSON, 1991; BIRK, 2003; OLIVA *et al.*, 2010). Entretanto, novos inibidores têm sido descritos e classificados de acordo com a classificação proposta na base de dados MEROPS (RAWLINGS *et al.*, 2008), com criação de novas famílias quando novos inibidores apresentam sequências peptídicas ou propriedades bioquímicas distintas. Levando-se em conta esta classificação, o número de famílias salta para 57 (BHATTACHARYYA & BABU, 2009).

Dentre todas as famílias de inibidores de serinoprotease, as família Kunitz e Bowman-Birk são as mais estudadas e melhor caracterizadas. O padrão estrutural da maioria dos inibidores da família Kunitz é uma cadeia polipeptídica única de

aproximadamente 20 kDa contendo duas pontes dissulfeto (cys39 – cys86 e cys136 – cys145) e a presença de um único sítio reativo (KOIDE *et al.*, 1973; LEHLE *et al.*, 1994; OLIVA *et al.*, 2010), como apresentado na Figura 1. O estudo cristalográfico de inibidores depositados em bancos de dados revela que estes possuem uma estrutura terciária globular, composta de 12 folhas β -pregueadas antiparalelas interligadas por longos “loops”. Inibidores da família Bowman-Birk possuem massa entre 8-10 kDa, bem como um alto conteúdo de cisteína (geralmente 14, formando 7 pontes dissulfeto) e apresentando ainda dois sítios reativos (RICHARDSON, 1991, BHATTACHARYYA & BABU, 2009) com a capacidade de inibir simultaneamente e independentemente duas proteases distintas, como tripsina e quimotripsina (CARLINI & GROSSI DE SÁ, 2002).

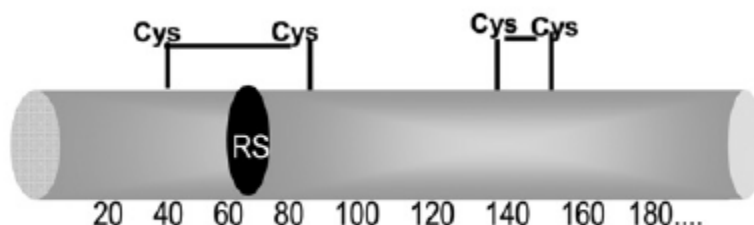


Figura 1. Esquema da estrutura primária de um inibidor vegetal do tipo Kunitz com duas pontes dissulfeto, cadeia polipeptídica simples e único sítio reativo, baseado no inibidor de soja STI. RS: Sítio reativo (adaptado de OLIVA *et al.*, 2010).

O emprego de inibidores vegetais vem sendo sugerido no tratamento de diferentes patologias humanas (SCOTT & TAGGART, 2010). Devido à correlação entre o aumento da atividade proteolítica com muitos processos patológicos, as proteases passaram a ser novos alvos terapêuticos e os inibidores vegetais têm sido utilizados como uma importante ferramenta neste tipo de estudo. Exemplos bem sucedidos de intervenção terapêutica com

inibidores vegetais incluem patologias humanas, como coagulação sanguínea, hemorragias, inflamação e câncer (OLIVA *et al.*, 2000; CHEN & SHAW, 2003; FOOK *et al.* 2005; MELLO *et al.*, 2006).

2.3 - Cinética dos inibidores

Algumas diferenças entre estruturas primárias e topologia são observadas, ainda assim, a estrutura e o mecanismo de ação são bem preservados entre os inibidores de serinoprotease. A grande maioria dos inibidores Kunitz é do tipo competitivo, e se complexam com suas enzimas cognatas através de um mecanismo semelhante ao que ocorre na ligação entre enzima e substrato. A formação do complexo enzima-inibidor ocorre rapidamente, mas a sua dissociação é lenta e resulta na enzima livre e em um inibidor clivado (FRANCO *et al.*, 1999). A interação ocorre em uma região molecular do inibidor, definida como sítio reativo, caracterizada por uma alça ligante exposta, responsável pela ligação ao sítio ativo da enzima alvo, o que permite a formação de um complexo fortemente estável, com constantes de associação da ordem de 10^{-8} – 10^{-13} M, podendo assim neutralizar completamente a atividade enzimática (BIRK, 2003). Estudos de cristalografia de raios-X e de Ressonância Magnética Nuclear revelaram que cerca de 10-15 resíduos de aminoácidos do inibidor estão em contato com o sítio ativo da protease alvo durante a formação do complexo protease-inibidor (BIRK, 2003).

No sítio reativo de um inibidor podemos identificar um resíduo de aminoácido que é especificamente reconhecido pelo sítio de ligação primário da protease alvo, chamado de

resíduo P₁. E adjacente ao resíduo P₁ temos o resíduo P'₁. A ligação peptídica formada entre estes dois resíduos, chamada de ligação peptídica do sítio reativo, é susceptível a hidrólise durante a formação do complexo protease-inibidor (LASKOWSKI, 1986). O diferencial mais importante dos inibidores em relação à grande maioria dos substratos é que eles possuem pontes dissulfeto estruturando o sítio reativo. Após a hidrólise da ligação peptídica do sítio reativo, este ainda é mantido sem mudanças conformacionais significativas graças à presença destas pontes (LASKOWSKI & KATO, 1980; BIRK, 2003).

Grande parte dos inibidores estudados interage com a protease alvo obedecendo a um *mecanismo padrão*, proposto por Laskowski & Kato (1980), exemplificado através do modelo estrutural do inibidor de tripsina e quimotripsina (PFSI) de sementes de feijão *Phaseolus vulgaris* complexado com a enzima α -quimotripsina (DE CARVALHO *et al.*, 1996) na Figura 2. O modelo ilustra a orientação do sítio reativo (P1), correspondente ao aminoácido fenilalanina-43 em relação aos demais elementos necessários para a catálise enzimática. Esses elementos são constituídos pela tríade catalítica, a região específica S1 e a fenda oxianica. A tríade catalítica representa a base para a interação e é formada pelos aminoácidos aspartato-102, histidina-57 e serina-195. A região específica S1, formada por aminoácidos da enzima que determinam a especificidade e a interação com os demais aminoácidos que estão ao redor de uma fenda oxianica, que podem formar pontes de hidrogênio com o átomo de oxigênio (carregado negativamente) do carbono carbonil (C1) do inibidor (FRANCO *et al.*, 1999).

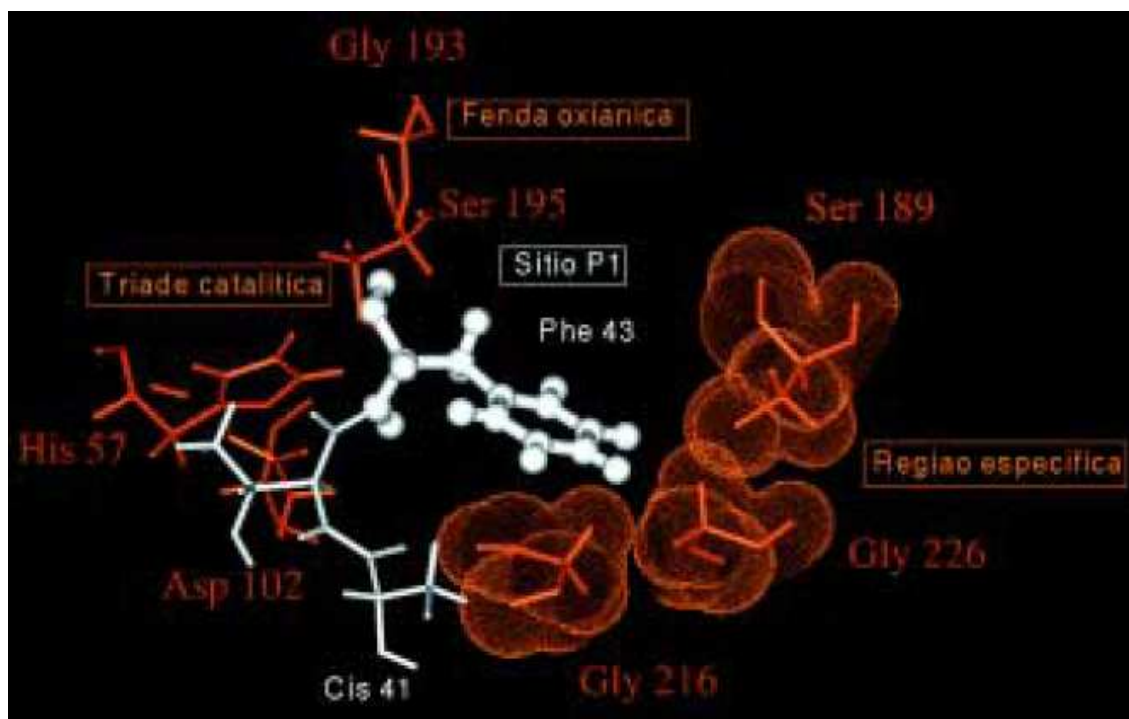


Figura 2. Modelo estrutural do complexo entre o inibidor PFSI e a enzima α -quimotripsina. (Adaptado de FRANCO *et al.*, 1999).

De acordo com o mecanismo padrão, inibidores são substratos, que exibem em pH neutro e uma alta relação k_{cat}/K_m para hidrólise e resíntese do sítio reativo e um baixo valor da constante de hidrólise. Os elementos envolvidos nas interações entre as cadeias do inibidor e das proteases são: pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (BIRK, 2003).

2.4 - Respostas dos insetos às defesas vegetais

Insetos-praga são capazes de desenvolver biotipos hábeis a se adaptar a novas situações, como por exemplo, sobrepujar o efeito de compostos tóxicos ou até mesmo

mecanismos de resistência vegetal, naturais ou artificiais (KRATTIGER, 1997). Assim, baseada nas diferentes pressões seletivas ao longo do processo evolutivo, as diferentes ordens de insetos apresentaram mecanismos distintos para debelar as defesas vegetais, muitos deles tendo a finalidade de torná-los insensíveis as proteínas tóxicas. As respostas apresentadas pelos insetos são específicas para cada classe de proteína e uma em especial tornou-se objeto de pesquisa de inúmeros grupos nas últimas décadas: a adaptação dos insetos a inibidores de protease.

Girard *et al.* (1998) estudaram o alto nível de resistência apresentado por uma importante praga da mostarda, o coleóptero *Phaedon cochleariae*, frente a IP. Eles observaram que em ensaios *in vitro*, OCI e BBI, inibidores de cisteíno e serinoprotease, respectivamente, eram potentes inibidores das enzimas larvais de *P. cochleariae*. No entanto, ensaios *in vivo* não apresentaram diferenças entre peso médio larval do grupo controle e o alimentado com os inibidores. Ensaios de digestibilidade *in vitro* mostraram que ambos os inibidores eram degradados rapidamente pelas proteases larvais, e associaram a degradação dos inibidores ao aumento da atividade de 2 enzimas não inibidas por eles, elastase e leucino aminopeptidase. Concluíram que a degradação proteolítica exercida em sinergismo pelas 2 enzimas foi responsável pela detoxificação e resistência da espécie aos inibidores estudados.

A fim de avaliar os mecanismos de adaptação apresentado por um lepidóptero responsável por danos em diferentes culturas, Bown *et al.* (2004) estudaram a expressão de genes que codificam as enzimas digestivas de *Helicoverpa armigera* em resposta a ingestão de IP. Segundo sua hipótese, a detoxificação é uma ferramenta eficiente apenas para pragas

especialistas. Já no caso de pragas generalistas, um segundo mecanismo deve ser responsável pela resistência, pois a necessidade de se proteger de compostos provenientes de diferentes espécies vegetais torna a detoxificação uma ferramenta menos eficiente. Nos ensaios *in vivo*, alimentaram larvas de 4º instar de *H. armigera* por até 72 h, realizando a extração de intestinos em diferentes intervalos de tempo a fim de quantificar a expressão de RNAm das diferentes enzimas larvais ao longo do período de estudo. Os resultados mostraram que em uma fase inicial de 12 h de experimento, todos os RNAm de diferentes isoformas de enzimas são superexpressos. A partir daí, os RNAm das isoformas sensíveis aos inibidores utilizados no estudo são menos expressos, e a partir de 24 h de contato com os inibidores no experimento, apenas as isoformas totalmente insensíveis aos inibidores são expressas, apresentando uma resposta adaptativa do tipo “feedback”, onde as isoformas sensíveis ao inibidor têm sua expressão diminuída.

O comportamento anteriormente descrito para *H. armigera* difere do observado por Brioschi *et al.* (2007) para uma outra espécie de praga que apresenta a mesma característica de polifagia, a lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda*. Quando desafiada a se desenvolver em dieta artificial na presença do inibidor de protease de soja (IPS), esta espécie apresenta uma resposta adaptativa bastante interessante. Análises de transcrição de RNAm mostraram a presença de dois grupos de serionoproteases: um grupo constitutivamente expresso em larvas que se alimentam em dieta controle que tem sua expressão induzida na presença do inibidor e um grupo ausente nas larvas alimentadas em dieta controle mas igualmente induzidas na presença do IPS. Constatou-se ainda a presença de um terceiro grupo de proteases que não apresentam alteração de expressão pela presença do inibidor de soja em dieta artificial. Estes resultados apontam permitem concluir que *S.*

frugiperda apresenta um mecanismo adaptativo distinto que envolve a síntese de novas proteases (síntese *de novo*), a indução de proteases pré-existentes além de um grupo insensível à presença do inibidor, mecanismo este chamado “shotgun”, por ser baseado na indução geral de um grande grupo de proteases.

O mecanismo pelo qual os insetos percebem a presença dos inibidores ainda permanece desconhecido, mas observa-se que estas respostas são compatíveis com a síntese de inibidores vegetais: a taxa máxima de síntese ocorre entre 4 e 8 h em tabaco (PEARCE *et al.*, 1993) e o acúmulo significativo se dá entre 12 e 24 h (JONGSMA *et al.*, 1995). Mecanismos similares de adaptação são estudados e reportados para outras espécies de pragas: larvas de *Leptinotarsa decemlineata*, conhecido como besouro da batata, compensam a presença do inibidor catepsina D em tomate transgênico diminuindo a expressão de proteases sensíveis (BRUNELLE *et al.*, 2004). Zhu-Salzman *et al.* (2003) demonstraram que *C. maculatus*, uma das espécies de gorglho de feijão, responde a inibidores de cisteínoproteases aumentando a produção de proteases aspárticas. *Perillus bioculatus* responde a inibidores de cisteínoproteases em batata transgênica expressando novas serinoproteases (BOUCHARD *et al.*, 2003). *Tribolium castaneum* compensa a presença de um determinado inibidor com a total inversão do perfil enzimático, ou seja, na presença de inibidores de serinoprotease as larvas sintetizavam cisteínoproteases e vice-versa. Entretanto, quando há presença de inibidores de serino e cisteínoprotease combinados na dieta, a resposta proteolítica compensatória em *T. castaneum* é prevenida (OPPERT *et al.*, 2005).

3 – Inibidores enzimáticos como ferramenta biotecnológica alternativa

A contínua necessidade de aumentar a produção de alimentos requer o desenvolvimento e a aplicação de ferramentas biotecnológicas inovadoras capazes de oferecer variedades de culturas melhoradas, oportuna e economicamente rentável (HAQ *et al.*, 2004). Um marco nesse campo foi à introdução de genes de proteínas entomotóxicas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) em plantas. A bactéria foi primeiramente descoberta no Japão em 1902 (BABU *et al.*, 2003) e as delta-endotoxinas, toxinas *Bt* ou ainda conhecidas como toxinas Cry, proteínas inseticidas produzidas durante a esporulação da bactéria, tem sido utilizadas como inseticida comercial por mais de duas décadas. Estas toxinas são especificamente tóxicas a lepidópteros (OLSEN & DALY, 2000) e promovem o rompimento das células do intestino médio do inseto: as toxinas são dissolvidas pelo suco alcalino no lúmen intestinal e convertidas pelas proteases em fragmentos tóxicos (BABU *et al.*, 2003). A partir daí, agrupam-se em oligômeros, criando poros na membrana intestinal, levando a morte do inseto pela descompartmentalização gerada.

As primeiras culturas transgênicas de milho, algodão e batata resistentes a insetos expressando genes *Bt* foram lançadas comercialmente nos Estados Unidos em 1995 (FAN *et al.*, 2005) e de acordo com Haq *et al.* (2004) já perfazem 98 % de todos os genes empregados no desenvolvimento de culturas transgênicas. No entanto, existem algumas limitações no uso de plantas *Bt* que devem ser consideradas. A persistência da toxina *Bt* ao longo de todo o período de crescimento da planta seleciona intensivamente a resistência de insetos (HAQ *et al.*, 2004; MOAR *et al.*, 1995; FAN *et al.*, 2005). A variedade de insetos

que podem ser controlados por estas toxinas é relativamente pequena (HAQ *et al.*, 2004). Além disso, outro ponto importante é que a atividade inseticida exercida pelas proteínas *Bt* tem um complexo modo de ação, já que muitas classes destas pró-toxinas devem ser proteoliticamente ativadas para exercerem seu papel inseticida. Uma série de trabalhos baseados em observações de laboratório, estufa e campo sobre a resistência de insetos a plantas expressando proteínas *Bt* têm sido reportados (TABASHNIK *et al.*, 2000, FERRÉ & VAN RIE, 2002; JANMAAT & MYERS, 2003), apesar do curto espaço de tempo transcorrido desde o início de sua comercialização. No mais recentemente deles, Tabashnik *et al.* (2008) observou que *Helicoverpa zea* desenvolveu resistência ao algodão *Bt* cultivado no Arkansas e Mississippi.

A resistência adquirida por parte dos insetos impulsiona pesquisas por novas ferramentas para o controle de pragas. Dentre elas, uma interessante linha estuda a transformação de plantas com genes de IP como uma ferramenta biotecnológica alternativa no combate de insetos-praga. Muitos pesquisadores defendem seu emprego por constituírem uma estratégia de defesa utilizada extensivamente pelas plantas (THOMAS *et al.*, 1995; BABU *et al.*, 2003). Outro ponto interessante, é que seu emprego em culturas transgênicas não deixaria resquícios de inseticidas nas plantas ou no solo e, além disso, não trariam efeitos sobre outros insetos que não se alimentem exclusivamente da planta, os principais pontos negativos do emprego dos inseticidas químicos convencionais.

Hoje, plantas podem ser transformadas com genes de IP com fortes promotores para expressá-los em níveis relativamente altos em intervalos de tempos específicos (DUAN *et al.*, 1996; COLFALONIERI *et al.*, 1998; MOCHIZUKI *et al.*, 1999). Os inibidores também

podem ocorrer apenas em tecidos particularmente vulneráveis ao ataque, como sementes, ou podem ser induzidos através de ferimentos no tecido atacado pela mastigação de insetos-praga, como folhas (DATTA *et al.*, 1998; MOCHIZUKI *et al.*, 1999; LARRY & RICHARD, 2002). Baseado nos diversos estudos publicados acerca do papel dos IP em cultivares transgênicos, verificou-se que inibidores de serinoprotease são efetivos contra lepidópteras (MC MANUS *et al.*, 1994; YEH *et al.*, 1997) enquanto inibidores de cisteinoprotease são efetivos contra coleópteras (LECARDONNEL *et al.*, 1999; LEPLÉ *et al.*, 1995).

A expressão de IP em plantas transgênicas foi primeiramente demonstrado por Hilder *et al.* (1987), através da expressão do gene do inibidor de tripsina (CpTI) do feijão *Vigna unguiculata* em tabaco, conferindo resistência a uma grande variedade de insetos-praga, incluindo Lepidópteras do gênero *Heliothis* e *Spodoptera*, Coleópteros do gênero *Diabrotica* e *Anthonomous* e Ortoptera do gênero *Locusts* (GATEHOUSE *et al.*, 1992). Após este estudo de sucesso, muitos outros IP de diversas fontes vegetais vêm sendo estudados e empregados na transformação de plantas. Na revisão de Fan & Wu (2005) são apresentados mais de 50 trabalhos de plantas transgênicas resistentes a insetos expressando genes de IP, com a característica de resistência sendo passada por várias gerações. Contudo, plantas transgênicas expressando IP ainda não são comercializadas.

Além de apresentar atividade inseticida, IP são efetivos contra nematoides, vírus, bactérias e fungos patogênicos, podendo exercer um efeito protetor cumulativo para as plantas. Além do mais, não existem evidências de que IP possuam efeitos tóxicos ou deletérios para mamíferos (HAQ *et al.*, 2004). Entretanto, genes de IP apresentam certas

limitações: uma das mais preocupantes é que diferentes espécies de insetos são afetadas diferencialmente quando alimentadas com o mesmo inibidor. Considerando a alta complexidade das interações entre protease/inibidor e a diversidade de enzimas proteolíticas utilizadas pelas diversas pragas no processo digestivo, a escolha de um IP e sua especificidade representa um ponto crucial no sucesso de qualquer estratégia de controle que dependa da inibição enzimática. Primeiramente, a escolha de um IP contra deve ser baseada em um profundo entendimento do sistema biológico de uma praga específica, baseado em testes *in vitro* e *in vivo*. Muitos inibidores têm sido utilizados em estudos aprofundados e muitos outros têm sido isolados e apresentado diferentes modos de ação contra espécies de pragas, no entanto, a resistência do inseto pode surgir após a exposição prolongada e pressões seletivas mediadas por uma proteína inseticida ou gene de resistência (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002). A menos que a estratégia biotecnológica seja desenhada e implementada para superar estes problemas, esta se tornará ineficaz com o passar do tempo como qualquer estratégia de gestão baseada no emprego de pesticidas. Assim como as plantas transformadas que expressaram apenas as proteínas *Bt* não obtiveram um completo sucesso, é presumível que o mesmo aconteça com os inibidores. A combinação de IP com outras proteínas inseticidas ou que provoquem algum tipo de estresse no inseto sugerem que esta técnica pode levar a níveis mais satisfatórios de controle (ZHAO *et al.*, 1998; CORNU *et al.*, 1996; FRANCO *et al.*, 1999; SHARMA *et al.*, 2000; BABU *et al.*, 2003).

4 - Nova geração de plantas geneticamente modificadas

Com o conhecimento adquirido acerca dos mecanismos de resistência apresentado pelas diferentes espécies de insetos-praga, a nova geração de plantas geneticamente modificadas emprega diferentes ferramentas de estudo biotecnológico: genes de proteínas *Bt* em conjunto aos genes de IP. Muitos inibidores de serinoprotease são capazes de potencializar a atividade inseticida de toxinas Cry em 3 diferentes ordens de insetos: Coleoptera, Lepidoptera e Diptera (HILDER *et al.*, 1987; MACINTOSH *et al.*, 1990; PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2009).

A presença de níveis extremamente baixos de IP aumenta a atividade inseticida de algumas proteínas Cry em até 20 vezes (PARDO-LÓPEZ *et al.*, 2009). Em seus estudos, MacIntosh *et al.* (1990) observou a potencialização do efeito de um inibidor de tripsina isolado de sementes de *Curcubita maxima* (CmTI) a uma concentração 10^5 vezes abaixo do seu nível inseticida. Plantas de tabaco expressando CmTI e a toxina Cry1Ab mostraram um aumento de 6 vezes na atividade inseticida contra a lagarta do tabaco, *Heliothis virescens*, quando comparadas com plantas expressando apenas a toxina Cry1Ab.

O mecanismo completo pelo qual o IP aumenta a atividade das proteínas Cry é desconhecido, embora eles possam inibir proteases intestinais específicas que normalmente inativariam as proteínas *Bt*, ou podem limitar a proteólise de proteínas de membrana, aumentando sua meia vida e a habilidade de ligar-se a proteínas *Bt*. O mecanismo mais aceito é mostrado na Figura 3. Inicialmente, há a solubilização da proteína Cry no lúmen do intestino médio (1) seguida da ativação da pró-toxina e sua translocação através da

membrana peritrófica (2). Em seguida, ocorre ligação da toxina a receptores primários e a clivagem da hélice α -1 (3). Por fim, a oligomerização da toxina e ligação a receptores ancorados a GPI é observada (4). A inserção da toxina na membrana acontece, levando a formação dos poros (5).

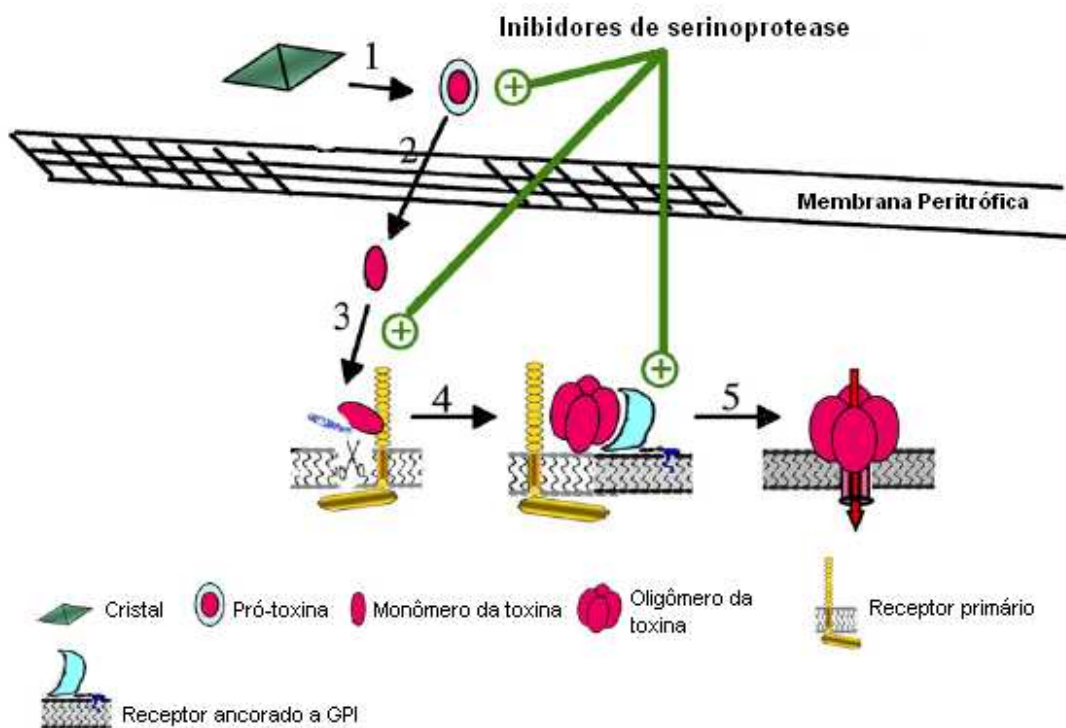


Figura 3. Modelo do modo de ação das proteínas Cry e a potencialização de seu efeito exercido por inibidores de protease (adaptado de PANDO-LÓPEZ *et al.*, 2010).

Além da utilização de proteínas *Bt* e inibidores enzimáticos, esta nova geração de plantas modificadas apresenta ferramentas inovadoras, como a fusão de proteínas tóxicas. Recentemente, o grupo de pesquisa liderado pelo pesquisador John A. Gatehouse publicou trabalhos onde descrevem a fusão de uma lectina vegetal, GNA, isolada dos bulbos de *Galanthus nivalis* com a toxina ButaIT, isolada do escorpião vermelho africano

Mesobuthus tamulus (TRUNG *et al.*, 2006). A partir do conhecimento de que GNA é transportada para a hemolinfa do inseto após sua ingestão, fusionaram as proteínas para que GNA funcionasse como um transportador da toxina ButaIT. A atividade biológica da proteína ButaIT/GNA foi testada. A proteína fusionada apresentou elevada mortalidade para a lagarta do tomate *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera) em ensaios de alimentação, onde a proteína foi adicionada em dieta artificial. Além do aumento da taxa de mortalidade, houve uma redução na taxa de crescimento e na taxa de alimentação. ButaIT/GNA foi detectada na hemolinfa das larvas alimentadas, mostrando que o transporte do intestino para a hemolinfa não foi alterado. Ensaios posteriores também apontaram um efeito altamente tóxico de ButaIT/GNA para uma das praga do arroz, *Nilaparvata lugens* (Homoptera) (TRUNG *et al.*, 2006).

Fitches *et al.* (2009) avaliaram o efeito de ButaIT/GNA e SFI1/GNA, toxina isolada do veneno da aranha *Segestria florentina* fusionada com GNA. Ambas as toxinas apresentaram toxicidade para insetos de diferentes ordens, como Lepidoptera, Diptera, Coleoptera e Dictyoptera. Os autores concluem que as toxinas fusionadas com GNA apresentam uma ampla atividade inseticida com enorme potencial para o combate às pragas agrícolas.

O sucesso desta e de qualquer estratégia que empregue proteínas de defesa no melhoramento de plantas depende da execução de uma série de etapas: (1) purificação e caracterização da proteína de interesse, (2) investigação acerca de sua atividade *in vitro* e *in vivo* contra patógenos, (3) determinação da sequência parcial ou total de aminoácidos da proteína, (4) clonagem de cDNAs e DNAs que codificam-na, (5) estudo da expressão

destes genes sob condições normais de desenvolvimento e sob condições de estresse, (6) estudo da expressão transgênica dos genes transferidos para verificar se estes estão produzindo as proteínas correspondentes nas plantas transformadas e (7) verificação do aumento da resistência nas plantas transgênicas em campo (GARCÍA-OLMEDO *et al.*, 1996; MELLO, 2003).

II – OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo isolar e caracterizar um novo inibidor de tripsina encontrado em sementes de *Entada acaciifolia*, bem como estudar seus aspectos estruturais e funcionais. Para tanto pretendeu-se:

- Purificar o inibidor de *E. acaciifolia*;
- Realizar sua caracterização físico-química, através de técnicas cromatográficas, eletroforéticas, por espectrometria de massas, composição de aminoácidos e sequenciamento N-terminal;
- Analisar sua atividade inibitória frente à tripsina bovina bem como estabelecer sua estequiometria de inibição e sua constante de inibição (K_i);
- Estudar sua estabilidade cinética submetendo-o a condições variadas de pH e temperatura, bem como a diferentes concentrações do agente redutor Ditionitrito (DTT);
- Predizer sua estrutura secundária nativa e possíveis modificações provenientes de sua interação com DTT e ureia através de ensaios de dicroísmo circular (DC);
- Avaliar sua atividade biológica, através de ensaios *in vitro*, frente a enzimas digestivas isoladas espécies de pragas agrícolas, a fim de investigar seu potencial como ferramenta inseticida.

III – MATERIAIS

1.1 - *Entada acaciifolia*

Sementes de *E. acaciifolia* foram coletadas entre os meses de maio e julho de 2009 na Unicamp. Exemplares de frutos, flores e galhos foram levados ao Laboratório de Taxonomia Vegetal, Departamento de Biologia Vegetal, IB, para que a espécie em questão tivesse sua identificação confirmada. Os frutos secos maduros foram colhidos, as sementes lavadas e secas a temperatura ambiente antes de serem acondicionadas em freezer a - 20°C.

1.2 - Insetos

Seis espécies de insetos pertencentes à ordem Lepidoptera, divididos entre as famílias Noctuidae: *Helicoverpa zea* (Bod., 1850), *Anticarsia gemmatalis* (Hueb., 1818), *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797), *Heliothis virescens* (Fabr., 1781) e *Agrotis ipsilon* (Hufnagel, 1766); e Crambidae: *Diatraea saccharalis* (Fabr., 1794). Os insetos foram cedidos pelo Prof. Dr. José Roberto Postali Parra, do Laboratório de Biologia de Insetos, Departamento de Entomologia, ESALq, Piracicaba-SP.



Figura 4. *Entada acaciifolia* (Benth.): (A) árvore, (B) frutos verdes, (C) frutos secos e caule e (D) frutos verdes e sementes. Barra = 1 cm. Fotos de Oliveira, C.F.R.

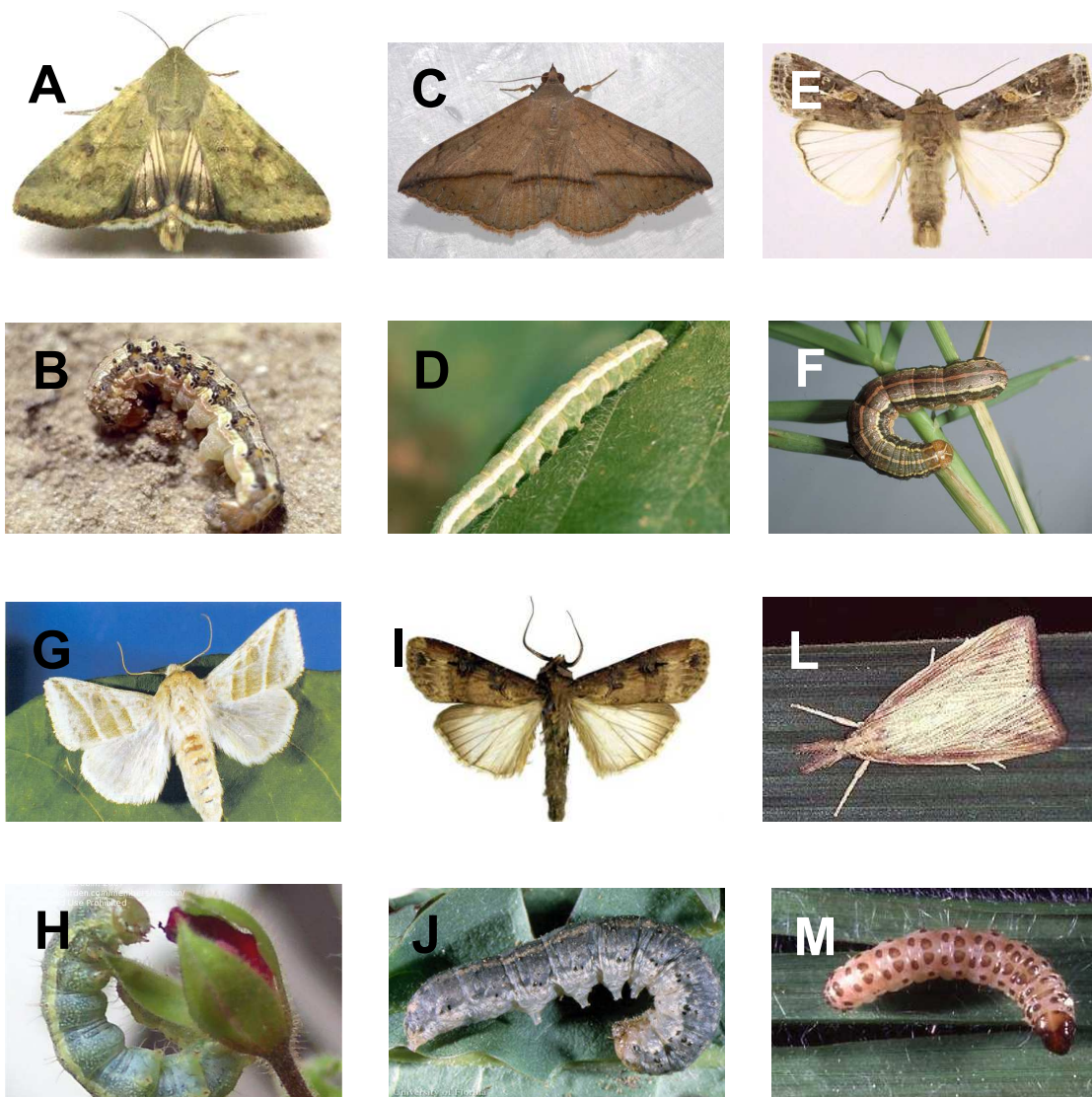


Figura 5. Insetos-praga utilizados no estudo: (A) adulto de *Helicoverpa zea*, (B) larva de *H. zea*, (C) adulto de *Anticarsia gemmatilis*, (D) larva de *A. gemmatilis*, (E) adulto de *Spodoptera frugiperda*, (F) larva de *S. frugiperda*, (G) adulto de *Heliothis virescens*, (H) larva de *H. virescens*, (I) adulto de *Agrotis ipsilon*, (J) larva de *A. ipsilon*, (L) adulto de *Diatraea saccharalis* e (M) larva de *D. saccharalis*. Fotos de Alabama Cooperative Extension System (<http://www.aces.edu/~azm0024/extension/index.php>).

1.3 – Enzimas

Tripsina e quimotripsina bovina foram adquiridas da Sigma Chemical Company.

1.4 – Substratos

Os substratos sintéticos BAPNA e BTPNA, com atividade específica para tripsina e quimotripsina, respectivamente, foram adquiridos da Sigma Chemical Company.

1.5 – Resinas

As resinas de exclusão molecular Sephadex G-75, troca iônica DEAE-Sepharose, afinidade Sepharose-tripsina foram adquiridas da GE (Uppsala, Suíça). A coluna analítica μ -bondpack C-18 foi adquirida da Waters.

IV – MÉTODOS

1 - Isolamento e purificação do inibidor de *E. acaciifolia*

1.1 - Obtenção da farinha de sementes de *E. acaciifolia*

As sementes foram mergulhadas em nitrogênio líquido e em seguida trituradas em moinho elétrico a 27.000 rpm. Neste momento, realizou-se a separação da polpa e o descarte da casca. A farinha de fina granulação obtida foi submetida ao processo de delipidação com hexano. Ao final da delipidação, a farinha foi depositada em uma bandeja plástica revestida por papel filtro para que houvesse a completa volatilização do solvente.

1.2 - Obtenção do Extrato Bruto

A farinha delipidada foi submetida a uma extração proteica com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6, na proporção de 1:10 (p/v), sob agitação constante overnight em temperatura de 4 °C. Seguindo esta etapa, o material foi centrifugado a 5.000 rpm a 4 °C durante 30 minutos, obtendo assim duas frações: precipitado, o qual foi descartado e uma fração sobrenadante, a qual teve o volume medido, dialisado por 24 horas contra água destilada a 4 °C, liofilizado e denominado Extrato Bruto (EB), utilizado nas etapas posteriores de purificação do inibidor.

1.3 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75

Uma quantidade de EB (150 mg) foi dissolvida em 3ml de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6, com 0,1 M de NaCl. O material foi sonificado por 5 minutos, clarificado por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos e aplicada em coluna Sephadex G-75 (3 x 80cm) equilibrada previamente com o mesmo tampão. Foram coletadas frações de 3ml por tubo, num fluxo de 12 ml/h. A detecção das proteínas foi feita em espectrofotômetro a 280 nm.

1.4 - Cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose

A fração que apresentou atividade anti-trípica na coluna Sephadex G-75, foi dialisada, liofilizada e aplicada em uma coluna de troca iônica DEAE-Sepharose Fast Flow (3 x 12cm) equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0. Um gradiente salino de NaCl de 0-1 M foi utilizado para a eluir as proteínas adsorvidas, sendo coletadas frações de 3 ml num fluxo de 40 ml/h. A detecção das proteínas foi feita a 280 nm.

1.5 - Cromatografia de afinidade Sepharose-tripsina

O primeiro pico eluído pelo gradiente salino (D-II), foi dialisado, liofilizado e aplicado em coluna de afinidade Sepharose-tripsina (3 x 12cm). A coluna foi equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6, com 0,1 M de NaCl. A eluição do material retido na coluna foi feita com HCl 0,1 M num fluxo de 30ml/h, onde frações de 2 ml foram

coletadas. A detecção das proteínas foi feita a 280 nm. O pico eluído com HCl (S-II) foi concentrado, dialisado contra água destilada a 4 °C por 24 horas, liofilizado e nomeado EATI.

1.6 - Cromatografia em coluna C-18

A fim de analisar a pureza do material proveniente da cromatografia em coluna Sepharose-tripsina, o EATI foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência em coluna C-18. O sistema cromatográfico empregado é o HPLC - PDA 991 (Waters), equipado com duas bombas Waters modelo 510/B e um injetor automático de amostras U6K com um loop de 200 µL. A coluna utilizada é a µ-Bondapak C-18 (3,9 x 300 mm), previamente equilibrada com ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%, (v/v) (tampão A) pH 3,5. Brevemente, 5mg de EATI são dissolvidos em 200 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 e sonicado por 5 minutos. A solução obtida é centrifugada a 5.000 rpm durante 3 minutos para clarificação e o sobrenadante aplicado na coluna. As proteínas são eluídas utilizando-se um gradiente descontínuo de tampão B (acetonitrila 66,5 %, TFA 0,1 %): 10 minutos com 0 % de tampão B, 6 minutos a 30 % de tampão B, 6 minutos a 40 % de tampão B, 6 minutos a 50 % de tampão e 10 minutos a 100 % de tampão B. O fluxo é mantido constante a 1 ml/min e monitorado a 280 nm. As frações obtidas foram imediatamente submetidas ao ensaio de atividade inibitória. O restante do material coletado foi imediatamente liofilizado e armazenado a -20 °C para a utilização posterior.

2 - Quantificação de proteínas

Todas as frações obtidas no processo de purificação tiveram seu conteúdo proteico quantificado pela técnica desenvolvida por Bradford (1976), utilizando como proteína padrão para as quantificações albumina sérica bovina a 1 mg/ml.

3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (PAGE-SDS) é realizada seguindo-se a metodologia descrita por Laemmli (1970). As placas de poliacrilamida são feitas de modo descontínuo: apresentam um gel de concentração de 5 % e um gel de corrida de 12,5 %. As placas são preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque. O gel de concentração 5 % é preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e o gel de corrida é feito com tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. Em ambos os géis são acrescentados 0,1 % (v/v) de SDS 20 %. A PAGE-SDS é realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de massa molecular são dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075 M, pH 6,8; 10 % de glicerol; 4 % de SDS; 0,001 % de azul de bromofenol). As proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular foram: fosforilase (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e α -lactoalbumina (14 kDa). A corrida eletroforética foi realizada com corrente constante (30 mA) e voltagem livre. Os géis são corados com solução de Coomassie Blue 0,05 % a 37 °C overnight e o excesso de corante removido em ácido acético 7%.

4 - Determinação da massa acurada por espectrometria MALDI-TOF

A massa molecular acurada de EATI-1 obtido na cromatografia em coluna C-18 do inibidor de tripsina de *E. acaciifolia* foi analisado por Espectrometria de Massa utilizando um Voyager DE PRO MALDI TOF mass spectrometry (Applied Biosystems. Foster City. USA). Uma alíquota de 1 µL de amostra foi dissolvida em TFA 0,1 % e misturada a 2 µL da matriz. A matriz foi preparada com ácido α-ciano-4-hidroxy-cinnamico (Sigma), acetonitrila 60 % (v/v) e TFA 0,1 % (v/v). A massa foi analisada sob as seguintes condições: aceleração de voltagem a 25 kV, laser ajustado a 2890 mJ/cm² em 300 ns com modo de análise linear.

5 - Análise da composição de aminoácidos

Para a determinação da composição global de aminoácidos de EATI-1 o sistema utilizado foi o analisador Pico-Tag (Waters). O cromóforo resultante, fenilcarbamil do aminoácido (PITC), proveniente da derivatização com feniltiocianato dos aminoácidos obtidos através de hidrólise ácida em HCl 6 M por 24 h a 106 °C, pode ser detectado em concentrações de 1 µmol (HEINRIKSON & MEREDITH, 1984).

A análise após a hidrólise foi realizada em sistema HPLC acoplado a coluna C-18 µ-Bondpack (3,9 mm x 15 cm) com a utilização de um gradiente linear de 0 a 100 % de tampão B (66 % de acetonitrila) por 21 min. A identificação de cada aminoácido foi feita com base em um padrão de aminoácidos PITC (BIDLINGMEVER *et al.*, 1984). Para a

estimativa da composição global de aminoácidos foi levada em consideração a porcentagem de área de cada um dos picos identificados durante a corrida.

6 - Determinação da sequência N-terminal

O método de degradação automático desenvolvido por Edman (1950) foi utilizado para determinar a sequência da porção N-terminal do inibidor EATI-1. A degradação Edman é um procedimento cíclico, onde os aminoácidos constituintes de uma proteína ou peptídeo são clivados um a um (um por ciclo) a partir da extremidade N-terminal, sendo identificados como derivados de feniltioidantoínas. Cada ciclo é composto de 3 etapas: acoplamento de fenilisotiocianato (PITC) ao resíduo N-terminal, clivagem do resíduo N-terminal por ciclização em meio ácido, conversão do derivativo tiazolinona (ATZ) formado, para um derivado mais estável, a tioidantoína (PTH), que pode ser identificado por cromatografia. A amostra foi submetida à sequenciamento automático em sequenciador de proteínas de fase gasosa Shimadzu PPSQ-10. Os aminoácidos processados foram identificados a 269 nm depois da separação em coluna C-18 (4,6 mm x 2,5 mm) sobre condições isocráticas.

7 – Estudo de homologia similaridade sequencial

A partir dos resultados da composição de aminoácidos obtida um estudo de homologia foi realizado com auxílio do servidor ExPASy (WILKINS *et al.* 1998), onde é

possível efetuar buscas a partir da composição de aminoácidos de uma proteína por proteínas homólogas. A porcentagem de identidade N-terminal com inibidores de tripsina foi pesquisada utilizando o sistema NCBI-BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990). O alinhamento múltiplo das sequências N-terminal dos inibidores com as maiores similaridades encontradas foi realizado utilizando o programa CLUSTAL W 2.0.12 (HIGGINS *et al.*, 1996).

8 - Caracterização do Inibidor de *E. acaciifolia*

8.1 - Atividade inibitória frente à tripsina bovina

A atividade inibitória para a tripsina bovina foi determinada pela medida da atividade hidrolítica residual da mesma para o substrato N-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (BAPNA) seguindo a metodologia desenvolvida por Erlanger *et al.* (1961).

Um volume variável de tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 era adicionado em cada poço, seguido de 4 µl de tripsina (0,125 mg/ml) e diferentes concentrações do inibidor. Após 10 minutos de incubação a 37°C, 200 µl de BAPNA a 1 mM foi adicionado, completando um volume final de 270 µl/poço. O tempo total do ensaio foi de 30 minutos. A mudança na absorbância a 410 nm subtraída a leitura da solução do branco foi detectado no leitor de microplacas VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices).

8.2 - Atividade inibitória frente à quimiotripsina bovina

Um ensaio similar foi preparado para determinar a atividade inibitória para quimiotripsina. Para isso, foi empregado o substrato BTPNA. Um volume variável de tampão Tris-HCl 0,05M, pH 8,0 era adicionado em cada poço, seguido de 10 µl de quimiotripsina a 1 mg/ml, seguida de diferentes concentrações do inibidor. Após 10 minutos de incubação a 37°C, 200 µl de BTPNA a 5 mM foi adicionado, completando um volume final de 270 µl/poço. O tempo total do ensaio foi de 30 minutos. A mudança na absorbância a 410 nm subtraída a leitura da solução do branco foi detectado no leitor de microplacas.

8.3 - Estequiometria de inibição

Com o intuito de determinar a curva de inibição da tripsina, concentrações crescentes do inibidor (0; 1,31; 2,62; 3,93; 5,25; 6,56 e 10,5 mM) foram incubadas por 10 minutos a 37 °C com tripsina já titulada numa concentração de 5,5 mM. Decorrido o tempo descrito, adicionou-se 200 µl de BAPNA (1mM) e a reação ocorreu durante 30 minutos. A hidrólise do substrato foi acompanhada a 410 nm no leitor de microplacas, a fim de determinar a atividade residual da tripsina no ensaio.

8.4 - Determinação da constante de inibição

A análise cinética da atividade de EATI foi realizada utilizando o Dixon Plot (DIXON, 1953, SEGEL, 1975). Duas diferentes concentrações de BAPNA (1 e 3 mM) foram utilizadas com uma variação na concentração do inibidor (0; 0,5; 1,5 e 2,5 nM). O inverso da velocidade ($1/v$) versus a concentração do inibidor $[I]$ para cada concentração de substrato, $[S_1]$ e $[S_2]$ foram plotados. A linha de regressão para cada $[S]$ foi obtida e a constante de inibição (K_i) calculada a partir da intersecção das duas linhas.

9 - Estudos de estabilidade de EATI

9.1 - Estabilidade térmica

O inibidor EATI foi submetido a uma variação de temperatura (37 ° a 100 °C) com o objetivo de avaliar o efeito desta na atividade inibitória. Após a incubação por 30 minutos em cada temperatura, as alíquotas ensaiadas foram resfriadas em banho de gelo e a sua eficiência inibitória verificada através da determinação da atividade residual do inibidor. Foram realizadas 6 replicatas para cada valor de temperatura, sendo os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

9.2 - Estabilidade a variação de pH

Para determinar a estabilidade a variações de pH, o EATI foi diluído no mesmo volume de diferentes tampões de mesma concentração molar (100 mM): citrato de sódio (pH 2-4), acetato de sódio (pH 5), fosfato de sódio (pH 6 e 7), Tris-HCl (pH 8) e bicarbonato de sódio (pH 9 e 10). Depois da incubação por 60 minutos a 37 °C, a atividade inibitória foi medida como anteriormente descrita. Para cada valor de pH 6 replicatas foram preparadas, sendo os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

9.3 - Estabilidade ao Ditioneitol (DTT)

EATI foi incubado com o agente redutor DTT em diferentes concentrações finais: 1, 10 e 100 mM. A reação foi interrompida pela adição de Iodoacetamida, duas vezes a concentração final de DTT. Durante a incubação a 37 °C, alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo de 15, 30, 60 e 120 minutos para cada concentração avaliada. Um tratamento controle sem a adição de DTT também foi preparado. Ao final do procedimento, as alíquotas foram submetidas aos ensaios de atividade inibitória. Os resultados foram expressos como a média de 6 replicatas $\pm$ desvio padrão.

A fim de avaliar a estabilidade térmica e de pH do inibidor reduzido, EATI foi incubado com 100 mM de DTT por 120 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de Iodoacetamida como anteriormente descrito e o inibidor foi imediatamente submetido aos ensaios de estabilidade térmica e de pH. Todos os experimentos foram realizados em 6 replicatas e os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão.

10 - Dicroísmo circular de EATI

Dicroísmo circular (DC) é uma técnica espectroscópica que faz uso da absorção diferenciada da luz polarizada no sentido horário ou anti-horário. Este fenômeno é rotineiramente utilizado no estudo da estrutura secundária de proteínas. As medidas de DC foram realizadas no Instituto de Química, Unicamp, em um espectropolarímetro JASCO J-720. O espectro de DC de 190-250 nm foi obtido em cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 mm com EATI a 0,1 mg/ml. Medidas de DC foram realizadas com EATI nativo, dissolvido em tampão fosfato 10 mM, pH 8,0, EATI incubado com 8 M de uréia ou EATI incubado com 1 mM de DTT por 2 horas. O espectro obtido foi resultado de 32 acumulações descontado de seus respectivos brancos. Os dados de DC foram expressos como elipticidade molar residual. A predição do conteúdo de estrutura secundária a partir dos espectros de DC obtidos foram efetuadas através do servidor DichroWeb (WHITMORE & WALLACE, 2004). O DichroWeb incorpora algoritmos que calculam a partir da deconvolução de dados fornecidos pelo usuário o conteúdo de estrutura secundária presente na proteína de estudo, realizando comparações gráficas entre diversas estruturas de proteínas depositadas em bancos de dados. Diferentes bancos de proteínas estão disponíveis e baseado na amplitude dos espectros coletados é possível selecionar um dos 7 bancos de dados disponíveis. Neste estudo utilizamos o banco de dados número 4, que disponibiliza informações dos espectros entre 190-240 nm. Dentre os algoritmos disponíveis no servidor, SELCON3 (SREEREMA & WOODY, 1993), CONTIN (PROVENCHER & GLOCKNER, 1981) e CDSSTR (COMPTON & JOHNSON, 1986) foram utilizados.

A fim de comparar a estrutura secundária obtida através da deconvolução espectral de EATI com a estrutura secundária de um inibidor conhecido, a predição da estrutura secundária do inibidor de tripsina de *Acacia confusa* foi obtida, a partir de sua sequência primária de aminoácidos depositada no banco de dados NCBI-BLAST, utilizando o servidor PSIPRED.

11 - Estudo da atividade biológica de EATI frente às proteases de diferentes insetos-praga

A atividade inibitória de EATI foi testada contra as proteases intestinais de 6 espécies de insetos-praga: *A. ipsilon*, *D. saccharalis*, *A. gemmatilis*, *H. virescens*, *S. frugiperda* e *H. zea*. As larvas foram criadas em dieta artificial e permaneceram na mesma até o momento da extração das proteases, realizado de acordo com a metodologia desenvolvida por Macedo *et al.* (2003) com pequenas modificações. Larvas de 4º instar foram imobilizadas em nitrogênio líquido e tiveram seus intestinos removidos a frio com o auxílio de pinças. Os intestinos foram congelados em nitrogênio líquido e macerados em pistilo resfriado. O homogenato obtido foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e acondicionado em um volume conhecido de tampão fosfato de sódio 0,1 M, aliquotado, quantificado através da metodologia desenvolvida por Bradford (1976) e utilizado imediatamente como nos ensaios de atividade enzimática ou então armazenados a -20 °C. O substrato BAPNA (1mM) foi utilizado e a quantidade de material necessária para cada espécie determinada anteriormente pela realização de ensaios de atividade triptica.

Diferentes concentrações de EATI (0-1 µg) foram utilizadas junto a concentrações fixas de extratos intestinais. Após o período de incubação de 10 minutos, 200 µl de substrato foram adicionados, completando o volume final de 270 µl, e o ensaio decorreu durante 30 minutos. O ensaio foi acompanhado a 410 nm e a porcentagem de inibição contra cada extrato intestinal foi calculada após a subtração de seus respectivos brancos, levando em consideração que a atividade enzimática máxima foi obtida na ausência do inibidor. Para cada concentração de inibidor 6 replicatas foram preparadas e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão.

V – RESULTADOS

1 - Purificação de EATI

1.1 - Cromatografia em coluna Sephadex G-75

O cromatograma obtido a partir da aplicação do EB de *E. acaciifolia* na coluna de exclusão molecular Sephadex G-75 apresentou 3 picos bem definidos (Figura 6), que após ensaios antitripticos foi verificado que apenas o segundo pico, denominado G-II, apresentou esta atividade.

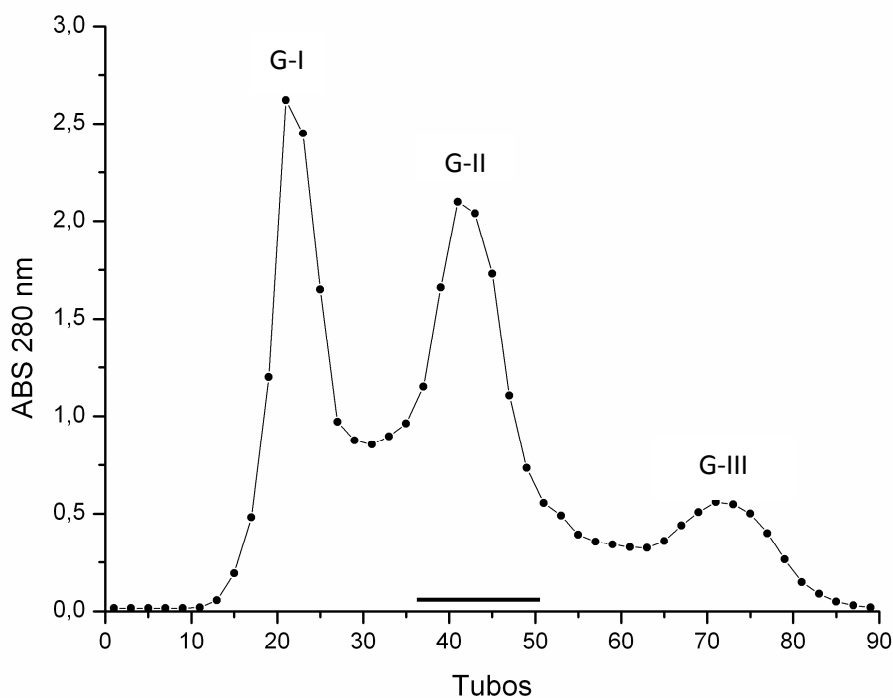


Figura 6. Perfil cromatográfico do EB aplicado em coluna Sephadex G-75 (3 x 80 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1 M com 0,1 M de NaCl, pH 7,6. Frações de 4

ml foram coletadas num fluxo de 12 ml/h. A detecção das proteínas foi acompanhada a 280 nm. A fração que apresentou atividade inibitória está evidenciada por uma barra.

1.2 - Cromatografia em coluna DEAE-Sepharose

Após a diálise e liofilização, a fração G-II foi submetida à cromatografia de troca iônica DEAE-Sepharose (3 x 12 cm). A Figura 7 mostra a presença de um primeiro pico (D-I) eluído antes do gradiente salino. Observamos a presença de dois picos, D-II e D-III, eluídos em torno de 0,4 M e 0,5 M de NaCl, respectivamente. Entretanto, apenas o pico D-II apresentou atividade inibitória, sendo então dialisado, liofilizado e utilizado na etapa seguinte de purificação.

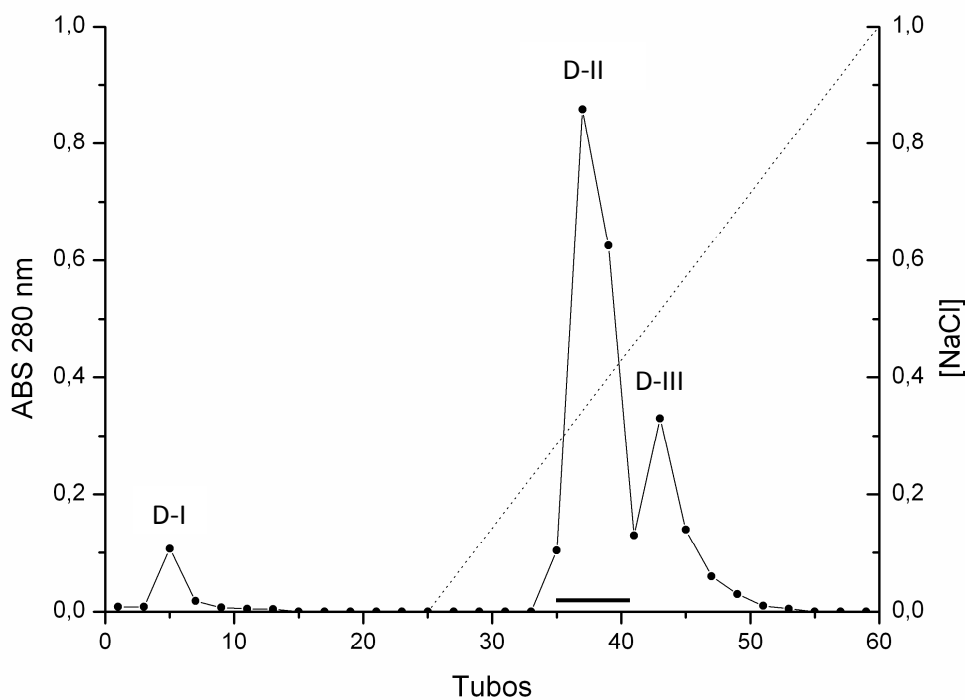


Figura 7. Perfil cromatográfico da fração G-II aplicado em coluna DEAE-Sepharose Fast Flow (3 x 12 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0. Frações de 4 ml foram

coletadas num fluxo de 40 ml/h. Gradiente salino de NaCl (0-1 M). A detecção das proteínas foi acompanhada a 280 nm. A fração que apresentou atividade inibitória está evidenciada por uma barra.

1.3 - Cromatografia em coluna Sepharose-tripsina

Quando a fração D-II foi submetida à cromatografia de afinidade em uma coluna Sepharose-tripsina, dois picos de proteínas foram observados no seu perfil cromatográfico, um anterior e outro posterior a eluição da coluna com HCl 0,1 M. Apenas o pico S-II apresentou atividade inibitória, sendo então dialisado, liofilizado e denominado EATI.

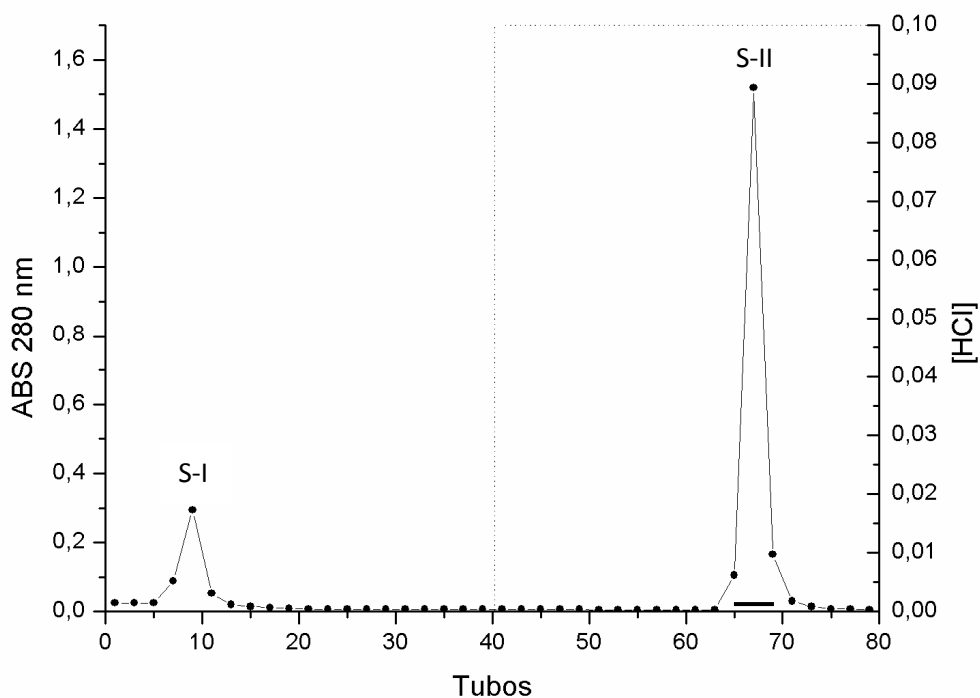


Figura 8. Perfil cromatográfico da fração D-II aplicado em coluna Sepharose tripsina (3 x 12 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1 M com 0,1 M de NaCl, pH 7,6. Frações de 2 ml foram coletadas num fluxo de 30 ml/h. A eluição da proteína ligada a resina foi realizada com HCl 0,1 M. A detecção das proteínas foi acompanhada a 280 nm. O pico que apresentou atividade inibitória está evidenciado por uma barra.

1.4 - Cromatografia em coluna C-18

O inibidor EATI foi submetido à cromatografia em coluna C-18 (3,9 x 300 mm). O perfil cromatográfico revela a presença de 4 picos eluídos em diferentes concentrações de tampão B (Figura 9). Estes picos foram coletados e submetidos a um ensaio de atividade inibitória. Com base nos resultados do ensaio, os 4 picos apresentaram uma moderada atividade anti-tríptica, sugerindo a presença de isoformas de EATI. Convencionou-se denominá-las EATI-1, EATI-2, EATI-3 e EATI-4.

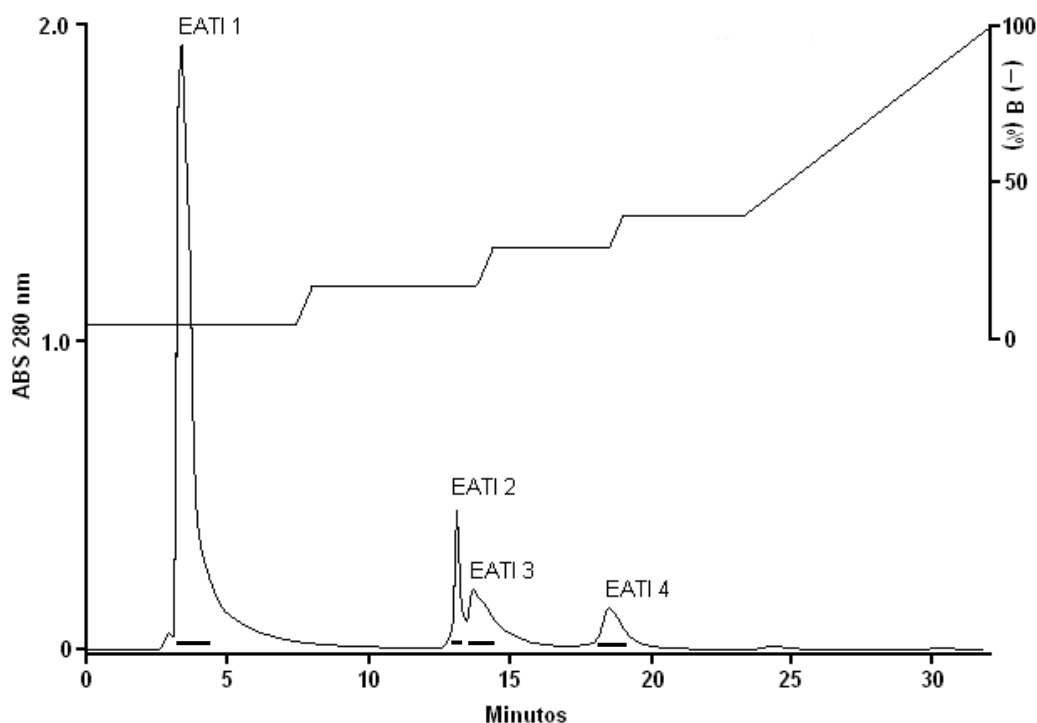


Figura 9. Perfil cromatográfico EATI aplicado em coluna C-18 (3,9 x 300 mm) equilibrada com tampão TFA 0,1 %. Frações foram coletadas num fluxo de 1 ml/min. A detecção das proteínas foi acompanhada a 280 nm.

1.5 - Tabela de purificação do inibidor

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos nas etapas de purificação do inibidor.

Tabela 1. Purificação do inibidor de *Entada acaciifolia*

Etapas	Proteína total (mg)	Atividade Inibitória Total (UI) x 10⁶	Atividade específica (UI/mg) x 10³	Rendimento (%)	Purificação (vezes)
EB	4.340	30,16	6,9	100	1
G-75	2.297	21,5	9,3	71,3	1,34
DEAE-Sephrose	2.068	20,99	10,14	69,59	1,46
Sephrose-tripsina	702	12,28	17,5	40,71	2,53

2 - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

A constituição proteica das frações obtidas em todas as etapas de purificação de EATI é apresentada na Figura 10. Observa-se que EATI é uma proteína constituída por uma única cadeia polipeptídica de massa molecular aparente de 20 kDa mesmo em condições redutoras, na presença de 0,1 M de DTT.

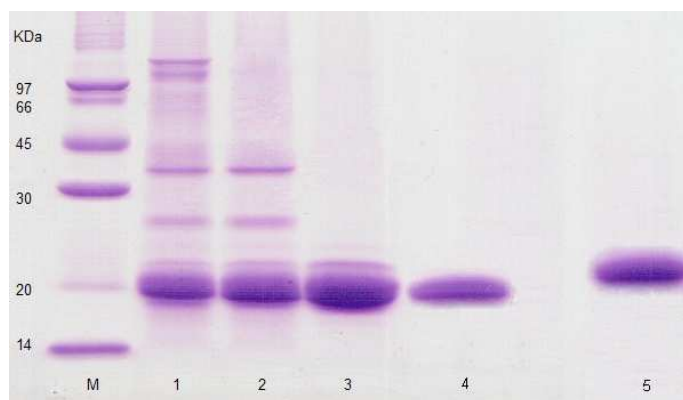


Figura 10. SDS-PAGE 12,5 % das frações oriundas das etapas de purificação. (M) Marcadores de peso molecular, (1) EB, (2) G-II, (3), D-II, (4) S-II, (5) S-II com 0,1 M de DTT.

3 - Determinação da massa acurada por espectrometria MALDI-TOF

Uma análise complementar realizada por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF revelou a massa exata de EATI-1, isoforma majoritária obtida na cromatografia em coluna C-18, de 19.725,127 Daltons.

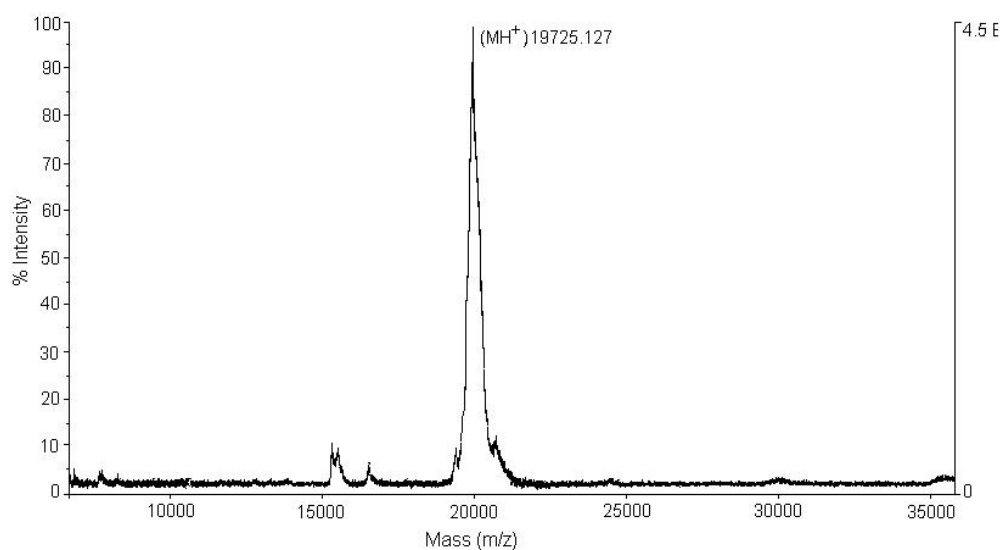


Figura 11. Perfil do espectro de EATI-1 por espectrometria de massas MALDI-TOF.

4 - Análise da composição de aminoácidos

A composição global de aminoácidos de EATI-1 mostrou que este apresenta um alto conteúdo de resíduos leucina, prolina e glicina (Tabela 2). Com base na composição de aminoácidos obtida, uma busca foi feita através do servidor ExPASy, baseada na porcentagem de área de cada pico de aminoácido. Os resultados mostram que EATI possui homologia com inibidores de serinoprotease da família Kunitz (Tabela 3).

Tabela 2. Composição de aminoácidos (% de área) de EATI. ASX= Aspartato e Asparagina, GLX= Glutamato e Glutamina, CYS= determinado como ácido cistéico.

	Aminoácido	% de área
1	ASX	7,75
2	GLX	8,68
3	SER	7,76
4	GLY	8,70
5	HIS	1,44
6	ARG	7,18
7	THR	2,81
8	ALA	5,50
9	PRO	8,06
10	TYR	5,20
11	VAL	7,17
12	MET	1,72
13	CYS	1,36
14	ILE	4,05
15	LEU	11,71
16	PHE	3,65
17	LYS	7,26
	Total	100

Tabela 3. Estudo de similaridade baseado na composição global de aminoácidos realizadas pelo programa ExPASy. São mostrados os 10 inibidores que apresentam maior similaridade a EATI, o peso molecular e o tipo de enzimas que inibem.

Score	Inibidor	Peso (Da)	Descrição
37	IT1B PSOTE	19217	Inibidor de tripsina de <i>P. teragonolobus</i>
45	IT2 PSOTE	20394	Inibidor de tripsina de <i>P. teragonolobus</i>
45	IT1A PSOTE	19261	Inibidor de tripsina de <i>P. teragonolobus</i>
48	IECI ERYVA	19851	Inibidor de tripsina de <i>E. variegata</i>
52	ICW3 PSOTE	20242	Inibidor de quimiotripsina de <i>P. teragonolobus</i>
60	BBKI BAUBA	17972	Inibidor de tripsina de <i>B. bauhinoides</i>
64	KTI2 SOYBN	20075	Inibidor de tripsina de soja (<i>G. max</i>)
64	ITRY ACACO	15122	Inibidor de tripsina de <i>A. confusa</i>
65	ILLA LEUGL	15463	Inibidor de tripsina de <i>L. glauca</i>
67	IDE3 ERYVA	19240	Inibidor de tripsina de <i>E. variegata</i>

5 - Determinação da sequência N-terminal

A Tabela 4 ilustra o alinhamento da sequência N-terminal de EATI-1. A pesquisa realizada no banco de dados do NCBI-BLAST revelou homologia entre EATI e diversos inibidores da família Kunitz.

Tabela 4. Alinhamento da sequência N-terminal de inibidores Kunitz com alta identidade à EATI. Inibidores de *Acacia confusa* (ACTI-A), *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI), *Prosopis juliflora* (PjTI), *Adenanthera pavonina* (ApTI-DE5), *Leucaena leucocephala* (LITI), *Bauhinia variegata* (BvTI) e *Glicine max* (KTI). Resíduos são idênticos são mostrados em cinza escuro, resíduos altamente conservados são mostrados em cinza. O alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o programa CLUSTAL W 2.0.12.

		Identidade (%)	Referência
EATI	NEIKDMEGDILEN-GGLYYIVPAGRGKGGGLTK		
ACTI-A	KEILDADGDILRN-GGAYYIIPALRGKGGGLT-	74	Wu & Li, 1993
EcTI	KEILDSGDILRN-GGTYYIIPALRGKGGGL--	73	Batista <i>et al.</i> , 1996
PjTI	-ELLDVDGEILRN-GGSYYIIPAFRGKGGGL--	72	Negreiros <i>et al.</i> , 1991
ApTI-DE5	-ELLDVDGNFLRN-GGSYYIVPAFRGKGGGL--	72	Richardson <i>et al.</i> , 1986
LITI	--IVDLGDPLYN-GMSYYIIPVARGKGGGL--	64	Oliva <i>et al.</i> , 2000
BvTI	DTLLDTDGEVVRNNGGPYYIIPAFRGNGGGGLT-	56	Oliva <i>et al.</i> , 2003
KTI	----DTEGNPIRN-GGTYYVLPVIRGKGGGI--	56	Gotor <i>et al.</i> , 1995

6 - Caracterização do Inibidor de *E. acaciifolia*

O perfil de titulação observado para a tripsina bovina manteve-se linear até 65 % de inibição (Figura 12) e a partir da extrapolação da curva obtida experimentalmente podemos observar a formação de um complexo estequiométrico de razão 1:1 entre EATI/tripsina. A constante de inibição (K_i) de EATI contra a tripsina bovina foi determinada, sendo $1,75 \times 10^{-9}$ M (Figura 13).

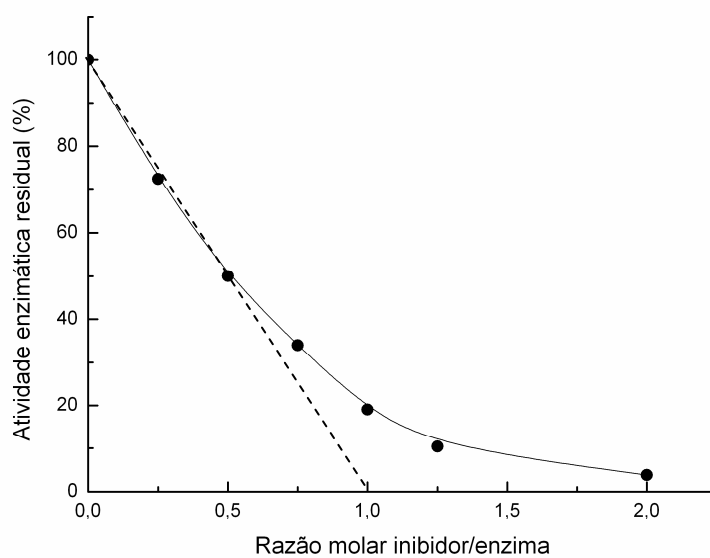


Figura 12. Curva de inibição da tripsina bovina por EATI. Tripsina foi pré-incubada (10 min, 37 °C, Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0) com concentrações crescentes de inibidor. A atividade residual da tripsina foi determinada com BAPNA 1 mM.

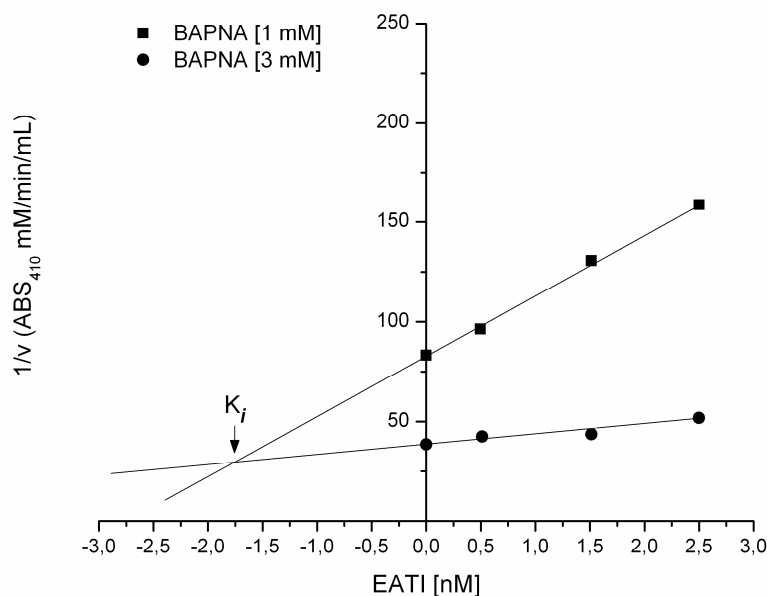


Figura 13. Análise cinética da atividade inibitória de EATI. Plot DIXON para a determinação da constante de inibição (K_i) frente a 2 diferentes concentrações de BAPNA. As concentrações finais de substrato foram de 1 mM (■) e 3 mM (●). O inverso da velocidade foi plotado contra diferentes concentrações de inibidor. O K_i é obtido a partir do ponto de intersecção entre as duas retas.

7 - Estudos de estabilidade de EATI

7.1 - Estabilidade ao Ditionitreitol (DTT)

A redução do inibidor EATI com diferentes concentrações de DTT em diferentes intervalos de tempo não alterou sua estabilidade a 37 °C em pH 8.0. No com 100 mM de DTT por 2h, EATI apresentou uma redução em sua atividade de 3 % (Figura 14). Em virtude destes resultados, estudamos sua estabilidade térmica e de pH em sua forma reduzida, com o objetivo de entender um pouco melhor o papel das pontes dissulfeto neste inibidor.

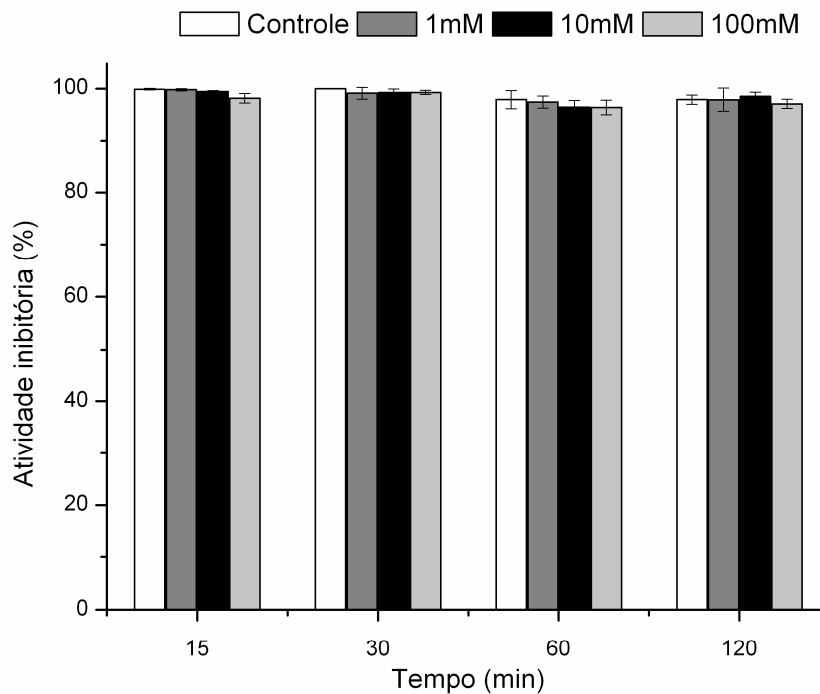


Figura 14. Efeito do DTT sobre a estabilidade de EATI. Diferentes concentrações de DTT foram incubadas com EATI em diferentes intervalos de tempo.

7.2 - Estabilidade térmica

EATI mostrou ser um inibidor com uma considerável estabilidade térmica, mantendo sua máxima atividade inibitória até 70 °C. Entretanto, a partir daí, observamos perda de atividade. A 80 °C, EATI mantém aproximadamente 17 % de atividade e acima deste ponto até 100 °C sua atividade ficou reduzida a aproximadamente 3 %.

Já o estudo de estabilidade térmica realizado com o inibidor reduzido com 100 mM de DTT por 2 horas apresentou um perfil bastante distinto. Em temperaturas de até 40 °C, o inibidor reduzido não mostrou nenhuma diferença frente ao inibidor nativo. Interessantemente, o aumento da temperatura a partir deste ponto provocou uma diminuição

acentuada em sua atividade residual. A partir dos 80 °C ambos comportam-se de maneira similar.

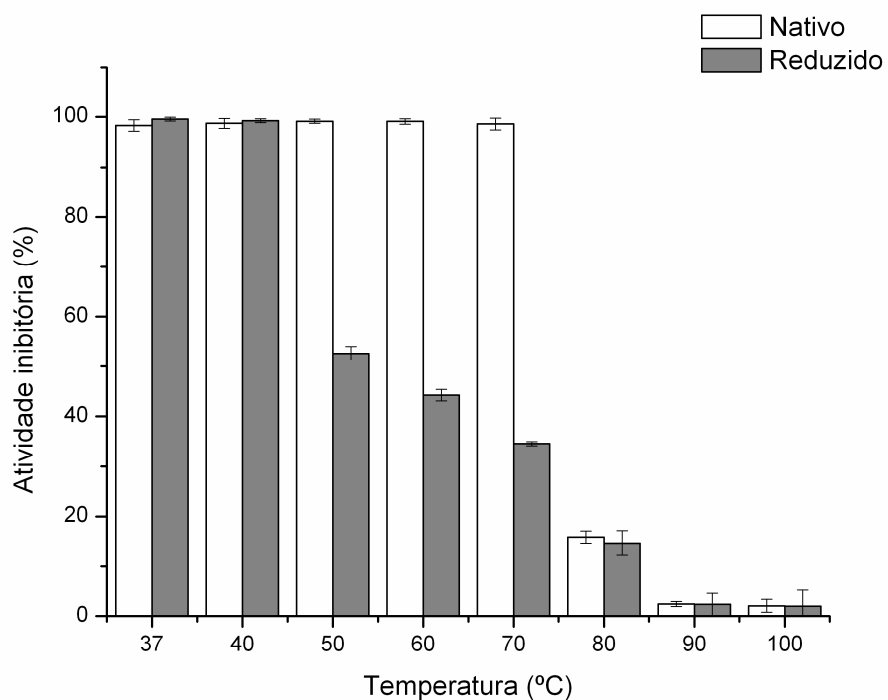


Figura 15. Efeito da temperatura sobre a estabilidade de EATI nativo e reduzido.

7.3 - Estabilidade a variação de pH

A incubação de EATI nativo em diferentes pHs mostrou não afetar sua atividade inibitória. Desde o pH altamente ácido até o altamente alcalino, EATI manteve completamente sua atividade.

Entretanto, quando o inibidor reduzido com 100 mM de DTT por 2 h foi submetido ao mesmo ensaio, observamos uma redução em sua atividade inibitória à medida que o pH caminha da neutralidade em direção a menores valores de pH. Em pH 2, EATI reduzido manteve em média 64 % de sua atividade inibitória.

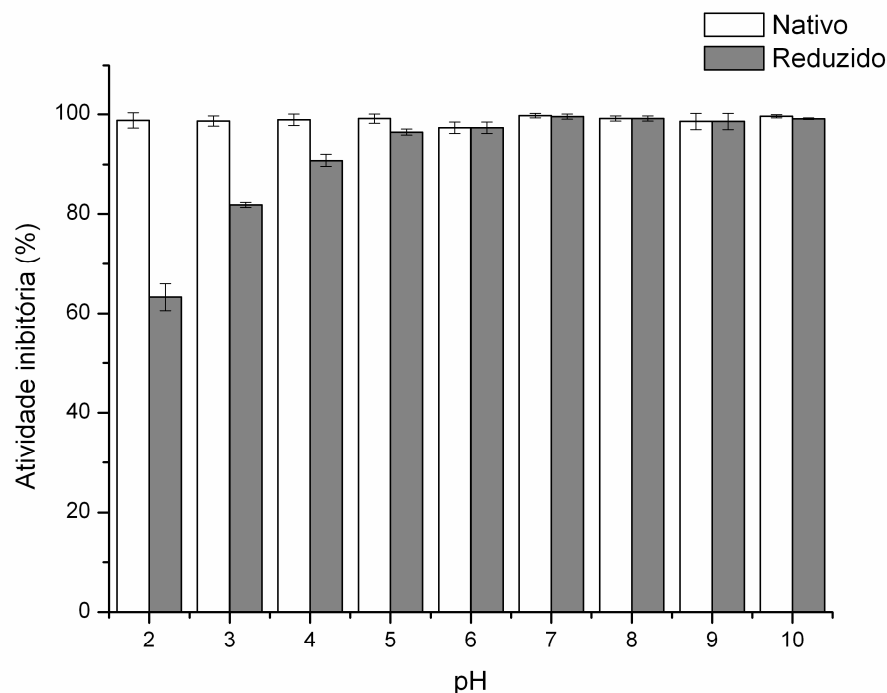


Figura 16. Efeito da variação de pH sobre a estabilidade de EATI nativo e reduzido.

8 - Dicroísmo circular de EATI

A interpretação do espectro nativo de EATI revela uma elipticidade mínima acentuada próxima a 200 nm seguida de valores positivos próximos a 230 nm, formando assim um pequeno ombro (Figura 18). A estrutura secundária de EATI foi predita utilizando os algoritmos SELCON3, CONTIN e CDSSTR. Todos os algoritmos

apresentaram resultados similares. A predição estrutural gerada pelo algoritmo CONTIN apontou a presença de 3 % de α -hélices, 33 % de folhas- β e 64 % de estruturas não ordenadas (Tabela 5), evidenciando a presença majoritária de folhas- β e estruturas não ordenadas.

A predição da estrutura secundária do inibidor de tripsina de *Acacia confusa* (ACTI-A) foi obtida a partir de sua sequência primária de aminoácidos utilizando o servidor PSIPRED (Figura 19). ACTI-A foi escolhido devido sua maior identidade N-terminal com EATI. O resultado desta predição é apresentado na Figura 17 e revela um grande conteúdo de folhas- β e loops além da ausência de α -hélices.

O espectro de EATI após 4 horas de incubação com 8 M de ureia sofreu ligeiras mudanças, refletindo as alterações estruturais causadas por este agente caotrópico. A principal mudança foi o surgimento de um pico positivo próximo a 200 nm seguido do deslocamento do pico negativo para 215 nm. Além disso, a elipticidade positiva observada em 230 nm foi perdida. A estrutura secundária predita para EATI incubado com ureia foi de 3 % de α -hélice, 48 % de β -folha e 48 % de estrutura não ordenada.

Tabela 5. Predição de estrutura secundária de EATI através do algoritmo CDSSTR.

	Conteúdo de estrutura secundária (%)		
	α -hélice	folha- β	Estrt. não ordenada
EATI	3	33	64
EATI + DTT (1 mM, 37 °C, 2 h)	11	30	59
EATI + Uréia (8 M, 37 °C, 4 h)	3	48	49

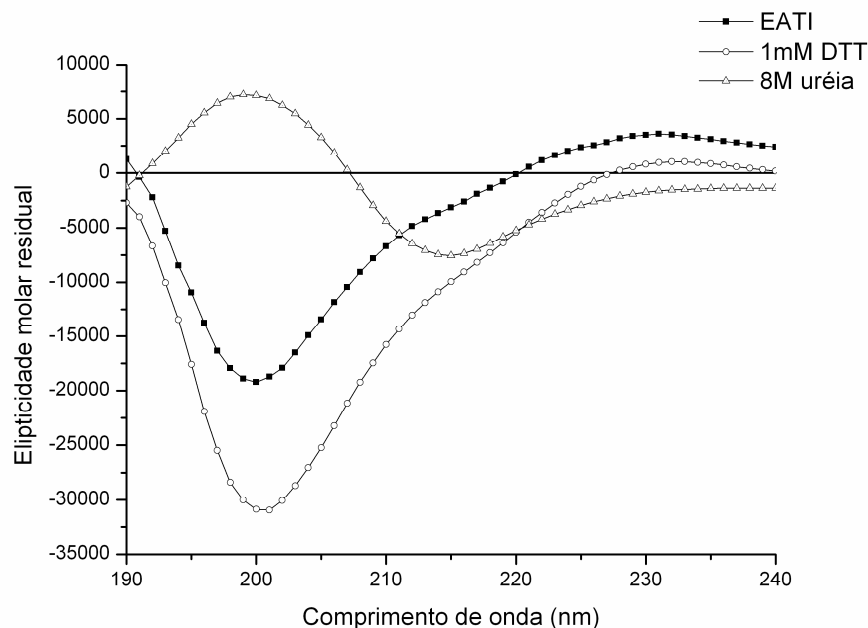


Figura 18. Espectro de CD para EATI nativo, incubado em 1 mM de DTT por 2 horas e incubado em 8 M de uréia durante 4 horas.

9 - Estudo da atividade biológica de EATI frente às proteases de diferentes insetos-praga

Observa-se uma diferença no padrão de inibição das proteases oriundas das diferentes espécies, podendo agrupá-las em 2 grupos: as enzimas inibidas moderadamente por EATI, presentes nas larvas de *Agrotis ipsilon*, *Diatraea saccharalis* e *Anticarsia gemmatalis*, que apresentaram inibição da atividade proteolítica de 30,3 %, 40,6 % e 50,5 %, respectivamente. Já o segundo grupo reúne as espécies que sofreram uma potente inibição por EATI, de 70,6 %, 81,3 % e 96 %, representadas pelas larvas de *Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda* e *Helicoverpa zea*, respectivamente.

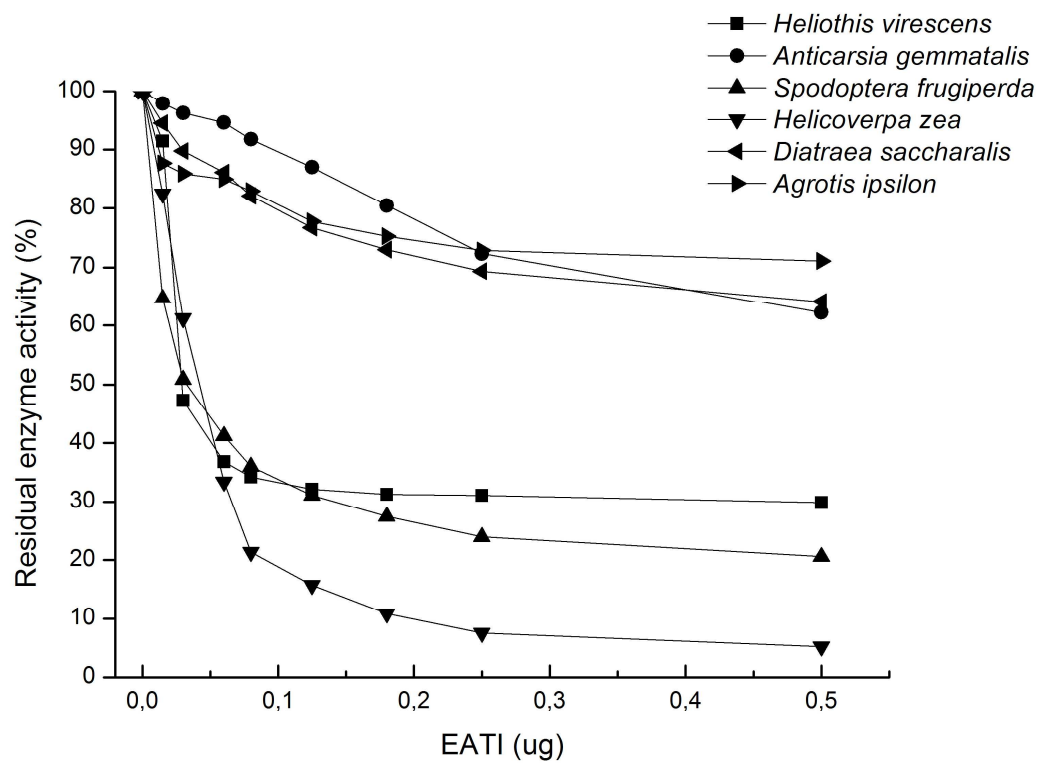


Figura 19. Inibição da atividade proteolítica das proteases intestinais de larvas de 4 ° instar por EATI. BAPNA 1 mM foi utilizado como substrato. Os pontos representam a média de 6 replicatas.

VI – DISCUSSÃO

Sementes da família Fabaceae contêm grandes quantidades de proteínas, sendo que uma pequena proporção destas consiste de inibidores que suprimem a atividade proteolítica *in vivo* e *in vitro* pela formação de estáveis complexos estequiométricos (RICHARDSON, 1991; MACEDO *et al.*, 2004). Destes, inibidores de serinoprotease são os mais estudados e têm sido isolados de diversas espécies (MACEDO *et al.*, 2002). Diversos estudos sugerem sua aplicação como ferramenta biotecnológica para o combate a diversas pragas agrícolas, as quais provocam enormes prejuízos econômicos e limitam o crescimento da produção mundial de alimentos. Contudo, é necessária uma caracterização estrutural e funcional, ensaios preliminares *in vitro* e testes *in vivo* para uma melhor compreensão do potencial de novos inibidores antes de serem utilizados no melhoramento de plantas.

A metodologia desenvolvida para a extração e purificação do inibidor de *E. acaciifolia* foi baseada em descrições anteriormente empregadas para a purificação de proteínas, fazendo uso de soluções salinas para a extração de proteínas seguidas por diferentes técnicas cromatográficas, a fim de isolar a proteína de interesse. Inicialmente, após a obtenção da farinha de fina granulação, um processo de delipidação utilizando hexano foi empregado, haja vista a grande concentração de lipídios presente em sementes. De acordo com Richardson (1991), a delipidação elimina problemas durante a extração de inibidores, diminuindo a interferência nas etapas subsequentes de purificação. Ao analisar a constituição proteica do Extrato Bruto (EB) (Figura 11), concluímos que EATI é a proteína majoritária.

Muitos IP são purificados e isolados com a utilização de técnicas cromatográficas, assim, cromatografias de exclusão molecular, troca-iônica e afinidade são amplamente utilizadas como passos obrigatórios durante o processo de purificação de inibidores (RICHARDSON, 1991; MELLO, 2005; GARCIA *et al.*, 2004; MACEDO *et al.*, 2007b). A primeira etapa de purificação empregada foi a cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75, onde o EB foi fracionado em 3 picos, como mostra a Figura 8. Apenas o segundo pico (G-II) apresentou atividade inibitória, apresentando um rendimento de 71,3 %.

Quando G-II foi aplicado em coluna de troca-iônica DEAE-Sepharose, obteve-se um pequeno pico sem atividade inibitória anterior a utilização do gradiente salino. Com o gradiente de 0 a 1 M de NaCl, houve a eluição de dois picos, onde apenas um deles mostrou atividade inibitória (Figura 9). Este foi então denominado D-II, apresentou um rendimento de 69,59 % e foi purificado 1,46 vezes (Tabela 1).

Como etapa final de purificação, utilizou-se a coluna de afinidade Sepharose-tripsina. A cromatografia de afinidade mostra-se uma eficiente ferramenta na purificação de inibidores e vem sendo empregada como etapa de purificação para diversos destes (MELLO *et al.*, 2001; LINGARAJU & GOWDA, 2008). Resinas com enzimas específicas imobilizadas são empregadas, geralmente anidroenzimas, enzimas inativas que conservam a afinidade pelo inibidor, evitando assim sua proteólise parcial. Um único pico foi eluído da coluna (Figura 10). Este foi denominado EATI e utilizado nos ensaios posteriores.

A família de inibidores do tipo Kunitz é marcada por um número significativo de proteínas com regiões da estrutura primária altamente conservadas, porém, com massa

molecular, número e posição das pontes dissulfeto distintas entre outras características funcionais divergentes (SILVA, 2004). A presença de isoformas de inibidores é bastante comum e relatada por diversos autores (SILVA, 2004; BHATTACHARYYA & BABU, 2009). A cromatografia líquida de alta eficiência pôde revelar a presença de isoformas presentes no pico homogeneamente eluído da coluna de afinidade Sepharose-tripsina, já que a característica de separação de proteínas empregada nesta etapa (coluna C-18) é a hidrofobicidade. Esta propriedade permite que diferentes isoformas sejam eluídas em diferentes tempos de retenção. O cromatograma obtido revelou a presença de 4 picos com moderada atividade inibitória (Figura 11), o que nos permite inferir a presença de 4 isoformas do inibidor: EATI-1, EATI-2, EATI-3 e EATI-4. Comumente, a presença de isoformas é descrita para inibidores vegetais. Sua apresentação pode ser explicada através de modificações pós-traducionais ou por fenômenos de duplicação gênica (MACEDO *et al.*, 2002). A aparente perda de um número significativo de resíduos de aminoácidos durante modificações pós-traducionais têm sido relatada para inibidores de várias espécies de leguminosas (TAN-WILSON *et al.*, 1987, SILVA, 2004). A origem e o papel fisiológico das isoformas de inibidores em plantas ainda não estão totalmente esclarecidos. Uma possibilidade levantada seria seu emprego na defesa vegetal. Mutações poderiam inativar um inibidor, fato que traria grandes consequências para a sobrevivência da espécie. Determinados eventos que poderiam tornar uma proteína inativa, perdem um pouco de sua relevância quando existem isoformas dessa mesma proteína. Assim, uma ou algumas das isoformas poderiam inativar-se e mesmo assim a defesa vegetal estaria garantida pela presença das demais.

A aplicação da espectrometria de massas em biomoléculas tem se revelado uma técnica de grande importância para a análise de proteínas. A técnica de espectrometria de massas *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI-TOF) foi utilizado para determinar a massa acurada da principal isoforma purificada: EATI-1. A massa obtida foi de 19.725,127 Da e está dentro do padrão observado para inibidores da família Kunitz (Figura 11). A análise do espectro de massas fornece uma grande quantidade de informações sobre proteínas em um curto período de tempo, além de necessitar de pequenas concentrações de amostra (de pico e fentomoles) (SILVA, 2004).

De acordo com a Tabela de purificação, observamos um gradativo aumento da atividade inibitória específica ao longo do processo de purificação (Tabela 1). Um detalhe que chama a atenção é o alto rendimento apresentado por EATI, superior a 40 %. Aparentemente, espécies do gênero *Entada* apresentam uma boa porcentagem de recuperação. Lingaraju & Gowda (2008) obtiveram um rendimento superior a 28 % na purificação de ESTI.

A especificidade dos inibidores presentes na família Kunitz pode variar. Poucos inibidores desta família são específicos para quimotripsina e não inibem tripsina (MACEDO *et al.*, 2007), alguns são potentes inibidores de tripsina e também inibem quimotripsina, como o inibidor isolado de *Derris trifoliata* (BHATTACHARYYA & BABU, 2009), ou tem a habilidade de inibir enzimas de diferentes classes, como ApKTI, que inibe tripsina e papaína (MIGLIOLO *et al.*, 2010). Ensaio de atividade enzimática *in vitro* detectaram uma fraca atividade inibitória de EATI frente à quimotripsina bovina (dados não apresentados). Por este motivo os ensaios de caracterização foram realizados

somente com tripsina. A respeito da especificidade de inibição, EATI é similar ao inibidor de tripsina isolado de *Inga laurina* (MACEDO *et al.*, 2007b) e ao inibidor de *Entada scandens* (LINGARAJU & GOWDA, 2008), os quais apresentam um único sítio reativo e específico para tripsina.

Em todas as etapas de purificação e nos diversos ensaios realizados para a determinação de atividade inibitória, a diminuição da atividade enzimática em resposta a adição de diferentes quantidades de inibidor foi medida juntamente a uma quantidade padrão de enzima e substrato em condições ótimas de ensaio. A atividade resultante é comparada com um controle sem a presença do inibidor, podendo assim construir um gráfico onde determinamos a inibição da atividade enzimática nas diferentes concentrações de inibidor. Desta curva de inibição é possível obter a quantidade de enzima inibida por uma determinada quantidade de inibidor. Geralmente, neste tipo de ensaio são utilizados substratos sintéticos cromogênicos, como o BAPNA (N α -Benzoyl-D,L-arginine p-nitroanilide hydrochloride). Substratos sintéticos são utilizados devido sua maior especificidade, o que permite diferenciar entre atividades proteolíticas individuais (BELITZ & WEDER, 1990; MELLO, 2005). A hidrólise do BAPNA pela tripsina ocorre na ligação entre a arginina e a p-nitroanilida, liberando o cromóforo p-nitroanilida, que pode então ser detectado por análise colorimétrica a 410 nm.

A eletroforese em SDS-PAGE 12,5 % permitiu acompanhar todos os passos do processo de purificação do inibidor (Figura 11). A análise do EB e do material proveniente da coluna de afinidade nos permite verificar que um alto grau de pureza foi alcançado, o que permitiu o prosseguimento dos estudos. Podemos observar através da eletroforese que

EATI possui uma massa relativa de 20 kDa, mesmo na presença de 0,1 M de DTT, indicando a presença de uma única cadeia polipeptídica. Características similares de massa e estrutura são reportadas outros inibidores pertencentes à subfamília Mimosoideae, isolados de sementes de *Inga laurina* (MACEDO *et al.*, 2007b), *Dimorphandra mollis* (MACEDO *et al.*, 2000; MELLO *et al.*, 2001), *Archidendron ellipticum* (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006) e *Derris trifoliata* (BHATTACHARYYA & BABU, 2009).

O sequenciamento N-terminal revelou homologia entre EATI-1 e outros inibidores tipo Kunitz além da presença de substituições altamente conservadas (Tabela 4). Os inibidores de *Acacia confusa*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Propolis juliflora*, *Adenanthera pavonina*, *Leucaena leucocephala*, *Bauhinia variegata* e *Glicine max* foram aqueles que apresentaram a maior identidade sequencial. A busca realizada com base na composição global de aminoácidos veio a corroborar os resultados anteriormente descritos, revelando uma alta similaridade entre EATI e os inibidores de *Psophocarpus tetragonolobus*, *Erythrina variegata*, *Bauhinia bauhinoides*, *Acacia confusa* e de sementes de *Leucaena glauca*. Com base nos resultados obtidos através de ensaios de caracterização *in vitro*, análise da composição de aminoácidos e homologia N-terminal, podemos concluir que EATI pertencente à família Kunitz de inibidores de serinoprotease. Estes resultados sustentam a teoria de Norioka *et al.* (1988), de que existe uma relação entre a evolução das subfamílias encontradas na família Fabaceae e as famílias de inibidores nelas encontradas.

A elucidação da especificidade dos IP é sem dúvida, uma das mais importantes formas utilizadas para o esclarecimento dos mecanismos de ação e do controle sobre

atividade enzimática (WENZEL & TSCHESCHE, 1995; MELLO, 2005). Diferentes perfis de inibição foram observados para enzimas do tipo tripsina extraídas de diferentes espécies de lepidópteros (Figura 22), o que nos permite deduzir que a natureza química e estrutural do sítio reativo de EATI permita que este estabeleça interações com os sítios ativos presentes em enzimas do tipo tripsina. Tripsinas geralmente clivam ligações peptídicas internas da extremidade C-terminal de aminoácidos ácidos, como arginina e lisina (BIRK, 2003). Nós sugerimos, portanto, que EATI possua um resíduo arginina ou lisina na posição P₁, localizada em seu sítio reativo. Esta posição específica determina a afinidade de uma enzima pelo inibidor. É sabido, por exemplo, que a quimotripsina cliva preferencialmente ligações peptídicas na extremidade C-terminal de resíduos tirosina, fenilalanina, triptofano e leucina (BIRK, 2003).

A partir da extrapolação da curva de titulação frente à tripsina é possível visualizar uma estequiometria de inibição do tipo 1:1 (inibidor:enzima), indicando inibição do tipo competitiva típica dos inibidores da família Kunitz (RICHARDSON, 1991; MACEDO *et al.*, 2000; MACEDO *et al.*, 2007). Através do plot de Dixon (1953) podemos calcular o K_i de EATI para tripsina. O valor encontrado foi de $1,75 \times 10^{-9}$ M e demonstra uma alta afinidade de EATI pela tripsina (Figura 13). Outros inibidores Kunitz apresentaram valores de K_i similares (MACEDO *et al.*, 2007b; CHAUDHARY *et al.*, 2008; BHATTACHARYYA *et al.*, 2009).

Nos inibidores Kunitz clássicos, como no inibidor de soja STI, duas pontes dissulfeto são localizadas sobre a superfície da proteína, o que as tornam altamente acessíveis ao solvente, mas a contribuição destas estruturas na manutenção de sua

funcionalidade está na dependência de características individuais de cada proteína (HANSEN *et al.*, 2007). Assim, a análise das diferenças estruturais nessa posição pode contribuir para compreender o significado das pontes dissulfeto para a estabilidade e especificidade dos IP.

Com o intuito de conhecer o comportamento de EATI em diferentes condições de temperatura, pH e concentrações de DTT, ensaios de estabilidade foram realizados. EATI mostrou uma grande estabilidade a uma ampla faixa de pH (Figura 18), além de apontar uma apreciável termo estabilidade, com a manutenção de sua atividade inibitória praticamente inalterada até 70 °C (Figura 17). Estes resultados são comuns para inibidores da família Kunitz (MACEDO *et al.*, 2007b; GARCIA *et al.*, 2004; MELLO *et al.*, 2001). Contudo, diferentemente da maioria deles, o inibidor reduzido com 0,1 M de DTT não apresentou alteração em sua atividade inibitória ou afinidade pela tripsina (Figura 16). Podemos destacar alguns inibidores que apresentam característica similar, são eles ETI, DMTI e PrTI, isolados por Lehle *et al.* (2004), Mello *et al.* (2001) e Chaudhary *et al.* (2008), respectivamente.

Estudos têm examinado o papel das pontes dissulfeto na estrutura e no desenovelamento de STI (TETENBAUM & MILLER, 2001). Eles mostraram que a redução das pontes dissulfeto neste inibidor resulta na completa inativação proteica, evidenciando o papel crucial destas pontes na estabilização da estrutura necessária à manutenção da atividade inibitória (TETENBAUM & MILLER, 2001; HANSEN *et al.*, 2007). Contrariamente, dados cristalográficos do inibidor de *E. caffer* (ETI) obtidos por Onesti *et al.* (1991) mostram que as pontes dissulfeto deste inibidor estão afastadas dos

resíduos que constituem seu sítio reativo e ainda concluíram que a estabilização do sítio reativo de ETI é feita por pontes de hidrogênio diferentemente da maioria dos inibidores clássicos do tipo Kunitz. Assim como observado para ETI, EATI reduzido com 0,1 M de DTT apresentou uma drástica redução em sua estabilidade, tanto térmica quanto em relação ao pH (Figura 17 e 18), sugerindo uma vital importância do estado de oxidação para a estabilidade da proteína mas não para sua atividade inibitória.

Um segundo e importante papel possivelmente exercido pelas pontes dissulfetos foi estudado por Zakharova *et al.* (2008). Neste trabalho eles avaliaram a importância da ponte dissulfeto formada entre os resíduos cys14 e cys38 do inibidor de tripsina bovino. Esta ponte está presente em posição análoga em inibidores vegetais e aparentemente reduz a flexibilidade dos “loops” (“loop”-40 e “loop”-80) que contém estes resíduos através de ligações cruzadas. Para tanto, foram construídas 3 variantes do inibidor com substituições dos resíduos cisteína citados acima. Todas as três variantes foram clivadas mais rapidamente pela tripsina do que a do tipo selvagem, em intervalos de tempo até 10.000 vezes mais rápidos, indicando que a restrição covalente normalmente imposta pela ponte dissulfeto contribua para a notável resistência à hidrólise apresentada pelos inibidores.

Dicroísmo circular é uma técnica espectroscópica amplamente utilizada para a avaliação da conformação e estabilidade de proteínas em diferentes condições como temperatura, força iônica e presença de solutos e pequenas moléculas (CORRÊA & RAMOS, 2009). É utilizado principalmente para estudar estruturas secundárias de proteínas. O espectro obtido de uma proteína típica constituída apenas de α -hélices apresenta 2 bandas negativas de magnitudes semelhantes, a 222 e 208 nm, e uma banda

positiva a 190 nm (Figura 20). Já o espectro de uma proteína constituída apenas de estruturas tipo folhas- β apresenta, em geral, uma banda negativa entre 210-220 nm e uma banda positiva entre 195-200 nm. Contudo, o espectro para proteínas β são mais diversificados que aqueles apresentados por proteínas constituídas por α -hélices, pois as folhas- β podem estar presentes em sentido paralelo, antiparalelo ou então apresentando conformações mistas, podendo ainda estarem torcidas de maneiras aleatórias (CORRÊA & RAMOS, 2009).

A concentração do inibidor utilizada para os estudos de DC foi estabelecida por apresentar uma boa relação sinal/ruído. O espectro obtido assemelhasse ao apresentado por inibidores da família Kunitz que têm sido caracterizados como proteínas que apresentam uma estrutura secundária caracterizada por folhas- β interligadas através de dobramentos randômicos (LIAO *et al.*, 2007; YOSHIZAKI *et al.*, 2007; BHATTACHARYYA & BABU, 2006; ARAUJO *et al.*, 2005). A pequena representatividade de α -hélices nos espectros de EATI nativo corrobora as predições geradas através dos algoritmos SELCON3, CONTIN CDSSTR, apontando virtualmente a ausência deste tipo de estrutura em EATI (Tabela 5). Este padrão espectral específico assemelha-se ao de SBTI, um dos inibidores de tripsina isolado de soja, que pertence à classe de proteínas β -II. β -II é uma subclasse de proteínas β onde os resíduos de aminoácidos formam estruturas folhas- β irregulares (YOSHIZAKI *et al.*, 2007). Com o objetivo de observar possíveis alterações estruturais provocadas pela redução de EATI, o espectro do inibidor incubado com 1 mM de DTT foi coletado (Figura 20). Interessantemente, notou-se um aumento de α -hélices seguida da redução de folhas- β (Tabela 5). Devemos salientar que a redução do inibidor

não alterou sua atividade inibitória. Deste modo, é conveniente deduzir que durante o processo de redução das pontes de dissulfeto em EATI, as regiões próximas a elas sofreram ligeiras perturbações, haja vista a perda da rigidez estrutural imposta por elas. Este fato pode provocar um fenômeno conhecido por reorganização estrutural. Durante o processo de reorganização de uma cadeia polipeptídica, estruturas secundárias do tipo α -hélices e folhas- β são formadas na maioria dos casos (TAMURA & JIRGENSONS, 1980). Gruen *et al.* (1984) sugerem que a notável estabilidade dos inibidores Kunitz exista devido considerável presença de estruturas em folhas- β plissadas, com pouca ou nenhuma estrutura regular. Esta molécula compacta é estabilizada principalmente por interações hidrofóbicas. No caso de EATI reduzido, esta hipótese poderia ser aplicada, fato que determinaria sua menor estabilidade térmica e a variações de pH. A redução de estruturas do tipo folhas- β e o aparecimento de α -hélices poderiam causar um enfraquecimento da estrutura fortemente estabilizada levando em última análise a diminuição da estabilidade antes vista.

EATI mostrou-se extremamente estável frente à incubação com 8 M de ureia durante 4 horas. A única mudança de grande magnitude observada foi na inversão da elipticidade a 200 nm (Figura 20). Mesmo assim, a estrutura predita para esta situação foi de um ganho estrutural frente à diminuição de estruturas não ordenadas, associada ao aumento no conteúdo de folhas- β e um aparecimento discreto de α -hélices (Tabela 5). Esta é uma segunda característica marcante desta classe de proteínas, a resistência a agentes caotrópicos, como já descrita para diversos inibidores, dentre eles o inibidor de *Psophocarpus tetragonolobus* (GRUEN *et al.*, 1984), o qual apresentou uma elevada similaridade com EATI, baseado na composição global de aminoácidos. Estudos de

desnaturação de STI por cloreto de guanidina conduzidos Leach & Fish (1977) concluíram que o desenovelamento completo deste inibidor acontece após 14 dias de incubação com 6 M deste agente caotrópico. Já a investigação realizada por Edelhoch & Steiner (1963) mostrou que 9 M de ureia apenas perturbou ligeiramente a organização estrutural de STI e o desenovelamento do inibidor só foi alcançado quando incubado em elevadas temperaturas.

Inibidores de protease têm sido utilizados para aumentar a resistência de plantas transgênicas a insetos-praga devido seu pequeno tamanho, abundância, estabilidade além da alta especificidade para uma determinada classe de enzimas digestivas de insetos (MACEDO *et al*, 2010b). O melhor entendimento do efeito de EATI sobre a atividade proteolítica de diferentes insetos *in vitro* possibilita estudar sua atividade e sugerir estudos mais aprofundados frente à espécie mais susceptível. Muitos estudos têm sido realizados nesta área, direcionando a ação de IP, já que estes possuem a capacidade de reduzir o desenvolvimento e sobrevivência de uma gama de insetos. Muitas pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de verificar a eficácia deste papel biológico, trazendo assim contribuições para a agricultura (JOUANIN *et al.*, 1998, RAMOS, 2008).

A atividade digestiva de enzimas do tipo tripsina foi amplamente reportada entre espécies de insetos e sua especificidade assemelha-se a tripsinas de vertebrados (TERRA & FERREIRA, 1994; LAM *et al.*, 2000; PILON *et al.*, 2006). Entretanto, tripsinas de ambos os grupos podem diferir em pH ótimo, peso molecular, sensibilidade a íons, ponto isoelétrico e sensibilidade a inibidores vegetais (BIRK, 2003). De acordo com Pilon *et al.* (2006), a inibição entre tripsinas de pode diferir, indicando que perturbações no processo

digestivo dos insetos quando em contato com IP necessita de seleção anterior de inibidores adequados para as proteases do inseto estudado.

A representação da atividade individual de cada classe de enzima para o processo total de digestão nos insetos analisados varia grandemente, podendo ser um dos fatores que corroboram a diferença no padrão de inibição observado (Figura 20). Outro importante aspecto que deve ser levado em consideração é a adaptação que alguns insetos apresentam a determinados inibidores, adquiridos ao longo de milhares de anos da interação inseto-planta. Este resultado acabou levando alguns insetos a tornarem-se consumidores especializados de determinadas espécies vegetais pelos mecanismos adaptativos adquiridos, responsáveis pelo processo de detoxificação ou de insensibilidade ao inibidor sintetizado pela espécie. Múltiplas isoformas de tripsinas têm sido reconhecidas e o sequenciamento desta família multigênica em insetos é um recente foco de atenção (GRAF *et al.*, 1991; BOWN *et al.*, 1997; MAZUMDAR-LEIGHTON *et al.*, 2000; MAZUMDAR-LEIGHTON & BROADWAY, 2001; DE LEO *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005). As proteases induzidas, incluindo tripsinas, explicam o desenvolvimento de resistência dos insetos a IP presentes em plantas nativas ou transgênicas (JONGSMA *et al.*, 1995; BROADWAY, 1995, 1996; BOWN *et al.*, 1997; BRITO *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Com o passar do tempo, estas respostas adaptativas tornaram-se constitutivas, conferindo assim uma resistência permanente. Em *S. frugiperda*, por exemplo, Brioschi *et al.* (2007) identificaram 10 isoformas de quimotripsinas e 5 isoformas de tripsinas, todas elas expressas em diferentes intensidades e situações, revelando o potencial de adaptação apresentado por esta espécie. Esta característica deve ser levada em consideração no momento do desenho de ensaios que avaliem o potencial de um inibidor no combate a uma

determinada praga. A possibilidade de inibidores isolados de espécies vegetais filogeneticamente distantes da cultura atacada exercerem efeito inseticida é muito maior.

A curva de inibição obtida para as proteases de *H. zea* aponta esta espécie como uma possível candidata aos ensaios *in vivo* com EATI incorporado em dieta artificial, haja vista o alto grau de inibição obtido. Através dos resultados do ensaio, vimos que as enzimas larvais de *H. zea* perdem cerca de 40 % de sua atividade proteolítica na presença de 0,03 µg de EATI, e a partir de 0,18 µg a inibição é superior a 90 %. Nossos resultados também apontam *S. frugiperda* e *H. virescens* como interessantes alvos de estudo. Contudo, devemos ter em mente que os resultados *in vitro* podem não ser indicativos que garantam o êxito dos resultados esperados *in vivo*, já que um maior período de contato com o inibidor pode desencadear respostas adaptativas, sobrepujando o efeito inseticida desejado, como descrito anteriormente (GIRARD *et al.*, 1998; BOWN *et al.*, 2004; OPPERT *et al.*, 2005; BRIOSCHI *et al.*, 2007).

VII – CONCLUSÕES

Diante o exposto, podemos concluir que um novo inibidor de tripsina, o primeiro na espécie *E. acaciifolia*, foi isolado e caracterizado.

- Com base em características físico-químicas podemos classificá-lo como pertencente à família Kunitz de inibidores de serinoprotease.
- Este apresentou uma incomum manutenção de sua atividade inibitória mesmo quando reduzido com 0,1 M de DTT, sugerindo que suas pontes dissulfeto não estejam envolvidas na estruturação de seu sítio reativo, mas atuando na manutenção de sua estrutura frente a condições adversas, como variáveis de temperatura e pH.
- EATI mostrou-se uma ferramenta de investigação da atividade inseticida, baseado em ensaios *in vitro*, resultado que revela sua aplicabilidade em estudos aprofundados, almejando sua utilização para o benefício de cultivares contra o ataque de pragas agrícolas.

VIII – PERSPECTIVAS FUTURAS

Baseado nos resultados de atividade inibitória obtidos *in vitro*, pretendemos incorporar o inibidor em dieta artificial e avaliar sua atividade biológica *in vivo* sobre o desenvolvimento de diferentes pragas agrícolas. Esperamos obter a sequência primária de aminoácidos deste novo inibidor. Associado a isso, iniciaremos trabalhos de cristalografia de proteína, na tentativa de cristalizarmos o inibidor EATI. Estudos futuros, somados aos dados obtidos neste trabalho, permitirão determinar seu mecanismo de ação e aludir seu uso como ferramenta biotecnológica, amenizando os problemas relacionados ao uso sistemático de inseticidas químicos, reduzindo as perdas nas lavouras e proporcionando benefícios de modo geral a população.

IX – REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, v. 215, p. 403–10. 1990.
- ARIMURA, G.; KOST, C.; BOLAND, W. Herbivore-induced, indirect plant defences. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1734, p. 91– 111. 2005.
- BABU, R.M.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M.S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management—an over view. *Crop Protection*, v. 22, p. 1071–1086. 2003.
- BATISTA, I.F.; OLIVA, M.L.; ARAUJO, M.S.; SAMPAIO, M.U.; RICHARDSON, M.; FRITZ, H.; SAMPAIO, C.A. Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Phytochemistry*, v. 41, p. 1017-1022. 1996.
- BERNAYS, E.A.; CHAPMAN, R.F. Host plant selection by phytophagous insects. Chapman and Hall, London. 1994.
- BHATTACHARYYA, A.; BABU, C.R. Purification and biochemical characterization of a serine protease inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: Insight into structural and antimalarial features. *Phytochemistry*, v. 70, p. 703–712. 2009.
- BHATTACHARYYA, A.; MAZUMDAR, S.; LEIGHTON, S.M.; BABU, C.R. A Kunitz protease inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: purification, characterization, and kinetic properties, *Phytochemistry*, v. 67, p. 232–241. 2006.

BIRK, Y. Plant Protease Inhibitors: Significance in Nutrition, Plant Protection, Cancer Prevention and Genetic Engineering. Springer-Verlag, Berlin, p. 1-170. 2003.

BOUCHARD, E., CLOUTIER, C., MICHAUD, D. Oryzacystatin I expressed in transgenic potato induces digestive compensation in an insect natural predator via its herbivorous prey feeding on the plant. Mol. Ecol., v. 12, p. 2439–2446. 2003.

BOWN, D.P.; SON, H.S.W.; GATEHOUSE, J.A. Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. Physiological Entomology, v. 29, p. 278–290. 2004.

BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. Insect Biochem. Mol. Biol. v. 27, p. 625–638. 1997.

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

BRIOSCHI, D.; NADALINI, L.D.; BENGTSON, M.H.; SOGAYAR, M.C.; MOURA, D.S.; SILVA-FILHO, M.C. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean protease inhibitor. Insect Biochemistry and Molecular Biology. v. 37, p. 1283–1290. 2007.

BRITO, L.O.; LOPES, A.R.; PARRA, J.R.P.; TERRA, W.R.; SILVA-FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to protease inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteases. Comp. Biochem. Physiol. B, v. 128, p. 365– 375. 2001.

- BROADWAY, R.M. Are insects resistant to plant protease inhibitors; J. Insect Physiol. v. 41, p. 107– 116. 1995.
- BRUNELLE, F.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. Colorado potato beetles compensate for tomato cathepsin D inhibitor expressed in transgenic potato. Arch. Insect Biochem. Physiol., v. 55, p. 103– 113. 2004.
- CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. Toxicon, v. 40, p. 1515-1539. 2002.
- CARLINI, C.R.; OLIVEIRA, A.E.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J.; WELLS, M.A. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. J. Econ. Entomol., v. 90, p. 340– 348. 1997.
- CHAUDHARY, N.S.; SHEE, C.; ISLAM, A.; AHMAD, F.; YERNOOL, D.; KUMAR, P.; SHARMA, A.K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Putranjiva roxburghii* seeds. Phytochemistry, v. 69, p. 2120–2126. 2008.
- CHEN, T.B.; SHAW, C. Identification and molecular cloning of novel trypsin inhibitor analogs from the dermal venom of the Oriental firebellied toad (*Bombina orientalis*) and the European yellow-bellied toad (*Bombina variegata*). Peptides, v. 6, p. 873–880. 2003.
- CHRISPEELS, M.J. Transfer of bruchid resistance from the common bean to other starchy grain legumes by genetic engineering with the α -amylase inhibitor gene. In: Carozzi, N., Koziel, M. (Eds.), Transgenic Plants for Control of Insect Pests, Taylor & Francis, London, p. 1–10. 1996.

COELHO, M.B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 146, p. 406–414. 2007.

COLFALONIERI, M.; ALLEGRO, G.; BALESTRAZZI, A.; FOGHER, C.; DELLEDONNE, M. Regeneration of *Populus nigra* transgenic plants expressing a Kunitz protease inhibitor (Kti3) gene. *Mol. Breed.*, v. 4, p. 137–145. 1998.

COMPTON, L.A.; JOHNSON, W.C., JR. Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication. *Anal. Biochem.*, v. 155, p. 155–167. 1986.

CORNU, D.; LEPLE, J.C.; BONADÉ-BOTTINO, M.; ROSS, A.; AUGUSTIN, S.; DELPLANQUE, A.; JOUANIN, L.; PILATE, G.; AHUJA, M.R. Expression of a protease inhibitor and a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin in transgenic poplars. In: Boerjan, W., Neale, D.B. (Eds.), *Somatic cell genetics and molecular genetics of trees*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, p. 131–136. 1996.

CORRÊA, D.H.A.; RAMOS, C.H.I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. *African Journal of Biochemistry Research*. v. 3, p. 164–173. 2009.

DATTA, K.; BAISAKH, N.; THET, K.M.; TU, J.; DATTA, S.K. Pyramiding transgenes for multiple resistance in rice against bacterial blight, yellow stem borer and sheath blight. *Theor. Appl. Genet.*, v. 106, p. 1–8. 1998.

DE CARVALHO, P.G.B., BLOCH JR., C., MORLY, L., DA SILVA, M.C.M., MELLO, L.V., NESHICH, G. Journal of Protein Chemistry, v. 15, p. 591-598, 1996.

DE LEO, F.; BONADÉ-BOTTINO, M.; CECI, L.R.; GALLERANI, R.; JOUANIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. Insect Biochem. Mol. Biol. v. 31, p. 593– 602. 2001.

DIXON, M. The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J., v. 55, p. 170– 171. 1953.

DUAN, X.L.; LI, X.G.; XUE, Q.Z.; ABOELSAAD, M.; XU, D.P.; WU, R. Transgenic rice plants harboring an introduced potato protease inhibitor II gene are insect resistant. Nat. Biotechnol., v. 14, p. 494–498. 1996.

EDELHOCH, H.; STEINER, R.F. The Journal of Biological Chemistry. v. 238, p. 931-938. 1963.

EDMAN, P. Method form determination for amino acid sequence in peptides. Acta Chem. Scand., v. 28, p. 283-293. 1950.

FALCO, M.C., SILVA-FILHO, M.C. Expression of soybean protease inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. Plant Physiology and Biochemistry., v. 41, p. 761–766. 2003.

FAN, S.G., WU, G.J. Characteristics of plant protease inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. Bot. Bull. Acad. Sin., v. 46; p. 273-292, 2005.

FAO. How feed the world in 2050. Roma, Itália. p. 1-35. 2009.

- FARMER, E.E.; RYAN, C.A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of protease inhibitors in plant leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 87, p. 7713–7716. 1990.
- FERMI, C.; PERNOSSI, L. Untersuchungen über die Enzyme. Vergleichendes Studie. *Z Hyg Infektionskr*, v. 18, p. 83-89. 1984.
- FERRÉ, J.; VAN RIE, J. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu Rev Entomol.*, p. 47, p. 501–33. 2002.
- FERRY, N.; EDWARDS, M.G.; GATEHOUSE, J.A.; GATEHOUSE, A.M.R. Plant–insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 15, p. 155-161. 2004.
- FITCHES, E.C.; BELL, H.A.; POWELL, M.E.; BACK, E.; SARGIOTTI, C.; WEAVER, R.J.; GATEHOUSE, J.A. Insecticidal activity of scorpion toxin (ButaIT) and snowdrop lectin (GNA) containing fusion proteins towards pest species of different orders. *Pest Manag Sci.*, v. 66, p. 74–83. 2010.
- FOOK, J.M.S.L.L.; MACEDO, L.L.P.; MOURA, G.E.D.D.; TEIXEIRA, F.M.; OLIVEIRA, A.S.; QUEIROZ, A.F.S.; SALES, M.P. A serine protease inhibitor isolated from *Tamarindus indica* seeds and its effects on the release of human neutrophil elastase. *Life Sci.*, v. 76, p. 2881–2891. 2005.
- FRANCO, O. L.; MELO, F.R., SILVA, M.C.M., GROSSI DE SÁ, M.F. Resistência de plantas a insetos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v. 10, p. 36–40, 1999.

- GARCIA, V.A.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. *Protein J.*, v. 23, p. 343–350. 2004.
- GARCÍA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; SEGURA, A.; MORENO, M.; CASTAGNARO, A.; TITARENKO, E.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P.; PIÑERO, M.; DIAZ, I. Engineering plants against pathogens: A general strategy. *Field Crops Res.*, v. 45, p. 79-84. 1996.
- GATEHOUSE, A.M.R.; BOULTER, D.; HILDER, V.A. Potential of plantderived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. In: Gatehouse, A.R., Hilder, V.A., Boulter, D. (Eds.), *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*. CAB International, Wallingford, England, p. 155–181. 1992.
- GIRARD, C.; MÉTAYER, M.L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; PHAM-DELEGUE, M.; JOUANIN, L. High level of resistance to protease inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 28, p. 229–237. 1998.
- GOTOR, C.; PINTOR-TORO, J.A.; ROMERO, L.C. Isolation of a new member of the soybean Kunitz-type protease inhibitors. *Plant Physiology*, v. 107, p. 1015-1016, 1995.
- GRAF, R.; BOEHLEN, P.; BRIEGEL, H. Structural diversity of trypsin from different mosquito species feeding on vertebrate blood. *Experientia.*, v. 47, p. 603– 609. 1991.

GRUEN, L.C.; TAO, Z.J.; KORT, A.A. Stability and physicochemical properties of a trypsin inhibitor from winged bean seed (*Psophocarpus tetragonolobus* (L)DC).

Biochimica et Biophysica Acta., v. 791, p. 285-293. 1984.

GUNDLACH, H.; MÜLLER, M.J.; KUTCHAN, T.M.; ZENK, M.H. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 89, p.

2389–2393. 1992.

HAMSHOU, M.; VAN DAMME, E.J.M.; SMAGGHE, G. Entomotoxic effects of fungal lectin from *Rhizoctonia solani* towards *Spodoptera littoralis*. Mycological Research, v.

114, p. 34-40. 2010.

HANSEN, D.; MACEDO-RIBEIRO, S.; VERÍSSIMO, P.; IM, S.Y.; SAMPAIO, M.U.;

OLIVA, M.L.V. Crystal structure of a novel cysteinless plant Kunitz-type protease

inhibitor. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 360, p. 735–740.

2007.

HAQ, S.K.; ATIF, S.M.; KHAN, R.H. Protein protease inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. Archives of

Biochemistry and Biophysics, v. 431, p. 145–159. 2004.

HARBORNE, J.B. Introduction to Ecological Biochemistry. Academic Press, London.

1993.

HEINRIKSON, R.L.; MEREDITH, S.C. Amino acid analysis by reverse phase high-

performance liquid chromatography: precolumn derivatization with phenylthiocyanate.

Analytical Biochemistry, v. 13, p. 65-72. 1984.

- HIGGINS, D.G.; THOMPSON, J.D.; GIBSON, T.J. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods in enzymology*, v. 266, p. 383-402. 1996.
- HILDER, V.A.; GATEHOUSE, A.M.R.; SHEERMAN, S.E.; BARKER, R.F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, v. 330, p.160–163. 1987.
- HUNG, C.H.; LEE, M.C.; LIN, J.Y. Nucleotide sequence of cDNA for *Acacia confusa* trypsin inhibitor and implication of post-translation processing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 184, p. 1524-1528. 1992.
- ISHIMOTO, M.; SATO, T.; CHRISPEELS, M.J.; KITAMURA, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed amylase inhibitor of common bean. *Entomol. Exp. Appl.*, v. 79, p. 309–315. 1996.
- JAKUBOWSKA, A., VAN OERS, M.M., ZIEMNICKA, J., LIPA, J.J., VLAK, J.M. Molecular characterization of *Agrotis segetum* nucleopolyhedrovirus from Poland. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 90, p. 64–68. 2005.
- JANMAAT, A.F.; MYERS, J.H. Rapid evolution and the cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in greenhouse populations of cabbage looppers, *Trichoplusia ni*. *Proc Roy Soc Lond B*, v. 270, p. 2263–70. 2003.
- JONGSMA, M.A.; BAKKER, P.L.; PETERS, J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant protease inhibitors by induction of gut protease activity insensitive to inhibition. *Proceedings of the National Academy of Science*, v. 92, p. 8041–8045. 1995.

JOUANIN, L.; BONADÉ-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M.

Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci.*, v. 131, p. 1-11. 1998.

KOIDE, T.; TSUNASAWA, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. 2.

Amino-acid sequence around the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). *Eur. J.*

Biochem., v. 32, p. 408-416. 1973.

KRATTIGER, A.F. Insect resistance in crops: a case study of *Bacillus thuringiensis* (Bt)

and its transfer to developing countries. *ISAAA Briefs*, n. 2, p. 42. 1997.

LAM, W.; COAST, G.M.; RAYNE, R.C. Characterization of multiple trypsins from the

midgut of *Locusta migratoria*, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 30, p. 85–94. 2000.

LARRY, L.M.; RICHARD, E.S. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against

insects. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, p. 6605–6611. 2002.

LASKOWSKI, M. Jr. Protein inhibitors of serine proteases – mechanism and classification.

In: Friedman M (ed) *Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in*

foods. Plenum. New York, p. 1-17, 1986.

LASKOWSKI, M. JR.; KATO, I. Proteins inhibitors of proteases. *Annu Rev Biochem.*, v.

49, p. 324-337. 1980.

LAWRENCE, P.K., KOUNDAL, K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous

insects. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN: 0717-3458, v. 5, 15 de abril, 2002.

- LEACH, B.S.; FISH, W.W. Resistance of soybean trypsin inhibitor (Kunitz) to denaturation by guanidinium chloride. *The Journal of Biological Chemistry*. v.252, p. 5239-5243. 1977.
- LECARDONNEL, A.; CHAUVIN, L.; JOAUNIN, L.; BEAUJEAN, A.; PREVOST, G.; SANGWAN-NORREEL, B. *Plant Sci.*, v. 140, p. 71–79. 1999.
- LEHLE, K.; WRBA, A.; JAENICKE, R. *Erythrina caffra* trypsin inhibitor retains its native structure and function after reducing its disulfide bonds. *J. Mol. Biol.*, v. 239, p. 276-284. 1994.
- LEPLÉ, J.C.; BONADÉ-BOTTINO, M.; AUGUSTIN, S.; PILATE, G.; DUMANOIS-LE, T.V.; DELPLANQUE, A.; CORNU, D.; JOUANIN, L. *Mol. Breed.*, v. 1, p. 319–328. 1995.
- LIAO, H.; REN, W.; KANG, Z.; JIANG, J.H.; ZHOU, X.J.; DU, L.F. A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity on *Pieris rapae*. *Biotech. Lett.* v. 4, p. 653–658. 2007.
- LINGARAJU, M.H.; GOWDA, L.R. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1784, p. 850–855. 2008.
- MACEDO, M. L. R.; MELLO, G. C.; FREIRE, M. G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MATOS, D. G. G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 40, p. 891-898. 2002.

- MACEDO, M.L.R.; DURIGAN, R.A.; SILVA, D.S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J.R.P. *Adenanthera pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 73, 213–231, 2010b.
- MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; CABRINI, E.C.; TOWAMA, M.H.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Biochim. Biophys. Acta, v. 1621, p. 1–13. 2003.
- MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; KUBO, C.E.G.; PARRA, J.R.P. Bioinsecticidal activity of *Talisia esculenta* reserve protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Anticarsia gemmatilis*. Comp. Biochem. Physiol., C, doi:10.1016/j.cbpc.2010.08.001, 2010^a.
- MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; SILVA, M.B.R.S.; COELHO, L.C.B.B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, v. 146, p. 486–498. 2007a.
- MACEDO, M.L.R.; GARCIA, V.A.; FREIRE, M.G.M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. Phytochemistry, v. 68, p. 1104–1111. 2007b.

MACEDO, M.L.R.; MATOS, D.G.G.; MACHADO, O.L.T.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C. Trypsin Inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties, *Phytochemistry*, v. 54, p. 553–558. 2000.

MACEDO, M.L.R.; SÁ, C.M.; FREIRE, M.G.M.; PARRA, J.R.P. A Kunitz-Type Inhibitor of Coleopteran Proteases, Isolated from *Adenanthera pavonina* L. Seeds and Its Effect on *Callosobruchus maculatus*. *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 2533-2540. 2004.

MACINTOSH, S.C.; KISHORE, G.M.; PERLAK, F.J.; MARRONE, P.G.; STONE, T.B.; SIMS, S.R. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. *J Agric Food Chem.*, v. 38, p. 1145–52. 1990.

MAFFEI, M.E.; MITHOFER, A.; BOLAND, W. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. *Phytochemistry*, v. 68, p. 2946–2959. 2007.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S.; BABU, C.R.; BENNETT, J. Identification of novel serine protease gene transcripts in the midguts of two tropical insect pests, *Scirpophaga incertulas* (Wk.) and *Helicoverpa armigera* (Hb.). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 30, p. 57–68. 2000.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S.; BROADWAY, R.M. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, v. 31, p. 645– 657. 2001.

MC MANUS, M.T.; WHITE, D.W.R.; MC GRAGOR, P.G. Accumulation of a chymotrypsin inhibitor in transgenic tobacco can affect the growth of insect pests. *Transgenic Res.*, v. 3, p. 50–58. 1994.

MELLO, G.C. Estudo dos papéis biológicos de dois inibidores de Kunitz isolados de sementes de *Dimorphandra mollis* BENTH: Atividades inseticidas e inflamatória. Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular da Universidade Estadual de Campinas, 2005.

MELLO, G.C., DESOUZA, I.A., MARANGONI, S., NOVELLO, J.C., ANTUNES, E., MACEDO, M.L.R. Oedematogenic activity induced by Kunitz type inhibitors from *Dimorphandra mollis* seeds. *Toxicon*, v. 47, p. 150–155. 2006.

MELLO, G.C.; OLIVA, M.L.V.; SUMIKAWA, J.T.; MACHADO, O.L.T.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C.; MACEDO, M.L.R. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds, *J. Protein Chem.*, v. 20, p. 625–632. 2001.

MICHIELS, K.; VAN DAMME, E.J.M.; SMAGGHE, G. Plant-Insect Interactions: What can we learn from Plant Lectins? *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 73, p. 193-212. 2010.

MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, A.S.; SANTOS, E.A.; FRANCO, O.L.; SALES, M.P. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine- and cysteine-proteases. *J. Mol. Graph. Model.* doi:10.1016/j.jmgm.2010.05.006. 2010, 2010.

MOAR, W.J.; PUZSTAI-CAREY, M.; VAN FAASSEN, H.; BOSH, D.; FRUTOS, R.; RANG, C.; LUO, K.; ADANG, M.J. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC

Resistance by *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). Appl. Environ.

Microbiol., v. 61, p. 2086–2092. 1995.

MOCHIZUKI, A.; NISHIZAWA, Y.; ONODERA, H.; TABEL, Y.; TOKI, S.; HABU, Y.; UGAKI, M.; OHASHI, Y. Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice stem borers, *Chilo suppressalis*. Entomol. Exp. Appl., v. 93, p. 173–178. 1999.

MOCHIZUKI, A.; NISHIZAWA, Y.; ONODERA, H.; TABEL, Y.; TOKI, S.; HABU, Y.; UGAKI, M.; OHASHI, Y. Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice stem borers, *Chilo suppressalis*. Entomol. Exp. Appl., v. 93, p. 173–178. 1999.

MONNERAT, R.G.; BATISTA, A.C.; MEDEIROS, P.T.; MARTINS, E.S.; MELATTI, V.M.; PRAÇA, L.B.; DUMAS, V.F.; MORINAGA, C.; DEMO, C.; GOMES, A.C.M.; FALCÃO, R.; SIQUEIRA, C.B.; SILVA-WERNECK, J.O.; BERRY, C. Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. Biological Control, v. 41, p. 291–295. 2007.

MORTON, R.L.; SCHROEDER, H.E.; BATEMAN, K.S.; CHRISPEELS, M.J.; ARMSTRONG, E.; HIGGINS, T.J.V. Bean α -amylase inhibitor-I in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. Proc. Natl Acad. Sci., v. 97, p. 3820–3825. 2000.

MOSCARDI, F.; DE SOUZA, M.L. Baculovirus para o controle de pragas. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, v. 24, p. 22–29. 2002.

NEGREIROS, A.N.; CARVALHO, M.M.; XAVIER FILHO, J.; BLANCO-LABRA, A.; SHEWRY, P.R.; RICHARDSON, M. The complete amino acid sequence of the major

Kunitz trypsin inhibitor from the seeds of *Prosopis juliflora*. *Phytochemistry*, v. 30, p. 2829-2833, 1991.

OERKE, E.C., DEHNE, H.W., SCHÖNBECK, F., WEBER, A. *Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops*. Elsevier, Amsterdam. 1994.

OLIVA, M.L.; ANDRADE, S.A.; JULIANO, M.A.; SALLAI, R.C.; TORQUATO, R.J.; SAMPAIO, M.U.; POTT, V.J.; SAMPAIO, C.A. Kinetic characterization of factor Xa binding using a quenched fluorescent substrate based on the reactive site of factor Xa inhibitor from *Bauhinia ungulata* seeds. *Curr. Med. Chem.*, v. 10, p. 1085-1093. 2003.

OLIVA, M.L.; SOUZA-PINTO, J.C.; BATISTA, I.F.; ARAUJO, M.S.; SILVEIRA, V.F.; AUERSWALD, E.A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A. *Leucaena leucocephala* serine protease inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1477, p. 64-74. 2000.

OLIVA, M.L.V. A novel subclassification for Kunitz protease inhibitors from leguminous seeds, *Biochimie*, doi:10.1016/j.biochi.2010.03.021. 2010.

OLIVA, M.L.V.; SOUZA-PINTO, J.C.; BATISTA, I.F.; ARAÚJO, M.S.; SILVEIRA, V.F.; AUERSWALD, E.A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, M.U.; SAMPAIO, C.A. *Leucena leucocephala* serine protease inhibitor: primary structure action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochim. Biophys. Acta.*, v. 1477, p. 64–74. 2000.

OLIVEIRA, C.F.R.; LUZ, L.A.; PAIVA, P.M.G.; COELHO, L.C.B.B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Evaluation of seed coagulant *Moringa oleifera* lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. *Process Biochem.* v. 46, p.498-504. 2011.

OLIVEIRA, M.G.A.; DE SIMONE, S.G.; XAVIER, L.P.; GUEDES, R.N.C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, v. 140, p. 369–380. 2005.

OLSEN, K.M.; DALY, J.C. Plant-toxin interactions in transgenic Bt cotton and their effect on mortality of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.*, v. 93, p. 1293–1299. 2000.

OLSNES, S., WESCHE, J., FALNES, P. Binding, uptake routing and translocation of toxins with intracellular site of action. In: Alouf, J.E., Freer, J.H. (Eds.), *The Comprehensive Sourcebook Bacterial Protein Toxins*. Academic Press, London, p. 73–93. 1999.

OLSNES, S.; PIHL, A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry*, v. 12, p. 3121–3126. 1973.

ONESTI, S.; BRICK, P.; BLOW, D.M. Crystal structure of a Kunitz-type trypsin

OPPERT, B.; KRAMMER, K.J.; BEEMAN, R.W.; JOHNSON, D.; MCGAUGHY, W.H. Protease mediated Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis* Toxins. J. Biol. Chem., v. 272, p. 23473–23476. 1997.

OPPERT, B.; MORGAN, T.T.D.; HARTZER, K.; KRAMER, K.J. Compensatory proteolytic responses to dietary protease inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). Comparative Biochemistry and Physiology C, v. 140, p. 53–58. 2005.

PAIR, S.D. Japanese honeysuckle (Caprifoliaceae): newly discovered host of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). Environmental Entomology, v. 23, p. 906-911. 1994.

PARDO-LÓPEZ, L.; MUÑOZ-GARAY, C.; PORTA, H.; RODRÍGUEZ-ALMAZÁN, C.; SOBERÓN, M.; BRAVO, A. Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. Peptides, v. 30, p. 589-595. 2009.

PATANKAR, A.G.; GIRI, A.P.; HARSULKAR, A.M.; SAINANI, M.N.; DESHPANDE, V.V.; RANJEKAR, P.K.; GUPTA, V.S. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteases explains polyphagous nature of the insect pest. Insect Biochem. Mol. Biol., v. 31, p. 453-464. 2001.

PEARCE, G.; JOHNSON, S.; Ryan, C. Purification and characterization from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves of six small, wound-inducible, protease inhibitors of the potato inhibitor II family. Plant Physiology, v. 102, p. 639–644. 1993.

- PEUMANS, W.J.; HAO, Q.; VAN DAMME, E.J. Ribosome-inactivating proteins from plants: more than RNA N-glycosidases? *FASEB Journal*, v. 15, p. 1493–1506. 2001.
- PILON, A.M.; OLIVEIRA, M.G.A.; GUEDES, R.N.C. Protein digestibility, protease activity, and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatilis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 86, p. 23–29. 2006.
- PRICE, P.W. *Insect Ecology*. 3^a ed. John Wiley & Sons, Inc, New York. 1997.
- PROVENCHER, S.W.; GLOCKNER, J. Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry*, v. 20, p. 33-37. 1981.
- RAMOS, V.S. Efeito de um inibidor de tripsina de sementes de *Plathymenia foliolosa* sobre o desenvolvimento e atividade enzimática de *Anagasta kuehniella*. Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Mestre em Biologia Funcional e Molecular da Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- RAWLINGS, N.D.; MORTON, F.R.; KOK, C.Y.; KONG, J.; BARRETT, A.J. MEROPS: the peptidase database. *Nucl. Acid Res.*, v. 36, p. 320–325. 2008.
- RERLANGE, B.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 95, p. 271–278. 1961.
- RICHARDSON, M. The protease inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry*, v. 16, p. 159–169. 1977.

- RICHARDSON, M., Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. In: Dey, P.M., Harborne, J.B. (Eds.), In: Methods in Plant Biochemistry, Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids, v. 5. Academic Press, New York, p. 259–305. 1991.
- 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 isoinhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian Carolina tree (*Adenanthera pavonina* L.). *Biochim. Biophys. Acta*, v. 872, p. 134-140. 1986.
- SADRAS, V.O. Herbivory tolerance of cotton expressing insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*: responses to damage caused by *Helicoverpa* spp. and to manual bud removal. *Field Crops Research*, v. 56, p. 287–299. 1998
- SANDVIG, K.; VAN DEURS, B. Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. *Gene Therapy*, v. 12, p. 865–872. 2005.
- SAWANO, Y.; HATANO, K.; MIYAKAWA, T.; KOMAGATA, H.; MIYAUCHI, Y.; YAMAZAKI, H.; TANOKURA, M. Protease inhibitor from Ginkgo seeds is a member of the plant nonspecific lipid transfer protein gene family. *Plant Physiol.*, v. 146, p. 1909-1919. 2008.
- SCHROEDER, H.E.; GOLLASH, S.; MOORE, A.; TABE, L.M.; CRAIG, S.; HARDIE, D.; CHRISPEELS, M.J.; SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V. Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil, *Bruchus pisorum*, in genetically engineered peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.*, v. 107, p. 1233–1239. 1995.

SCOTT, C.J.; TAGGART, C.C. Biologic protease inhibitors as novel therapeutic agents, *Biochimie*. doi:10.1016/j.biochi.2010.03.010. 2010.

SEGEL, I.H., *Enzyme Kinetics*. Wiley, New York. 1975.

SHADE, R.E.; SCHROEDER, H.E.; PUEYO, J.J.; TABE, L.M.; MURDOCK, L.L.; HIGGINS, T.J.V.; CHRISPPEELS, M.J. Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Bio Technology*, v. 12, p. 793–796. 1994.

SHARMA, H.C.; ORTIZ, R. Transgenics, pest management, and the environment. *Curr. Sci.*, v. 79, p. 421–437. 2000.

SILVA, J.A. Aspectos estruturais, funcionais e conformacionais do inibidor de tripsina CTI de sementes de *Copaifera langsdorffii*. Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular da Universidade Estadual de Campinas, 2004.

SINGH, B.B.; SINGH, S.R.; ADJADI, O. Bruchid resistance in cowpea. *Crop Sci.*, v. 25, p. 736-739. 1985.

SREEREMA, N.; WOODY, R.W. A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal. Biochem.*, v. 209, p. 32-44. 1993.

STOTZ, H.U.; KROYMANN, J.; MITCHELL-OLDS, T. Plant–insect interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.*, v. 2, p. 268–272. 1999.

- TABASHNIK, B.E.; GASSMANN, A.J.; CROWDER, D.W.; CARRIERE, Y. Insect resistance to Bt crops: evidence versus theory. *Nat. Biotechnol.*, v. 26, p. 199–202. 2008.
- TABASHNIK, B.E.; PATIN, A.L.; DENNEHY, T.J.; LIU, Y.B.; CARRIERE, Y.; SIMS, M.A.; ANTILLA, L. Frequency of resistance to *Bacillus thuringiensis* in field populations of pink bollworm. *Proc. Natl Acad. Sci.*, v. 97, p. 12980–12984. 2000.
- TAMURA, Y.; JIRGENSONS, B. Circular Dichroism studies on effects of organic solvents on conformation and inhibitory capacity of soybean trypsin inhibitor. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 199, p. 413-419. 1980.
- TERRA, W.R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function, *Comp. Biochem. Physiol. B*, v. 109, p. 1–62. 1994.
- TETENBAUM, J.; MILLER, L.M. A new spectroscopy approach to examining the role of disulfide bonds in the structure and unfolding of soybean trypsin inhibitor. *Biochemistry*, v. 40, p. 12215–12219. 2001.
- THOMAS, J.C.; ADAMS, D.G.; KEPPE, V.D.; WASMANN, C.C.; BROWN, J.K.; KANOST, M.R.; BOHNERT, H.J. *Manduca sexta* encoded protease inhibitors expressed in *Nicotiana tabacum* provide protection against insects. *Plant Physiol. Biochem.*, v. 33, p. 611–614. 1995.
- TORRES-CASTILLO, J.A.; MONDRAGÓN JACOBO, C.; BLANCO-LABRA, A., Characterization of a highly stable trypsin-like protease inhibitor from the seeds of *Opuntia streptacantha* (*O. streptacantha* Lemaire). *Phytochemistry*, v. 70, p. 1374-1381. 2009.

TRUNG, N.P.; FITCHES, E.; GATEHOUSE, J.A. A fusion protein containing a lepidopteran-specific toxin from the South Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) and snowdrop lectin shows oral toxicity to target insects. BMC Biotechnology, v. 6, p. 1-12. 2006.

VAN DAMME, E.J.M. Plant lectins as part of the plant defense system against insects. In: Schaller, A. (ed.), Induced Plant Resistance to Herbivory. Springer, Dordrecht, The Netherlands, p. 285–307. 2008a.

VAN DAMME, E.J.M.; LANNOO, N.; PEUMANS, W.J. Plant lectins. Advances in Botanical Research, v. 48, p. 107–209. 2008b.

VOLPICELLA, M.; CECI, L.R.; CORDEWENER, J.; AMERICA, T.; GALLERANI, R.; BODE, W.; JONGSMA, M.A.; BEEKWILDER, J. Properties of purified gut trypsin from *Helicover zea*, adapted to proteases inhibitors. J. Biochem., v. 270, p. 10-19. 2003.

WHITMORE, L.; WALLACE, B.A. DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. Nucleic Acids Research. v. 32, Web Server issue DOI: 10.1093/nar/gkh371. 2004.

WILKINS, M.R.; GASTEIGER, E.; BAIROCH, A.; SANCHEZ, J.C.; WILLIAMS, K.L.; APPEL, R.D.; HOCHSTRASSER, D.F. Protein Identification and Analysis Tools in the ExPASy Server in: 2-D Proteome Analysis Protocols. Editor A.J. Link. Humana Press, New Jersey. 1998.

WU, H.C.; LIN, J.Y. The complete amino acid sequence of a Kunitz family trypsin inhibitor from seeds of *Acacia confusa*. J. Biochem., v. 113, p. 258-263. 1993.

YEH, K.W.; LIN, M.I.; TUAN, S.J.; CHEN, Y.M.; LIN, C.Y.; KAO, S.S. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. Plant Cell Rep., v. 16, p. 696–699. 1997.

YOSHIZAKI, L.; TRONCOSO, M.F.; LOPES, J.L.S.; HELLMAN, U.; BELTRAMINI, L.M.; WOLFENSTEIN-TODEL, C. *Calliandra sello* Macbride trypsin inhibitor: isolation, characterization, stability, spectroscopic analyses. Phytochemistry. v. 68, p. 2625–2634. 2007.

ZAKHAROVA, E.; HORVATH, M.P.; GOLDENBERG, D.P. Functional and Structural Roles of the Cys14–Cys38 Disulfide of Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor. J. Mol. Biol., v.382, p. 998–1013. 2008.

ZHAO, J.Z.; ZHAO, K.J.; LU, M.G.; FAN, X.L.; GUO, S.D. Interactions between *Helicoverpa armigera* and transgenic Bt cotton in North China. Sci. Agric. Sin., v. 31, p. 1–6. 1998.

ZHU-SALZMAN, K.; HOIWA, K.; SALZMAN, R.A.; SHADE, R.E.; AHN, J.E. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. Insect Mol. Biol., v. 5, p. 135–145. 2003.