



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA



Gláucia Coelho de Mello

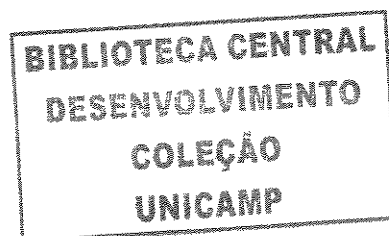
ESTUDO DOS PAPÉIS BIOLÓGICOS DE DOIS INIBIDORES
DE KUNITZ ISOLADOS DE SEMENTES DE *Dimorphandra*
mollis BENTH: ATIVIDADES INSETICIDA E
INFLAMATÓRIA

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Gláucia Coelho de Mello
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do
título de doutor em Biologia Funcional e Molecular –
Área de Bioquímica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lígia Rodrigues Macedo

CAMPINAS – SP
2005



INSTITUIÇÃO	UNICAMP
CHAMADA	T/UNICAMP
	M489e
EX	
OMBO BC	66218
NOV	16-86-05
C	☐
D	☒
RECO	11-00
ATA	0911-05
CPD	

BIB ID: 373246

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

M489e

Mello, Gláucia Coelho de

Estudo dos papéis biológicos de dois inibidores de Kunitz isolados de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth: atividades inseticida e inflamatória / Gláucia Coelho de Mello. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadora: Maria Lígia Rodrigues Macedo.

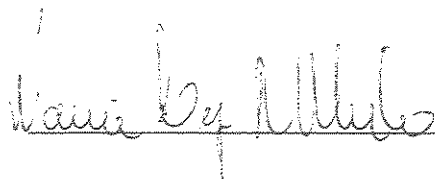
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. *Dimorphandra mollis*. 3. Sementes. I. Maria Lígia Rodrigues Macedo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 04 de março de 2005.

BANCA EXAMINADORA:

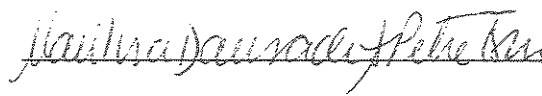
Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo



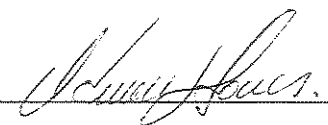
Profa. Dra. Maria das Graças Machado Freire



Profa. Dra. Marilvia Dansa de Alencar Petretski



Profa. Dra. Valdirene Moreira Gomes



Prof. Dr. Ladaslav Sodek



Prof. Dr. Sérgio Marangoni

Profa. Dr. Tomomasa Yano

200524919

Ao meu querido e amado Adriano pelo amor, carinho e por toda a paciência e compreensão sempre presente.

Aos meus queridos pais, Maurício e Momoko, que nunca mediram esforços em toda minha vida, para que eu atingisse os meus objetivos e conquistas, sendo seu amor incondicional, o afago de meus anseios, angústias e temores.

Aos meus irmãos, Márcia e Ricardo, tão presentes e importantes quanto meus pais. Amo todos vocês!

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Maria Ligia Rodrigues Macedo, por orientar com tanto empenho, ensinar com dedicação, apoiar e exigir nas horas certas e incertas, enfim por acreditar em mim e permitir que eu vencesse mais uma etapa da minha vida, engrandecendo o meu desenvolvimento profissional. Também agradeço a “Ligia” pela amizade, confiança, sinceridade, conselhos e acima de tudo por contribuir muito no meu amadurecimento pessoal. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni e ao Prof. Dr. José Camillo Novello pela amizade e apoio; por terem me recebido em seu laboratório colaborando assim com meu de crescimento científico.

Aos professores Drs. Valdirene Moreira Gomes, Marilvia Dansa de Alencar Petretski e Ladaslav Sodek, por participarem da banca examinadora desta tese, valorizando assim o meu trabalho.

À Profa. Dra. Maria das Graças Machado Freire, primeiramente por participar da minha banca examinadora; pela valiosa ajuda durante grande parte da realização deste trabalho; pela amizade e muitos bons conselhos que me ajudaram a encontrar soluções.

À Prof. Dr. Tomomasa Yano e Prof. Dr. Stephen Hyslop pela participação no exame de qualificação onde puderam apresentar valiosas sugestões e observações importantes para cuidadosa revisão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pela sua colaboração e seriedade nos ensinamentos farmacológicos que enriqueceram o meu trabalho.

À Ivani de Souza e Enilton Camargo pela amizade, companheirismo, conhecimentos divididos e pela ajuda incansável nos experimentos farmacológicos.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB/UFMS) pela amizade e colaboração nos experimentos com insetos que tornaram meu trabalho mais belo.

Aos demais professores do Departamento de Bioquímica do Instituto de Biologia/UNICAMP, pelos ensinamentos e cooperação.

Aos companheiros “Laquipenses” pelos anos já saudosos de alegre convívio. Em especial à colega e amiga Mirela Coelho que melhor conheci e aprendi a respeitar nesses últimos anos, pelo companheirismo e apoio mesmo nos momentos conturbados.

Ao Paulo Baldasso pelo apoio técnico constante, amizade e muitos “galhos quebrados”.

A todos que, por motivos alheios à minha vontade, não me compreenderam ou não se fizeram compreender, por terem me ensinado o verdadeiro sentido da paciência, colaborando muito com meu aprendizado sobre a vida.

À CAPES e FAEP-UNICAMP pelo apoio financeiro

ÍNDICE

ABREVIACÕES	viii
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
I. INTRODUÇÃO	01
1. <u>INIBIDORES: DISTRIBUIÇÃO, OCORRÊNCIA E CARACTERÍSTICAS</u>	02
1. Distribuição e ocorrência	02
2. Características gerais dos inibidores	02
3. Estabilidade nos inibidores de serinoproteinases	04
4. Papéis biológicos dos inibidores	06
2. <u>A MULTIFUNCIONALIDADE DOS INIBIDORES EM PLANTAS</u>	07
1. Inibidores como proteínas de reserva e reguladores endógenos	07
2. Inibidores com ação fungicida e antimicrobiana	09
3. Inibidores como agente inseticida	10
4. Outras proteínas vegetais na defesa vegetal	12
3. <u>INSETOS</u>	14
1. Danos causados por insetos na produção de alimentos	14
2. Proteinases e Morfofisiologia da Digestão de Insetos	16
4. <u>PLANTA</u>	20
1. Mecanismo de Defesa Vegetal	20
2. A Biotecnologia de Plantas	22
5. <u>APLICAÇÃO DOS INIBIDORES NA ÁREA FARMACOLÓGICA</u>	26
1. Coagulação sanguínea e participação dos inibidores	26
2. Inflamação e os inibidores de serinoproteinases	29
6. <u>OS INIBIDORES ISOLADOS DE SEMENTES DE <i>D. mollis</i></u>	34
II. OBJETIVOS	35
III. MATERIAIS	36
1. Material biológico	36
2. Regentes	41
IV. MÉTODOS	43
1. Caracterização físico-química dos inibidores isolados de sementes de <i>D. mollis</i>	43
1.1. Efeito da temperatura na atividade inibitória	44
1.2. Efeito do pH na atividade inibitória	44
1.3. Efeito do DTT na atividade dos inibidores DMTI-I e DMTI-II	44

1.4. Efeito da uréia na atividade inibitória de DMTI-I e DMTI-II	45
1.5. Efeito de cloreto de guanidina na atividade inibitória	45
1.6. Dicroísmo circular	45
1.7. Calorimetria	46
1.8. Inibição da tripsina bovina	46
2. Estudo da atividade inseticida dos inibidores isolados de sementes de <i>D. mollis</i>	47
2.1. Ensaio <i>in vitro</i>	47
2.2. Ensaio <i>in vivo</i>	49
3. Estudo da ação farmacológica dos inibidores de <i>Dimorphandra mollis</i>	52
3.1. Efeito de DMTI-I e DMTI-II na indução de edema de pata de rato	52
3.2. Estudo do mecanismo de ação de DMTI-I na indução de edema	52
3.3. Efeito de DMTI-I na desgranulação <i>in vitro</i> de mastócitos peritoneais de ratos	53
3.4. Edema de pata de ratos tratados com capsaicina	54
3.5. Edema de pata de rato induzido por DMTI-I e liberação de bradicinina	55
3.6. Análise estatística	55
V. RESULTADOS	56
1. Caracterização físico-química dos inibidores isolados de sementes de <i>D. mollis</i>	56
1.1. Efeito da temperatura na atividade inibitória	56
1.2. Efeito do pH na atividade inibitória	57
1.3. Efeito do DTT na atividade dos inibidores DMTI-I e DMTI-II	58
1.4. Efeito da uréia na atividade inibitória de DMTI-I e DMTI-II	60
1.5. Efeito de cloreto de guanidina na atividade inibitória	61
1.6. Dicroísmo circular	62
1.7. Calorimetria	65
2. Estudo da atividade inseticida dos inibidores isolados de sementes de <i>D. mollis</i>	67
2.1. Ensaio <i>in vitro</i>	67
2.2. Ensaio <i>in vivo</i>	73
3. Estudo da ação farmacológica dos inibidores de <i>Dimorphandra mollis</i>	93
3.1. Efeito de DMTI-I e DMTI-II na indução de edema de pata de rato	93
3.2. Estudo do mecanismo de ação de DMTI-I na indução de edema	97
3.3. Efeito de DMTI-I na desgranulação <i>in vitro</i> de mastócitos peritoneais de ratos	100
3.4. Edema de pata de ratos tratados com capsaicina	101
3.5. Edema de pata de rato induzido por DMTI-I e liberação de bradicinina	102
VI. DISCUSSÃO	104
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
APÊNDICE 1: Purification and Characterization of a New Trypsin Inhibitor from <i>D. mollis</i>	130
APÊNDICE 2: Effect of a trypsin inhibitor from <i>D. mollis</i> seeds on the development of <i>Callosobruchus maculatus</i>	139

ABREVIACÕES

AE	– atividade específica
BAPNA	– N-benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida
BTPNA	– N-benzoil-L-tirosina-p-nitroanilida
CD	– dicroísmo circular
DEAE	– dietilaminoetil
DMSO	– dimetilsulfoxido
DMTI	– inibidor de tripsina de <i>Dimorphandra mollis</i> (Macedo <i>et al.</i> , 2000)
DMTI-II	– inibidor de tripsina II de <i>Dimorphandra mollis</i> (Mello <i>et al.</i> , 2001)
DSC	– calorimetria de varredura diferencial
DTT	– ditioneitol
FPLC	– “Fast Protein Liquid Chromatography”
GdmCl	– cloreto de guanidina
HPLC	– High Pressure Liquid Chromatography”
IM	– intestino médio
kDa	– kilodalton
Ki	– constante de inibição
PAGE	– eletroforese em gel de poliacrilamida
PSA	– persulfato de amônio
SDS	– duodecil sulfato de sódio
TEMED	– N-N-N’-N’-tetrametilenodiamina
TFE	– 2,2,2 trifluororetanol
TLCK	– N-p-Tosyl-L-lisina clorometril cetona
Tris	– hidroximetil aminometano

ABREVIACÕES PARA AMINOÁCIDOS

Aminoácidos	Abreviação (3 letras)	Símbolo
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Ácido glutâmico	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histina	Hys	H
Isoleucina	Iso	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

Nomenclatura IUPAC

RESUMO

Os inibidores de proteinases desempenham as mais variadas funções biológicas. Em plantas, eles podem estar envolvidos no mecanismo de defesa vegetal contra predadores e doenças. Devido à habilidade dessas moléculas protéicas bloquearem enzimas, os inibidores também podem ser usados como ferramentas no estudo de processos bioquímicos relacionados a patologias, tais como a inflamação, hemorragia e até mesmo o câncer.

Neste trabalho, a caracterização físico-química e o estudo dos papéis biológicos de dois inibidores isolados e purificados de sementes de *Dimorphandra mollis*, DMTI (Macedo *et al.*, 2000) e DMTI-II (Mello *et al.*, 2001) foram realizadas com o objetivo de melhor conhecer essas moléculas. DMTI (20 kDa) e DMTI-II (23kDa) são inibidores de tripsina pertencentes à família de Kunitz. A estabilidade da atividade inibitória de DMTI e DMTI-II foi analisada e comparada. DMTI e DMTI-II perde, respectivamente, cerca de 20% e 40% da atividade quando incubados a 60 °C por 20 minutos. Entretanto, a atividade de ambos não foi afetada por diferentes condições de pH, concentrações crescentes dos agentes redutores DTT e uréia. No entanto, a atividade DMTI-II sofreu um decréscimo de 50% quando incubado com cloreto de guanidina. A diferença da estabilidade dos inibidores levou a investigação da estrutura protéica de ambos; DMTI e DMTI-II foram submetidos a análises de dicroísmo circular e calorimetria.

A ação inseticida de DMTI-II e DMTI sobre os lepidópteros *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*, foram analisadas através de ensaios *in vitro* e *in vivo*. Tanto DMTI-II quanto DMTI, quando incorporados ao nível de 2% na dieta artificial dos insetos, não se mostraram agentes inseticidas potenciais contra essas duas espécies. Estes resultados não descartam a utilização dos inibidores de *D. mollis* na biotecnologia vegetal contra outras espécies de insetos, apenas ajudam a esclarecer as características como agentes inseticidas biológicos.

Quando estudado o envolvimento de DMTI-II e DMTI na resposta inflamatória utilizando o edema de pata em ratos como modelo experimental, os resultados mostraram que doses crescentes de DMTI-II geram uma curva dose-dependente sendo que a resposta máxima ocorre 30 minutos após a sua injeção subplantar, o que sugeriu a ação do inibidor

na liberação de histamina e serotonina, que são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular. A elucidação do mecanismo de ação de DMTI-II foi estudada através da utilização de drogas antiinflamatórias, como a mepiramina e ciproheptadina; sendo esta última a que melhor inibiu a ação de DMTI-II na indução do edema. Concomitantemente, a sua ação na liberação de bradicinina também pode estar ocorrendo, pois o pré-tratamento com o antagonista de receptores B_2 , HOE 140, reduziu cerca de 79% do edema induzido por DMTI-II.

ABSTRACT

Proteinase inhibitors have a wide range of biological functions. In plants, they are part of the defense mechanism against predators and diseases. As they can block enzymes, inhibitors are useful tools in the study of biochemical processes related to pathologies, such as inflammation, hemorrhage and even cancer.

This paper aims at assessing the physical-chemical features and the biological functions of two inhibitors isolated and purified from *Dimorphandra mollis* seeds, DMTI (Macedo et al., 2000) and DMTI-II (Mello et al., 2001). DMTI (20 kDa) and DMTI-II (23 kDa) are trypsin inhibitors from the Kunitz family. The stability of the inhibitory activity of DMTI and that of DMTI-II were analyzed and compared to each other. DMTI and DMTI-II lost 20% and 40%, respectively, of their activities when incubated at 60°C for 20 minutes. However, neither inhibitory activity was sensitive to pH above the 2.0-10.0 range, reducing DTT agents and urea. On the other hand, DMTI-II activity was reduced by 50% when incubated with guanidine hydrochloride. The difference of stability between the inhibitors led to further investigation of their protein structure; DMTI and DMTI-II structures were analyzed by circular dichroism (CD) and differential scanning calorimetry (DSC).

The effectiveness of DMTI-II and DMTI as insecticide in Lepidoptera insects, *Anagasta kuehniella* and *Corcyra cephalonica*, was analyzed in vitro and in vivo assays. Neither DMTI-II nor DMTI, when incorporated into artificial diet at 2%, were active as insecticide agents against these two species. Nevertheless, these results do not discard the use of inhibitors from *D. mollis* in plant biotechnology against other species of insects; they just help us to understand how they work as biological agents.

When studying DMTI and DMTI-II participation in inflammatory response in the rat paw edema experimental model, the results showed that increased doses of DMTI-II induced a dose-dependent curve, and maximum response occurred 30 min after sub-plantar injection, which indicated that the inhibitor is active in the release of histamine and serotonin, which are responsible for the increase of vascular permeability.

The elucidation of DMTI-II action mechanism was studied by using anti-inflammatory drugs, such as mepyramine and cyproheptadine, the latter the most effective against DMTI-II effects in edema induction. At the same time, it may also be active in bradykinin release as the pre-treatment with B2 receptor antagonist HOE 140 reduced the DMTI-II induced edema by nearly 79%.

I. INTRODUÇÃO

Os inibidores de natureza protéica são capazes de produzir complexos estequiométricos com enzimas e, assim, inibir competitivamente as atividades catalíticas destas (Valueva & Mosolov, 1999a). Eles constituem uma das muitas famílias de macromoléculas que realizam com êxito as mais variadas funções biológicas. Seus estudos, atualmente vêm sendo realizados extensivamente, e os dados já obtidos revelam que o complexo inibidor-enzima é um excelente modelo para investigar os princípios bioquímicos e biofísicos fundamentais da interação proteína-proteína (Yang *et al.*, 1998).

A princípio, a busca pelo provável significado nutricional dessas moléculas desencadeou todo o interesse na pesquisa, pois em alguns casos a presença destas em sementes de leguminosas e grãos de cereais poderiam afetar a qualidade nutritiva dos seus derivados. O início dos estudos sobre inibidores de protease deu-se em 1938 quando Read & Hass observaram que um extrato aquoso de farinha de soja inibia a capacidade da tripsina de dissolver gelatina. Assim, em 1944, Bowman, Ham e Sandstedt purificaram a fração do extrato responsável por este efeito (Gatehouse, 1983).

O auge dos estudos deu-se com o isolamento e caracterização parcial de um inibidor de protease de soja (*Glycine max*) por Kunitz, em 1946. Em 1947, o primeiro estudo sistemático de inibidores de proteases de origem vegetal foi feito por Borchers & Ackerson. Entretanto, nestes primeiros trabalhos, as pesquisas eram restritas principalmente à inibição de tripsina e, em menor intensidade, à inibição de quimotripsina.

Desde então, a inibição destas duas enzimas vem sendo muito investigada (Weder, 1981). Além das enzimas serínicas, proteinases de outras classes podem sofrer a ação de inibidores. Os mais estudados e melhores caracterizados são aqueles que inibem as proteinases cisteínicas e serínicas (Ryan, 1990). Aqui, vamos nos deter aos inibidores de proteinases serínicas.

1. INIBIDORES: DISTRIBUIÇÃO, OCORRÊNCIA E CARACTERÍSTICAS.

1. Distribuição e ocorrência

Estas macromoléculas estão amplamente distribuídas em animais, microorganismos e principalmente em plantas (Richardson, 1991; Birk, 1994), onde são encontrados inibidores para quase todos os tipos de enzimas proteolíticas (Sampaio *et al.*, 1996). Os inibidores concentram-se principalmente nos órgãos vegetais reprodutivos e de reserva, tais como sementes e tubérculos (Ryan, 1981). Entretanto, já foram detectados e isolados em folhas, frutos, raízes e vagens (Xavier-Filho, 1992; Cunningham & Volenec, 1996).

Em relação à distribuição dos inibidores em plantas, sabe-se que as angiospermas dicotiledôneas englobam o maior número de espécies contendo estas macromoléculas, merecendo destaque as famílias Leguminosae e Solanaceae; enquanto que entre as monocotiledôneas, os inibidores estão mais amplamente distribuídos na família Gramineae (Ryan, 1981). Apesar desta ocorrência generalizada, a quantidade de inibidores é extremamente variável, mesmo entre espécies do mesmo gênero, e até mesmo entre variedades de uma mesma espécie (Xavier-Filho *et al.*, 1989).

2. Características gerais dos inibidores

Eles são moléculas, geralmente, de baixa massa molecular, sendo a diferenciação dada pela especificidade e mecanismo de ação. A especificidade é uma característica marcante no estudo das interações entre enzima e inibidor. Ela é determinada pela termodinâmica das interações envolvidas e pela estrutura nativa do inibidor e da enzima (Macedo & Xavier-Filho, 1993). A massa molecular dessas moléculas varia entre 6 e 50 kDa e mais freqüentemente entre 8 a 25 kDa (Richardson, 1991).

Os inibidores vegetais apresentam uma classificação sendo que estão divididos em famílias Kunitz, Bowman-Birk, Batata I, Batata II, Abóbora, Superfamília Cereal, Ragi 1-

2, Taumatina e PR-proteínas (Richardson, 1991). Dentre elas destacamos as seguintes famílias de inibidores:

- a) Inibidores da família Kunitz: proteínas que apresentam massa molecular entre 18 e 24 kDa; com uma ou duas cadeias polipeptídicas; baixo conteúdo de cisteína, geralmente com quatro resíduos de cisteína que formam duas pontes dissulfeto, dando estabilidade à estrutura protéica (Richardson, 1991). Os inibidores desta família apresentam um único sítio reativo que lhes permite inibir somente uma molécula de enzima, formando um complexo 1:1 (inibidor:enzima). Além de inibir tripsina, muitos inibem fracamente a quimotripsina, como o inibidor isolado de sementes de *Canavalia lineata* (Terada *et al.*, 1994). Podem também ser ativos contra outras classes de enzimas diferentes das serinoproteinases, como um dos três inibidores isolados de *Solanum tuberosum*, que mostrou ser eficiente sobre as proteinases cisteínicas, tais como papaína e bromelaína, apesar da homologia com esta família (Valueva *et al.*, 1997).
- b) Inibidores da família Bowman-Birk: são proteínas com massa molecular entre 8 e 10 kDa; com alto conteúdo de cisteína podendo apresentar 7 pontes dissulfeto, que conferem grande estabilidade à sua estrutura (Richardson, 1991). Os inibidores desta família recebem a denominação de “double-head” (dupla-cabeça) por apresentarem dois sítios reativos independentes, capazes de formar complexos com diferentes proteinases (Birk, 1994) e os tornam capazes também de inibir simultaneamente duas moléculas de tripsina ou ainda uma molécula de tripsina e outra de quimotripsina, formando assim, complexos 1:2 (inibidor:tripsina:tripsina) e 1:1:1 (inibidor:tripsina:quimotripsina), respectivamente (Prakash *et al.* 1996).
- c) Inibidores da família Abóbora: são os menores inibidores de serinoproteinases, apresentando massa molecular de 4 kDa a 7 kDa; 3 pontes dissulfeto. Sendo isolados de sementes pertencentes à família Cucurbitaceae (Richardson, 1991) Por atuarem sobre tripsina e algumas enzimas da cascata de coagulação sangüínea aparentemente são forte candidatos a serem utilizados pela indústria farmacêutica como drogas, com efeito, sobre doenças cardiovasculares (Hayashi *et al.*, 1994).

- d) Família Batata I: os inibidores desta família apresentam uma massa molecular entre 8 e 10 kDa; uma única cadeia polipeptídica e somente uma ponte dissulfeto. Inibem fortemente quimotripsina, subtilisina e em menor grau tripsina (Richardson, 1991; Hejgaard *et al.*, 1994).
- e) Inibidores da família Batata II: apresentam massa molecular aparente de 12 kDa; alto conteúdo de cisteína (aproximadamente 6 pontes dissulfeto), sendo o primeiro desta família completamente seqüenciado, o inibidor de tripsina presente no pericarpo de berinjela (*Solanum melongena*). São também encontrados em batatas, folhas de tomateiro, mostardas e em outros vegetais, mas não há registros da presença destes em sementes (Richardson, 1991; Antcheva *et al.*, 1996). Inibem principalmente quimotripsina, tripsina, sendo melhores inibidores para a subtilisina (Plunkett *et al.*, 1982).

3. Estabilidade nos inibidores de serinoproteinases

Os inibidores de proteinases são considerados moléculas estáveis, podendo apresentar resistência ao calor, às variações de temperatura e de pH, e à proteólise por proteinases diferentes daquelas não inibidas. Esta estabilidade tem sido atribuída em parte às pontes dissulfeto e outras interações não covalentes que contribuem significativamente para a estabilidade dos mesmos (Belitz & Weder, 1990).

Particularmente, quando comparamos as duas principais famílias de inibidores de serinoproteinases, observamos que inibidores do tipo Kunitz e do tipo Bowman-Birk diferem-se, além da massa molecular, no conteúdo de ligações dissulfeto e na estabilidade frente a agentes desnaturantes (Ramasarma *et al.*, 1995).

Normalmente, a grande estabilidade dos inibidores pertencentes à família de Bowman-Birk é atribuída, na maioria das vezes, à presença do alto conteúdo de pontes dissulfeto. Isso justifica a utilização de agentes redutores para monitorar a atividade inibitória e mudanças conformacionais, que são analisadas por métodos fluorimétricos no estudo de estabilidade e inibidores (Lehle *et al.*, 1996; Ramasarma *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 2000).

Entretanto, alguns inibidores tipo Kunitz mostram ser estáveis quando submetidos à ação de agentes desnaturantes, sejam eles físicos ou químicos. Estas observações sugerem que a estabilidade dos inibidores desta família pode não estar relacionada com a presença de pontes dissulfeto, pois estes apresentam geralmente até duas ligações deste tipo. Por exemplo, o inibidor de quimotripsina presente em sementes de *Schizolobium parahyba* mostrou ser estável quando aquecido até 75°C, por 1 hora, não ocorrendo a perda da atividade inibitória. Acima desta temperatura, a atividade inibitória diminuiu, sendo que à 95°C sua atividade foi completamente anulada em 5 horas. Logo, este inibidor é uma proteína relativamente termoestável apesar de sua molécula conter apenas duas pontes dissulfeto (Souza *et al.*, 1995).

Batista *et al.* (1996) demonstraram que atividade inibitória de ECTI (um inibidor de tripsina presente em sementes de *Enterolobium contortisiliquum*) também foi mantida até à temperatura de 60°C. Macedo *et al.* (2003) relataram que o inibidor PDTI, presente em sementes de *Peltophorum dubium*, manteve cerca de 80% da sua atividade inibitória após ter sido incubado por 30 minutos na temperatura de 80 °C.

Além da temperatura, as variações de pH são capazes de interferir o estado iônico das cadeias laterais de aminoácidos, alterando, portanto, a distribuição de cargas e a existência de pontes de hidrogênio, que contribuem para a estabilidade das proteínas. A estabilidade de inibidores em diferentes condições de pH é fato já registrado na literatura (Richardson, 1991) e também já observado por Batista *et al.* (1996) quando estudaram a estrutura primária de um inibidor do tipo Kunitz presente em sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, o ECTI. A pré-incubação de ECTI na faixa de pH entre 2,0-12,0 mostrou não afetar sua atividade inibitória.

Já ação de um agente redutor, como o ditioneitol (DTT), sobre as pontes dissulfeto presentes no inibidor pode causar danos à sua integridade, e provavelmente, afetar a atividade antitriptica do mesmo, dependendo da localização dessas pontes em relação ao seu sítio reativo. O inibidor de *P. dubium*, o PDTI, sofreu uma perda de cerca de 40% e 60% na sua atividade quando incubado com 10 mM, após, respectivamente, 45 e 120 minutos. Quando o mesmo inibidor foi submetido à concentração de 100 mM de DTT,

sua atividade sofreu um decréscimo de 90% a partir de 45 minutos de incubação (Macedo *et al.*, 2003).

O estudo da estabilidade de inibidores de serinoproteinases e de outras proteínas representa fundamental importância quando o objetivo é esclarecer e entender melhor a atuação destes em sistemas biológicos. Conhecer a estruturas de uma proteína ou de um inibidor e determinar seu comportamento frente às condições diferentes daquelas impostas pelo seu meio natural, permitiria melhor compreender os mecanismos de ação dessas moléculas protéicas.

4. Papéis biológicos dos inibidores

Em plantas, por exemplo, inibidores de proteinases podem atuar como proteínas de reserva (Mosolov, 1995; Valueva & Mosolov, 1999a) ou podem estar envolvidos no mecanismo de defesa vegetal contra pestes e doenças causados por patógenos (Jongsma & Boulter, 1997; Shewry & Lucas, 1997; Valueva & Mosolov, 1999b). Além dessas suas funções biológicas naturais, os inibidores podem ser utilizados como ferramentas alternativas no tratamento de patologias humanas tais como inflamação (Oliva *et al.*, 2000) e câncer (DeClerck & Imren, 1994; Kennedy, 1998).

A seguir, detalharemos o papel de inibidores em plantas, destacando sua ação inseticida bem como seu papel na área farmacológica.

2. A MULTIFUNCIONALIDADE DOS INIBIDORES EM PLANTAS

Como vimos, os inibidores apresentam uma ampla distribuição em plantas, além do que, quando presentes, podem apresentar-se em alto conteúdo principalmente em sementes. Isso vem despertando a atenção de pesquisadores que buscam elucidar os papéis biológicos que estas proteínas possam executar nos vegetais.

Os inibidores acumulam-se durante a maturação da semente ou do tubérculo, sugerindo que eles facilitem o estoque de proteínas de reserva por atenuarem a atividade de proteases. Tem-se discutido que este acúmulo é um indicativo da principal função dos inibidores, a de defesa, pois a manutenção da integridade destes órgãos é essencial para a sobrevivência das espécies, ou seja, a presença de inibidores nas sementes poderia protegê-las de herbívoros durante o processo de embriogênese ou na maturação. Além disso, estudos sobre a regulação da transcrição de inibidores de proteinases em tecidos vegetais específicos sugerem que eles tenham funções endógenas na planta (Koiwa *et al.*, 1997).

Segundo Valueva & Mosolov (1999b), são consideradas três principais funções fisiológicas dos inibidores de proteinases em plantas: proteínas de reserva; reguladores endógenos da atividade de proteinases e componentes que participam do mecanismo de defesa de plantas contra microorganismos e insetos.

1. Inibidores como proteínas de reserva e reguladores endógenos

A possível função de alguns inibidores como proteína de reserva tem sido caracterizada em vários estudos. Alguns mais recentes têm mostrado que a relação de proteínas de reserva e inibidores é mais complexa. Análises das estruturas primárias da proteína de reserva 2S albumina e de um inibidor bifuncional (que inibe tripsina e α -amilase) presentes nas sementes de *Ricinus communis*, mostraram que ambas são similares. Inibidores de tripsina de *Brassica napus* e de duas espécies de mostarda (*Sinapis arvensis* e *Brassica nigra*) pertencem à mesma família da proteína de reserva 2S albumina de Cruciferae, que é a família Napin. As moléculas desta família (incluindo os inibidores de proteinase) consistem de duas cadeias polipeptídicas, uma de 4,5 kDa e

outra de 10 kDa, ligadas por pontes dissulfeto e são formadas por processamento proteolítico de um precursor protéico com massa molecular de 20 kDa. Têm-se notado também que proteínas desta família apresentam propriedade de inibição relativamente fraca (Mosolov *et al.*, 2001).

Quanto à utilização dos inibidores como fonte de reserva, segundo Valueva & Mosolov (1999), os inibidores de proteinases podem ser considerados como uma reserva especial de enxofre e nitrogênio, devido à composição de seus aminoácidos, ditos sulfurados, que serão degradados e reutilizados na construção de outras proteínas, contribuindo para o melhor desenvolvimento da planta.

Além da possibilidade dos inibidores atuarem como proteínas de reserva, eles podem regular a atividade de proteases endógenas envolvidas na degradação de proteínas, durante o processo de germinação, de acordo com as necessidades da planta, pois estas são responsáveis pela ativação ou não de certas vias metabólicas (Mosolov, 1995).

As plantas parecem utilizar principalmente cisteinoproteinases na mobilização de proteínas de reserva, bem como na degradação protéica, porém a presença de serinoproteinases não está descartada. Em 1965, Shain & Mayer mostraram a participação de serinoproteinases e de seus inibidores no controle endógeno da atividade proteolítica. Eles isolaram inibidores de proteinases em sementes de alface que inibiam a atividade de uma enzima proteolítica endógena; essa enzima foi, posteriormente, qualificada como semelhante à tripsina em especificidade. Verificaram que à medida que a germinação dessas sementes evoluía, os inibidores iam desaparecendo e a atividade enzimática aumentando, sugerindo que a enzima preexistiria na semente dormente, complexada com o inibidor, ou alternativamente, preexistiria como zimogênio sendo, nesse caso, ativada autocataliticamente ou por meio de outras enzimas (Valueva & Mosolov, 1999b).

Segundo Richardson (1991), há evidências de que inibidores do tipo Kunitz presentes em cereais parecem ser importantes na regulação da atividade de uma α -amilase específica que mobiliza o amido durante a germinação das sementes.

Há também a probabilidade de inibidores de proteinase apresentarem papel importante em situações de estresse pela qual a planta é submetida no ambiente. Em *Raphanus sativus* e *Brassica napus* foi observado, a indução de uma proteína de 22 kDa

homóloga ao inibidor SBTI, quando essas espécies estavam sob condição de alta concentração salina e estresse hídrico. A função destas proteínas ainda não está clara, mas supõe-se que elas regulariam a atividade endógena de proteinases, pois é sabido que em situação de estresse ocorre freqüentemente um aumento da atividade proteolítica (*apud* Mosolov *et al.*, 2001).

2. Inibidores com ação fungicida e antimicrobiana

Em 1976, Mosolov *et al.* demonstraram a ação de inibidores presentes em sementes de feijão comum, feijão-de-lima e soja sobre o fungo *Fusarium solani*. Em 1994, Lorito *et al.* relataram a purificação de um inibidor de tripsina e quimotripsina presentes em folhas de *Brassica oleracea* que apresentava ação antifúngica contra os fungos *Botrytis cinerea* e *Fusarium solani* que não são predadores específicos desta espécie de couve. Inibições dos esporos germinativos e do tubo de elongação foram observados nas duas espécies, juntamente com o acúmulo de exsudato amorfo ao redor das micelas. Este fato sugeriu que possivelmente os inibidores estariam bloqueando a síntese de quitina, um polissacarídeo presente na parede celular, debilitando as hifas. O mesmo inibidor foi testado contra o fungo *Alternaria brassicicola*, um patógeno específico cujo desenvolvimento não foi afetado.

Blanco-Labra *et al.* (1995) também demonstraram que um inibidor de tripsina de milho de 12 kDa é capaz de diminuir a atividade enzimática de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus*. Essas duas espécies de fungo, principalmente a segunda, causam sérios problemas durante a armazenagem de diferentes tipos de gramíneas. Os resultados sugerem a possibilidade de utilização destes inibidores contra o ataque de microorganismos fitopatogênicos.

Em 2000, Giudici *et al.* detectaram e purificaram uma proteína com forte atividade antifúngica em flores férteis de girassol (*Helianthus annuus*), uma espécie pertencente à família Asteraceae. Após o processo de caracterização desta proteína, ficou claro que se tratava de um inibidor de tripsina, o primeiro isolado de flores com esta atividade, que foi chamado de SAP16. Este inibidor reduziu a germinação do fungo *Sclerotinia*

sclerotiorum, que é responsável por perdas na produção agrícolas de cerca de 400 espécies de plantas, incluindo o *H. annuus*. Entretanto, os pesquisadores demonstraram que a ação de SAP16 sobre a da germinação dos esporos de *S. sclerotiorum* não é devida à sua propriedade de inibir alguma proteinase necessária ao processo germinativo. Provavelmente, a ação do inibidor seja diretamente na membrana do fungo através de interações eletrostáticas entre SAP16 e os fosfolipídios presentes na membrana. Isto se deve ao fato de que quando eles analisaram o efeito de SAP16 na presença de ácido fosfatídico (PA), um fosfolipídio aniônico constituinte de membranas, eles observaram que o PA foi capaz de neutralizar a inibição da germinação causada por SAP16, sugerindo que a proteína reage com o ácido fosfatídico em vez de se ligar às membranas do fungo.

3. Inibidores como agente inseticida

No sistema de co-evolução da interação planta-inseto, as plantas são capazes de sintetizar uma gama de moléculas para defendê-las contra o ataque de insetos. Os inibidores ativos contra as enzimas proteolíticas de insetos estão entre essas moléculas (De Leo *et al.* 2001).

O provável papel dos inibidores na defesa vegetal foi investigado já em 1947, quando Mickel e Standish observaram que as larvas de certos insetos não eram capazes de se desenvolverem normalmente sobre produtos de soja. Em 1954, foi mostrado por Lipke *et al.* que os inibidores de tripsina presentes na soja eram tóxicos as larvas de *Tribolium confusum*. Seguindo estes primeiros estudos, houve então vários exemplos de inibidores ativos contra certas espécies de insetos, tanto em ensaios *in vitro* com proteases digestivas quanto em bioensaios de alimentação artificial (Lawrence & Koundal, 2002).

Os ensaios de inibição *in vitro* são utilizados para determinar o efeito destas macromoléculas sobre as proteases intestinais do inseto, avaliando assim seu potencial em inibir o desenvolvimento do mesmo, quando ingeridas (Broadway & Duffey, 1986; Christeller *et al.*, 1992). Entretanto, alguns inibidores que mostram ser efetivos sobre as enzimas digestivas de insetos podem apresentar nenhum ou pequeno efeito sobre o desenvolvimento destes quando incorporados à sua dieta (Broadway, 1995; Jongsma *et*

al., 1995). A qualidade da dieta artificial é muito importante nestes ensaios, pois a adição de aminoácidos essenciais pode muitas vezes regular ou até mesmo anular o efeito prejudicial do inibidor em estudo (Broadway, 1997).

A associação enzima-inibidor pode bloquear uma determinada proteólise, mas não elimina a digestão proteolítica no intestino médio dos insetos. Possivelmente um fator mais importante seja a hipersecreção de outras proteases para compensar a baixa atividade proteolítica causada pela presença dos inibidores. Esta produção excessiva é considerada nociva, por interferir em outras vias metabólicas, limitando a disponibilidade de aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas, acarretando redução no crescimento e no desenvolvimento do inseto, podendo, talvez, conduzi-lo à morte (Gatehouse *et al.*, 1993; Jongsma & Bolter, 1997). Sabe-se também que a inibição direta das enzimas digestivas não é o principal mecanismo de ação dos inibidores, pois a ingestão crônica destes ocasiona ações adversas no organismo alvo (Broadway, 1995), tais como o comprometimento do balanço hídrico e a regulação da metamorfose (Boulter, 1993).

De acordo com Heath *et al.* (1997), foram descritos três tipos de ação dos inibidores sobre os insetos. Na primeira, o inibidor causaria um retardamento severo no desenvolvimento do inseto alvo sem diminuição da atividade proteolítica das enzimas digestivas, mas acarretando uma hiperprodução nociva de proteases. Na segunda, o inibidor não apresentaria nenhum efeito sobre o desenvolvimento do inseto; pois este estaria compensando a inibição de uma enzima pela indução de uma nova proteinase; este é o caso de insetos pertencentes à ordem Lepidoptera, onde a tripsina inibida foi substituída por uma nova tripsina que era insensível ao inibidor da dieta (Broadway, 1995; Jongsma *et al.*, 1995). E finalmente, a terceira ação seria a combinação de um drástico atraso no desenvolvimento acompanhado da diminuição da atividade proteolítica do inseto, sendo esta, portanto, a representante do sucesso dos inibidores sobre insetos.

Contudo a potencialidade de um inibidor depende basicamente: (1) da sua compatibilidade estrutural com a proteinase do organismo alvo; (2) de condições fisiológicas internas do intestino, por exemplo, o pH; e (3) da qualidade da dieta ingerida pelo inseto predador, principalmente quanto à qualidade e quantidade de proteínas

(Broadway, 1995). Por esta razão, apesar de que inibidores de serinoproteínases, em geral, poderem contribuir na defesa de plantas contra a invasão de organismo, sua eficácia dependerá de todos esses fatores. Broadway (1997) considerou que os insetos podem possuir mecanismos específicos para a regulação de cada proteinase, controlada por um peptídeo monitor, que poderia ser responsável pela indução de proteinases sensíveis ou não ao inibidor ingerido.

Atuais pesquisas nessa área têm proposto a utilização de múltiplos inibidores com a finalidade de agir contra todas as proteinases intestinais. Esta combinação aumentaria a estabilidade destes no intestino, prevenindo a degradação pelas proteinases presentes, e às vezes prejudicando a digestão de proteínas ingeridas na dieta (Harsulkar *et al.*, 1999). Assim, a combinação de inibidores que atuam sobre diferentes tipos de proteases ou a associação de inibidores de proteinases com outros genes de resistência são estratégias que merecem ser pesquisadas e exploradas (Jouanin *et al.*, 1998; De Leo *et al.*, 2001).

4. Outras proteínas de defesa vegetal

Além dos inibidores, lectinas, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), glicohidrolases, arcelinas, quitinases, canatoxina e formas modificadas de proteínas de reserva, tais como as vicilinas também estão envolvidas no complexo mecanismo de defesa vegetal (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002).

As lectinas, glicoproteínas encontradas em microorganismos (Sasmal *et al.*, 1992), animais (Ashewell & Harford, 1982) e principalmente em plantas (Peumans & Van Damme, 1995), têm sido muito estudadas devido a sua eficácia como agentes inseticida e fungicida. A arcelina, por exemplo, mostrou ser tóxica ao bruquídeo *Zabrotes subfasciatus* (Paes *et al.*, 2000). Já a lectina de trigo, a WGA, apresentou papel fungicida sobre os fungos *Fusarium graminearum* e *Fusarium oxysporum* (Ciopraga *et al.*, 1999). Em 2002, Freire *et al.* mostraram que a lectina de *Talisia esculenta*, TEL, inibiu cerca de 50% o desenvolvimento dos fungos *F. oxysporum* e *Colletotrichum lindemuthianum* numa concentração de 280 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Proteínas de reserva são sintetizadas e acumuladas durante o desenvolvimento da planta. Em sementes de leguminosas há proteínas de natureza globulínica que conferem resistência à planta contra o ataque de insetos predadores, como foi mostrado por Macedo *et al.* (1993). Os pesquisadores purificaram e verificaram os efeitos de uma proteína de origem globulínica, denominada vicilina, sobre o desenvolvimento do inseto *Callosobruchus maculatus*, evidenciando assim a potencialidade desta proteína como agente inseticida.

Carlini *et al.* (1997) verificaram que a canatoxina, uma proteína isolada de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), mostrava-se eficientemente tóxica sobre duas espécies de insetos, *Callosobruchus maculatus* e *Rhodnius prolixus*. Segundo os pesquisadores, os efeitos tóxicos da canatoxina podem ser comparados, da mesma forma, com os apresentados por algumas lectinas (Huesing *et al.*, 1991), alguns inibidores de α -amilase (Ishimoto & Kitamura, 1989), inibidores de proteinases (Hilder *et al.*, 1989; Johnson *et al.*, 1989) e pelas formas variantes de vicilina (Macedo *et al.*, 1993). Em 2001, Follmer *et al.* mostraram que esta proteína tóxica de *C. ensiformis*, a canatoxina (CNTX), é uma isoforma da urease (JBU) também presente na mesma semente. Além disso, eles mostraram que os efeitos biológicos da CNTX eram independentes de sua atividade ureolítica.

Os estudos com inibidores de α -amilase, que são encontrados em variedades de cereais como cevada, trigo, arroz, e também em algumas leguminosas, têm apresentado resultados de relevante importância. Em 1991, Huesing *et al.* mostraram que inibidores α -amilase presentes em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) são responsáveis pela resistência ao ataque de *C. maculatus*. Já Schroeder *et al.* foram mais além, em 1995, eles transferiram o gene do inibidor de α -amilase de feijão para ervilhas que conferiu resistência contra o ataque do gorgulho *Bruchus pisorum*, demonstrando mais uma vez que algumas proteínas podem participar do mecanismo de defesa das plantas.

Macedo *et al.* (2000a) isolaram uma proteína de milho (*Zea mays*) de 10 kDa, denominada por zeatoxina, que se mostrou eficientemente tóxica ao inseto *Callosobruchus maculatus*, apresentando uma taxa de LD50 quando incorporada à 0,5% na dieta artificial.

3. INSETOS

1. Danos causados por insetos na produção de alimentos

Com um aumento calculado da população mundial de 10 bilhões de pessoas para as próximas quatro décadas, uma prioridade imediata na agricultura é atingir a produção máxima de grãos e de outros produtos seguindo o conceito do manejo sustentável. Estima-se que há perdas de 10 a 20% nas principais produções agrícolas devido à presença de insetos herbívoros, o que é um fator significativo na limitação da produção de alimento (Ferry *et al.*, 2004).

Dentre os grãos cultivados, os grãos de leguminosas ocupam o terceiro lugar atrás de cereais e sementes oleaginosas na produção mundial (Popelka *et al.*, 2004). Milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*) e principalmente as variedades de feijão (por exemplo, *Vigna unguiculata* e *Phaseolus vulgaris*) são os grãos que representam uma grande parte da fonte protéica na alimentação humana e de animais (Duranti *et al.*, 1997). O armazenamento adequado destes poderia permitir a manutenção de estoques estratégicos e reguladores além da comercialização posterior. A cultura do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) é freqüentemente mantida em regiões tropicais, subtropicais e semi-áridas, cujas sementes são consideradas uma importante fonte protéica (Singh & Rachie, 1985). Esta cultura é um exemplo clássico de perda na produção durante o armazenamento prolongado, no qual os grãos são extensivamente atacados por insetos, inviabilizando-os ao plantio além do consumo humano ou animal (Machuka *et al.*, 2000).

Além dos insetos serem considerados os maiores causadores das perdas massivas na produção, eles podem agir de forma indireta, pois existe a possibilidade de atuarem como vetores de vários outros microorganismos fitopatógenos, como por exemplo, fungos, agravando assim a perda da produção (Hilder & Boulter, 1999).

Insetos pertencentes às ordens Coleoptera e Lepidoptera representam os principais responsáveis pelos danos causados no campo e no armazenamento de culturas de importância sócio-econômica. Os coleópteros da família Bruchidae são de maior

importância em relação à infestação de feijões, sendo mencionadas as principais espécies predadoras dos grãos estocados: *Acanthoscelides clandestinus* (Most), *Zabrotes subfasciatus* (Borh) e *Callosobruchus maculatus* (Fabr) (Singh *et al.*, 1985). Esta última, representa a principal praga de *Vigna unguiculata* durante o seu armazenamento (Sales *et al.*, 1992; Macedo *et al.*, 1993; Fernandes *et al.*, 1993). Hall *et al.* (1997) revelaram que este inseto, conhecido como gorgulho ou caruncho do feijão-de-corda, frequentemente danifica de 50 a 100% das sementes estocadas num período de 3 a 6 meses, em condições de infestações severas. A infestação dos grãos ocorre com maior intensidade em climas quentes e áreas tropicais, onde os problemas começam no campo.

Em relação aos lepidópteros podemos citar alguns exemplos de espécies que afetam culturas importantes. Esta ordem agrupa as mariposas e borboletas, cujos adultos não podem consumir materiais sólidos, sendo os danos causados pelas larvas, que possuem aparato mastigador. As larvas das espécies do gênero *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) são consideradas pestes na Ásia, Austrália e nas Américas. Elas causam perdas em muitas culturas importantes tais como de algodão, grão-de-bico, milho, tomate e girassol (Volpicella *et al.*, 2003).

Um outro exemplo é a espécie cosmopolita *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) que é predominante em zona de clima temperado, sendo nativa da Europa. Ela ataca grãos e farinha já processada e armazenada, sendo que poucos produtos vegetais secos e armazenados estão protegidos desta pequena traça voraz. As larvas vivem em cereais moídos, e muitas vezes em produtos já processados como farinhas, fubás, chocolates em pó, biscoitos, doces e rações. Quando presente em moinhos, a farinha aglutinada muitas vezes obstrui o maquinário causando interrupção da moagem e em armazenagem a granel podem cobrir as paredes com teias que podem servir de abrigo para outros insetos (Pacheco & De Paula, 1995).

Pertencente a mesma família Pyralidae, a *Corcyra cephalonica* é uma outra espécie com características semelhantes a *A. kuehniella*. Ela é conhecida popularmente como traça do arroz e é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, atacando um grande número de produtos armazenados como amendoim, sorgo, trigo, arroz, café, cacau, farinhas, frutos secos e algodão (Pacheco & De Paula, 1995).

2. Proteinases e Morfofisiologia da Digestão de Insetos

As proteases digestivas catalisam a quebra de proteínas ingeridas através do processo de hidrólise garantindo assim o melhor aproveitamento e a absorção dessas macromoléculas na forma de peptídeos e aminoácidos, que serão destinados para muitos outros eventos fisiológicos. As proteases são encontradas abundantemente na região do intestino médio do trato digestivo de insetos; e estão subdivididas em endopeptidases, que clivam cadeias protéicas em lugares específicos e exopeptidases que removem aminoácidos da região C-terminal ou N-terminal (Jongsma & Bolter, 1997). As endopeptidases são conhecidas também por proteinases.

A busca do possível alvo na fisiologia de insetos que poderia ser usado como estratégia de controle foi um importante avanço na década de 1970. Um estudo de Gatehouse *et al.* (1979) sugerindo que inibidores de tripsina estariam envolvidos na resistência de um cultivar de *V. unguiculata* ao ataque de *C. maculatus*, estimulou outros pesquisadores a procurar entender as proteinases digestivas dos insetos (Silva *et al.*, 1999).

Por muito tempo acreditava-se que, como os vertebrados, os insetos possuíam somente serinoproteinases e proteinases aspárticas envolvidas no processo digestivo. Desde então, enzimas digestivas, principalmente, de proteínas (por exemplo, catepsina) e carboidratos (α -amilase) vêm sendo isoladas e caracterizadas (Terra & Ferreira, 1994).

A maioria dos estudos sobre os processos digestivos em insetos sugere que eles poderiam ser agrupados de acordo com o tipo de dieta ingerida. Esta hipótese é devida à ocorrência de diferentes proteinases digestivas no canal alimentar que dependem principalmente da composição química da dieta ingerida. Conseqüentemente, a adaptação ao hábito alimentar é mais importante que as características filogenéticas, determinando assim os tipos e não as quantidades relativas das enzimas presentes no inseto (Terra & Ferreira, 1994).

De acordo com a Figura 1, que é um diagrama geral do canal alimentar de um inseto proposto por Terra & Ferreira (1994), o Intestino Anterior (IA) é constituído pela boca (onde encontramos as glândulas salivares quando presentes em sua cavidade),

faringe, esôfago e o papo. O proventrículo é um órgão de trituração em alguns insetos; e em muitos deles, atua como uma válvula que controla a entrada do alimento na porção do intestino médio que é o local principal da digestão e absorção de nutrientes.

O Intestino Médio (IM) consiste de um tubo simples (ventrículo) que pode sofrer ramificações, dando origem ao ceco gástrico ou intestinal. Na maioria dos insetos, o intestino médio é revestido por uma estrutura quitinosa, a membrana peritrófica, que separa o conteúdo luminal em dois compartimentos o espaço endoperitrófico e o espaço ectoperitrófico. Na região do esfíncter, separando o intestino médio do posterior, os órgãos de excreção que se ramificam lateralmente são os túbulos de Malpighi. O Intestino Posterior (IP) inclui o íleo e o reto, envolvidos na absorção de água e íons, terminando no ânus.

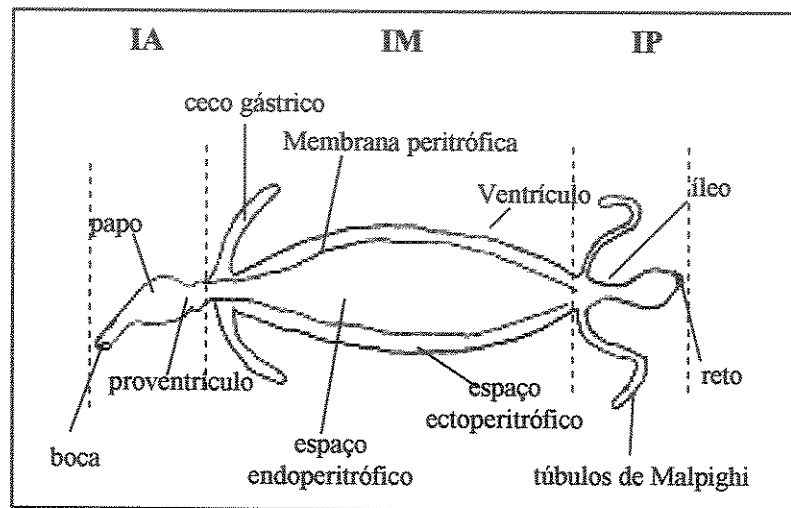


Figura 1 – Diagrama geral de intestino de inseto (adaptado de Terra & Ferreira, 1994)

Formada de proteínas, glicoproteínas e microfibrilas de quitina numa matriz proteoglicana, a membrana peritrófica (MP) separa o alimento do epitélio que reveste o intestino médio. Ela está presente em muitos insetos mas não em todos e sua formação, geralmente é devida à distensão do intestino causada pela ingestão de alimento (Lehane, 1997).

Segundo Terra (2001), são poucos insetos que aparentemente não possuem a membrana peritrófica, talvez porque nestes a alimentação baseia-se em substâncias de baixo peso molecular cuja digestão luminal torna-se desnecessária. Como exemplo citam-se algumas espécies das ordens Hymenoptera, Lepidoptera, Zoraptera, Strepsiptera, Raphidioptera, Megaloptera e Siphonaptera.

As principais funções atribuídas à membrana peritrófica são: proteção contra danos mecânicos, uma barreira física contra microorganismos, compartimentalização dos eventos digestivos atuando como uma barreira de seletividade para enzimas digestivas e produtos da digestão e no mecanismo de conservação enzimática (Peters, 1992; Lehane, 1997; Terra, 2001).

A compartimentalização das enzimas é uma propriedade importante e ela depende, sobretudo da permeabilidade da membrana peritrófica que se deve à presença de poros; integridade da matriz de quitina-peritrofina. Logo, a inibição da síntese de peritrofina e quitina resultam num distúrbio da formação da MP e no evidente aumento de sua permeabilidade (Terra, 2001). A compartimentalização pode mudar em função do pH e da concentração de íons já que o papel de um proteoglicano aniônico nesta propriedade foi sugerido por Lehane, em 1997. Sendo assim, a integridade da MP quando afetada pode interferir no processo de digestão e absorção de nutrientes e, conseqüentemente, causar danos no desenvolvimento do inseto (Shewry & Lucas, 1997; Habibi *et al.*, 2000; Paes *et al.*, 2000).

Em 1979, Terra *et al.* estudaram o processo digestivo de larvas do díptero *Rhynchosciara americana*; e relataram que a tripsina é encontrada no conteúdo luminal, nos espaços endo e ectoperitrófico. Conseqüentemente, a tripsina secretada por células é capaz de atravessar a MP. Já as aminopeptidases não são encontradas dentro da MP (espaço endoperitrófico) e sim no espaço ectoperitrófico, logo elas não atravessam a MP. A amilase tem uma distribuição similar à da tripsina, enquanto a maltase está restrita às células do IM, principalmente as do ceco intestinal. Com base nestas observações, foi proposto que a digestão inicial ocorre dentro da MP pela ação de enzimas como amilase e tripsina. A digestão intermediária ocorre no conteúdo luminal fora da MP, envolvendo enzimas como a amilase e a aminopeptidase. E, a digestão final ocorre na superfície das células do intestino médio, principalmente nas células do ceco intestinal sob ação de aminopeptidases e maltase.

A circulação do alimento ocorre no interior da membrana peritrófica (MP) da região anterior para a região posterior. A água por sua vez, flui da região posterior para o ceco intestinal (Terra & Ferreira, 1994). A ausência dessa estrutura em lepidópteros

permite que a absorção total da água ocorra na região anterior do intestino médio. Assim, o alimento que está sendo digerido caminha ao longo do espaço endoperitrófico, e à medida que o processo avança, as partículas alimentares tornam-se menores diminuindo o seu tamanho até serem capazes de atravessar a MP. As moléculas oligoméricas e enzimas são deslocadas então do espaço ectoperitrófico para o espaço intermicrovilar onde ocorre a etapa final da digestão e a absorção, já que não há a presença do ceco (Terra, 2001).

Segundo Terra & Ferreira (1994), vários estudos vêm sendo realizados na ânsia de determinar os valores de pH nas diferentes regiões da estrutura digestiva, confirmando a correlação entre o pH ótimo da enzima e pH do lúmen de insetos, pois as variações de pH afetam a atividade das enzimas digestivas. Insetos da ordem Lepidoptera apresentam o conteúdo do IM muito alcalino; este alto pH pode ser decorrente da adaptação dos insetos ancestrais que se alimentavam de folhas e precisavam extrair hemicelulose das paredes celulares vegetais. As proteinases presentes nesta ordem são predominantemente serinoproteinases, principalmente as enzimas do tipo tripsina e quimotripsina, embora a presença de carboxipeptidase e enzimas do tipo elastase terem sido recentemente relatadas (Patankar *et al.*, 2001).

4. PLANTA

1. Mecanismo de Defesa Vegetal

A planta, durante todo o seu ciclo de vida, desde a dormência da semente até sua maturidade, está exposta ao ataque de uma grande variedade de insetos, microorganismos e outros agentes que afetam sua integridade. A presença de um mecanismo de defesa no sistema vegetal torna-se então, fundamental para alcançar o sucesso na manutenção do seu crescimento e desenvolvimento. Este mecanismo abrange os mais variados tipos de sistema de defesa, desde a ocorrência de barreiras físicas ou de modificações estruturais na morfologia vegetal, até a presença de compostos químicos tais como alcalóides, toxinas, inibidores enzimáticos e outras substâncias biologicamente ativas contra os agentes predadores (Shewry & Lucas, 1997; Walton, 1997; Harborne, 1997).

A ação de defesa da planta é complexa e oriunda de ações combinadas de diversos fatores; abrange tipos de mecanismos fundamentalmente distintos. O sistema de defesa vegetal pode ser constitutivo das quais fazem parte as barreiras físicas. Já o sistema induzido é acionado em resposta a estímulos ambientais que a planta recebe, nele inclui-se a produção de substâncias biologicamente ativas resultantes da resposta ao ataque (Harborne, 1997; Shewry & Lucas, 1997).

Assim as substâncias químicas são produzidas pelas plantas de duas formas diferentes, na primeira, elas são consideradas constitutivas cuja função é repelir os herbívoros através de sua toxicidade direta ou por reduzir a digestibilidade dos tecidos vegetais atacados. Na segunda, as substâncias são induzidas, ou seja, são sintetizadas em resposta ao dano causado pelo herbívoro. Estas estratégias são capazes de prevenir a maioria dos insetos, embora haja um número reduzido de insetos que é capaz de se adaptar (Mello & Silva-Filho, 2002).

Em relação aos inibidores de proteinases, é sabido que os níveis nas folhas vegetais são normalmente baixos mas eles podem ser induzidos ativamente a altos níveis quando as plantas são atacadas por insetos, fungos, bactérias, ou quando sofrem algum dano mecânico ou são expostas a fitohormônios exógenos (Koiwa *et al.*, 1997; Mello & Silva-

Filho, 2002). Além da síntese local induzida dos inibidores, foi demonstrado que sinais específicos do tecido danificado são transportados via floema e assim estimulam a síntese de inibidores ao longo da planta (Jongsma & Bolter, 1997).

A sinalização decorrente das injúrias dispara uma cascata de eventos que levam a síntese destas proteínas de defesa, que ocorre pela via do octadecanóide, que catalisa a quebra do ácido linolênico, levando a formação de ácido jasmônico, que por sua vez, induz a expressão do gene do inibidor de protease (Koiwa *et al.*, 1997). Após o dano foliar e a introdução de eliciadores provenientes da secreção oral do inseto predador, como a volicitina, alguns eventos ainda não bem elucidados são desencadeados. O fato principal é que a sistemina, um hormônio peptídeo de 18 aminoácidos, é o sinal primário na resposta ao dano ou ferida; ela é liberada no sistema vascular do tecido danificado ativando assim a cascata de sinalização da via octadecanóide (Ryan, 2000; Gatehouse, 2002). Concomitantemente, os componentes da via de sinalização são translocados do tecido danificado ao longo da planta, e incluem também fragmentos pécticos derivados da parede celular danificada, ácido abscísico, compostos intermediários da via octadecanóide (ácido 12-oxo-fitodienóico, ácido 13-hidroperoxilinolênico), ácido jasmônico, etileno e outras moléculas polipeptídicas vegetais (Mello & Silva-Filho, 2002).

A interação planta-inseto permitiu, por exemplo, que ao longo do processo evolutivo, plantas e insetos desenvolvessem mecanismos ecológicos, fisiológicos e bioquímicos com a finalidade de reduzir o efeito das proteinases dos insetos e dos inibidores vegetais, respectivamente (Gatehouse, 2002). As plantas desenvolveram características extraordinárias contra as proteinases dos insetos tais como o aumento da atividade do inibidor em seus tecidos (Rakwal *et al.*, 2001), produção de um conjunto heterogêneo de inibidores ativos contra várias enzimas (Christeller *et al.*, 1998) e de inibidores bifuncionais que são ativos contra amilases e proteinases (Roy & Gupta, 2000), além de inibidores de enzimas de insetos altamente específicos (Falco *et al.*, 2001) e resistentes à proteólise e ativos sob condições diversas de pH intestinal (Christeller *et al.*, 1998). Os insetos, por sua vez, buscaram diversas maneiras de evitar os efeitos negativos causados pela presença de inibidores nas plantas as quais eles atacavam. Assim temos o aumento da atividade das enzimas digestivas ou a síntese de enzimas menos sensíveis

(Paulillo *et al.*, 2000), a modificação do espectro ou da atividade relativa de várias hidrolases digestivas (Patankar *et al.*, 2001) e o decréscimo da sensibilidade das enzimas digestivas aos inibidores (Brito *et al.*, 2001).

2. A Biotecnologia de Plantas

São calculadas perdas na colheita mundial sem o uso de pesticidas e de outras estratégias de controles não-químicas em cerca de 70% da produção mundial, chegando a 400 bilhões de dólares. As perdas da pré-colheita devido à ação de insetos, apesar da utilização de inseticidas, são estimadas em 15% da produção total representando o valor de 100 bilhões de dólares. O custo anual do controle de insetos equivale a 8 bilhões de dólares, justificando assim medidas econômicas e urgentes de controle (Lawrence & Koundal, 2002).

O aumento da população mundial nas próximas quatro décadas atingirá o total de 10 bilhões de pessoas e conseqüentemente, esta estimativa desperta a preocupação de suprir as necessidades alimentares sem contrariar os conceitos atuais de manejo sustentável (Ferry *et al.*, 2004). Segundo Lawrence & Koundal (2002), a busca pelo desenvolvimento de técnicas favoráveis ambientalmente torna-se a solução para diminuir, além dos gastos em energia, a utilização de produtos químicos, e portanto a produção de materiais prejudiciais, tais como os resíduos de pesticidas deixariam de ocorrer. O uso exclusivo de pesticidas químicos, além de resultar num rápido desenvolvimento de resistência nos insetos, é responsável por alterar o balanço entre as pragas e seus predadores naturais, geralmente em favor das primeiras. Sendo assim, um programa de manejo integrado proporcionaria a melhor opção, pois ele seria baseado na combinação de práticas onde ocorra o uso criterioso de pesticidas, rotação de culturas, medidas sanitárias no campo e acima de tudo a exploração de variedades de plantas resistentes.

O controle genético ou o uso de plantas transgênicas poderia trazer uma contribuição significativa para a agricultura sustentável além de ser um importante componente do programa de manejo integrado (Haq *et al.*, 2004; Ferry *et al.*, 2004). A engenharia genética de plantas trabalha para que um gene responsável por uma

determinada característica, que foi identificado, isolado, seqüenciado seja clonado e expresso, tornando possível o melhoramento de plantas através da transformação genética (Hilder & Boulter, 1999). Esse gene pode ser isolado de outras espécies vegetais ou até mesmo de microorganismos (Jouanin *et al.*, 1998). A identificação das proteínas responsáveis pela defesa vegetal e a utilização de seus genes para criar plantas resistentes são a chave no melhoramento vegetal e no aumento da produção agrícola (Haq *et al.*, 2004; Ferry *et al.*, 2004; Lawrence & Koundal, 2002).

Na produção de plantas resistentes a insetos, a partir de proteínas vegetais, duas grandes classes são utilizadas para conferir esta resistência: lectinas e inibidores de enzimas digestivas. Grande parte dessas pesquisas concentra-se na expressão de inibidores de proteinases em plantas transgênicas (Schuler *et al.* 1998; Jongsma & Boulter, 1997).

Testes de incorporação na dieta e estudos de inibição *in vitro* de proteinases digestivas envolvendo os inibidores de proteinases demonstraram seu potencial em interferir no desenvolvimento larval de insetos (Jouanin *et al.*, 1998). Inibidores de proteinases serínicas e cisteínicas têm sido capazes de inibir o crescimento e desenvolvimento de algumas espécies de inseto, principalmente aquelas pertencentes às ordens Lepidoptera e Coleoptera. Schuler *et al.* (1998) relatam que pelo menos quatorze genes diferentes têm sido introduzidos em plantas, os quais são em sua grande maioria inibidores de proteinases serínicas de diferentes famílias, tais como Fabaceae, Solanaceae e Poaceae. Estes inibidores atuam principalmente contra lepidópteros, podendo também atuar sobre alguns coleópteros e ortópteros.

A primeira transferência de gene bem sucedida para outra espécie vegetal, foi realizada em 1987, por Hilder *et al.* O gene, isolado de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), codifica um inibidor de tripsina, o CpTI, que quando incorporado no tabaco (*Nicotiana tabacum*) produziu uma espécie transgênica resistente a *Manduca sexta*, um inseto pertencente à ordem Lepidoptera. Esse gene também foi utilizado na produção de espécies transgênicas de arroz e batata, com o objetivo de torná-las resistentes a, respectivamente, *Seramia inferens* e *Lacanobia oleracea*, espécies de insetos pertencentes à ordem Lepidoptera (Jouanin *et al.* 1998). Da mesma forma, outros genes também foram

transferidos para o tabaco, a maioria codificando inibidores de proteinases serínicas, sendo na grande maioria, efetivos contra insetos da ordem Lepidoptera, como o inibidor de batata II (PotPI-II) atuando sobre os insetos *Manduca sexta* e *Chrysodeixis eriosoma* (Johnson *et al.*, 1989; McManus *et al.*, 1994).

O sucesso desta estratégia depende da execução de todas as etapas: (1) purificação e estudo das propriedades da proteína de defesa; (2) investigação da 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) estudos 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 alteradas e (7) verificação do aumento da resistência nas plantas transgênicas no campo (García-Olmedo *et al.* 1996).

Em 1997, Yeh *et al.* produziram plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana tabaccum*) resistentes a *Spodoptera litura*, um lepidóptero predador das folhas desta espécie. As plantas foram modificadas com a introdução do gene TI, que codifica um inibidor de tripsina presente em *Ipomoea batatas*, a batata-doce. Além disso, TI atua também como uma proteína de reserva vacuolar, o que poderia aumentar a possibilidade dele ser introduzido em outras espécies vegetais.

De Leo *et al.*, em 2001, compararam os efeitos da expressão de um único inibidor de proteinase presente em sementes de mostarda (*Brassica napus*), o MTI-2 em diferentes plantas (*Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabaccum*) contra três espécies diferentes de lepidópteros: *Plutella xylostella*, *Mamestra brassicae* e *Spodoptera littoralis*. Neste estudo, o enfoque da atenção não foi somente os efeitos da ingestão de MTI-2 sobre a mortalidade e variação de peso, mas também o conteúdo e a atividade das proteases intestinais dos insetos; parâmetro importante para determinar o real impacto desta estratégia de defesa. Enquanto a espécie *Plutella xylostella* mostrou ser a espécie mais sensível ao inibidor, mesmo quando este se encontrava em nível baixo de expressão em *Arabidopsis thaliana*, as larvas de *Mamestra brassicae* foram sensíveis somente a altos níveis de expressão tanto em tabaco quanto em *A. thaliana*; e elas nada sofreram quando alimentadas com plantas de *B. napus* com baixa expressão. Já *S. littoralis* mostrou

ser levemente sensível quando MTI-2 estava num baixo nível de expressão e não apresentou nenhuma indução de novas proteinases apesar da ocorrência de um aumento moderado no nível de proteinase.

O conhecimento detalhado das interações enzima-inibidor e da resposta dos insetos frente à exposição aos inibidores de proteinases é importante, caso esta estratégia de proteção obtenha sucesso. Aliados a este fato, estão os avanços da nossa compreensão sobre o mecanismo de defesa natural da planta não modificada que destaca a potencialidade da exploração de mecanismos endógenos de resistência na proteção da cultura. A meta do biotecnologista é criar uma resistência a insetos durável e resultante de vários mecanismos combinados, além de aumentar o seu conhecimento sobre outros mecanismos de defesa vegetal induzida, pois o controle molecular de todo o processo provavelmente desempenhará importante papel na realização deste objetivo (Ferry *et al.*, 2004).

5. APLICAÇÃO DOS INIBIDORES NA ÁREA FARMACOLÓGICA

A regulação de enzimas proteolíticas em tecidos, por inibidores endógenos, é um pré-requisito para a manutenção da homeostase. A atividade inibitória de proteinases do plasma humano foi reconhecida em 1894 por Fermi e Pernossi. O principal inibidor responsável pela atividade antiproteolítica foi primeiramente isolado em 1955 por Shultze e chamado de α_1 -antitripsina (AAT) devido à sua habilidade de inibir tripsina. Através de técnicas eletroforéticas, Laurell e Eriksson, em 1963, demonstraram a ausência da fração AAT no soro de pacientes e a relação desta com uma doença crônica degenerativa do pulmão (Janciauskiene, 2001). Desde então, tem sido mostrado que o controle de vias metabólicas está relacionado com a presença de interações proteinase-inibidor. Elas estão envolvidas na digestão protéica e em outros processos fisiológicos como a coagulação sanguínea, fibrinólise, ativação do sistema complemento, e outros. Foram também estudadas na manutenção da pressão sanguínea e em patologias como infecção, inflamação e câncer (De Clerck & Imren, 1994; Oliva *et al.*, 1989; Oliva *et al.*, 2000; Hiemstra, 2002).

Logo, um interesse na área médica foi despertado quando se pensou na possibilidade da aplicação e utilização dos inibidores vegetais como ferramenta terapêutica. A seguir relataremos algumas participações dessas moléculas nos processos fisiológicos e patológicos.

1. Coagulação sanguínea e participação dos inibidores

Sempre que um vaso sanguíneo é danificado ou se rompe, a hemostasia ou manutenção do fluxo sanguíneo é mantida através de vários mecanismos distintos tais como o espasmo vascular; formação de um tampão plaquetário; coagulação sanguínea e eventual desenvolvimento de tecido fibroso no coágulo sanguíneo para obstruir o orifício no vaso de forma permanente (Guyton & Hall, 1999).

Em casos de sangramento, quando ocorre o extravasamento plasmático, dois processos de emergência são acionados, a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea

(Devlin, 1992). A coagulação sanguínea envolve uma série de reações enzimáticas, encadeadas entre si, que resulta na formação do coágulo, que por ser insolúvel, obstrui as lesões vasculares e estanca o sangramento. Após desempenhar sua função, o coágulo é dissolvido a fim de restabelecer o fluxo sanguíneo, graças à sequência de eventos que constituem o sistema fibrinolítico, cuja enzima central é a plasmina, (Calich & Vaz, 1988).

Fisiologicamente, o processo de formação de coágulo ocorre da seguinte maneira: (1) um complexo de substâncias denominado ativador da protombina, é formado em resposta à ruptura de um vaso ou à lesão do próprio sangue; (2) o ativador da protombina catalisa a conversão protrombina em trombina; (3) a trombina atua como uma enzima para converter o fibrinogênio em filamentos de fibrina aos quais aderem plaquetas, eritrócitos e plasma, formando o coágulo propriamente dito (Guyton & Hall, 1999).

Bioquimicamente, o sistema de coagulação compreende, essencialmente, uma série de transformações de pró-enzimas em enzimas ativas que culmina na formação da trombina, que por sua vez converte o fibrinogênio solúvel em fibrina. Cada reação por sua vez, resulta na agregação de um complexo reacional composto de uma enzima (fator de coagulação ativado), de um substrato (forma pró-enzima de um fator de coagulação) e de um co-fator. Estes componentes são agregados sobre uma superfície fosfolipídica e mantidos coesos por íons cálcio; logo a coagulação tende a manter-se localizada em regiões onde é possível a ocorrência desta agregação, como, por exemplo, na superfície de plaquetas ativadas (Robbins, 1996).

A formação do coágulo ocorre, inicialmente, a partir de duas vias separadas: a via intrínseca ou do fator de contato e a via extrínseca ou do fator tecidual. Ambas convergem para o ponto onde ocorre a formação do fator Xa, a componente proteinase do complexo multienzimático que catalisa a formação de trombina a partir de protrombina. A partir daí, há um caminho único para a formação do coágulo (Devlin, 1992).

A via extrínseca é ativada pelo fator tecidual, uma lipoproteína celular liberada a partir de tecidos lesados ou expressa sobre a superfície de monócitos ativados, células endoteliais e outras células não-vasculares e que converte o fator VII em VIIa. O fator tecidual interage com os fatores VII e X e juntamente com o cálcio e fosfolípidos forma

o ativador extrínseco da protrombina. Através da ativação da protrombina forma-se a trombina que, por sua vez, transforma o fibrinogênio em fibrina (Morrissey *et al.*, 1997).

A via intrínseca também é chamada de fase de contato, pois requer o contato de parte dos fatores da coagulação com uma superfície negativamente carregada para a ativação dos zimogênios. Além disso, há interferência de fatores coagulantes e anticoagulantes que circulam no plasma (Schmaier, 1997). Após a lesão da camada endotelial do vaso sanguíneo e exposição da superfície externa da membrana, o zimogênio fator XII liga-se diretamente às superfícies aniônicas e sofre uma mudança conformacional que aumenta sua atividade catalítica. A pré-caliceína, fator XII (fator de Hageman) e o cininogênio de alto peso molecular (HMWK) formam um complexo com o colágeno subendotelial (ativação por contato). O fator XII liga-se ao HMWK e é convertido lentamente numa protease ativa (FXIIa) a qual converte a pré-caliceína em caliceína e o fator XI na sua forma ativa (FXIa). O fator IXa, juntamente com fator VIIa, os íons cálcio e os fosfolipídeos pró-coagulantes (presentes na membrana das plaquetas ativadas ou de células tecidulares) são as unidades catalíticas necessárias para a ativação do fator X a Xa, sendo designadas, no seu conjunto, por tenase intrínseca. O fator Xa é a porção catalítica do complexo proteinase responsável pela ativação de protombina a trombina (Devlin, 1992).

A plasmina, a caliceína plasmática e a trombina são proteinases serínicas que como vimos participam da cascata de coagulação sanguínea. Muitas substâncias diferentes que afetam este processo já foram identificadas no sangue e nos tecidos, algumas promovendo a coagulação e denominadas pró-coagulantes, e outras inibindo esse processo, designadas anticoagulantes. Se o sangue coagula ou não depende do equilíbrio entre esses dois grupos de substâncias. Logo, a manutenção do fluxo sanguíneo depende do equilíbrio entre os fatores de coagulação, inibidores de coagulação e de componentes do sistema fibrinolítico (Griffin, 1995). O processo de coagulação pode ser controlado através de vários mecanismos, entretanto o meio mais eficiente é realizado através da inibição das proteinases envolvidas. Os inibidores plasmáticos que agem sobre as serinoproteinases representam aproximadamente 10% das proteínas do plasma e os principais deles são o inibidor $\alpha 1$ de proteinase, $\alpha 2$ -macroglobulina, antitrombina III, C-1

inibidor e a α 2-antiplasmina, todos específicos para serinoproteinases (Colman *et al.*, 1982; Davie, 1995;).

A literatura relata a inibição de proteinases que atuam na coagulação por alguns inibidores de serinoproteinases vegetais. Os inibidores extraídos das sementes de milho (Hojima *et al.*, 1980), abóbora (Hojima *et al.*, 1982) e das leguminosas *Torresea cearensis* (Tanaka *et al.*, 1989), *Bauhinia pentandra* (Oliva *et al.*, 1989), *Enterolobium contortisiliquum* (Batista *et al.*, 1996) e *Bauhinia unguolata* (Oliva, *et al.* 1999) inibem o fator XIIa. Já o fator Xa foi inativado apenas pelo inibidor de *B. unguolata*, com alta afinidade (Oliva *et al.*, 1996).

Inibidores presentes nas sementes de *Bauhinia rufa*, *B. unguolata*, *B. pentandra*, *E. contortisiliquum* (Oliva *et al.*, 1989; Sallai, 1993; Batista *et al.*, 1996) mostraram ser capazes de inibir calicreína. O inibidor de *Delonix regia* (Pando *et al.*, 2001) e de *Dimorphandra mollis* (Mello *et al.*, 2001) também inativaram a calicreína plasmática humana, sendo que este último também foi capaz de inibir a plasmina.

Assim, os inibidores vegetais permitem aplicações úteis em laboratório devido a sua multiplicidade de funções biológicas. O seu isolamento e caracterização podem abrir novas perspectivas de trabalho para uma melhor compreensão e controle do processo de coagulação sanguínea.

2. Inflamação e os inibidores de serinoproteinases

A reação inflamatória é considerada uma resposta de defesa do organismo, ou mais especificadamente, dos tecidos vascularizados, contra a invasão por agentes infecciosos, por danos físicos, químicos ou traumáticos (Rocha & Silva, 1978). É caracterizada pela saída de líquidos e de células do sangue para o interstício; é um fenômeno essencialmente dinâmico, razão pela qual seu aspecto morfológico se modifica com o tempo (Pereira, 2003).

A primeira fase da reação inflamatória é denominada de fase aguda sendo que, dependendo do estímulo ser ou não persistente, esta reação pode tornar-se crônica, podendo, muitas vezes, ser prejudicial ao organismo. Frequentemente, após a fase aguda,

ocorre a resolução do processo em razão da eliminação dos agentes causadores (Sedgwick & Willoughby, 1985).

No processo inflamatório, eventos ocorrerão para cicatrizar e reconstituir o tecido lesado tais como (a) a vasodilatação dos vasos sanguíneos locais e aumento excessivo do fluxo sanguíneo local; (b) aumento da permeabilidade dos capilares com vazamento de grandes quantidades de líquido para os espaços intersticiais; (c) coagulação do líquido desses espaços, devido a quantidades excessivas de fibrinogênio e de outras proteínas que vazaram dos capilares e (d) tumefação celular. Os eventos são mediados pela liberação de diferentes mediadores de origem celular como a histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, interleucinas, fator ativador de plaquetas, proteínas catiônicas, ou de origem plasmática como as cininas, frações do sistema complemento e frações do sistema de coagulação. Cada um desses mediadores é, geralmente responsável por um evento em particular da resposta inflamatória (Guyton & Hall, 1999).

A vasodilatação, com conseqüente aumento do fluxo sanguíneo, tem como principais mediadores inflamatórios responsáveis os metabólitos do ácido araquidônico (AA), via ciclooxigenase (CO), tais como prostaglandinas da série E e a prostaciclina, além da bradicinina, histamina e óxido nítrico (Hurley, 1978; Williams, 1985; Moncada *et al.*, 1991). O aumento da permeabilidade vascular somado ao aumento da pressão de filtração, devido a vasodilatação, leva à formação do edema inflamatório. Isto se deve à ação de mediadores sobre as células endoteliais venulares, entre os quais citam-se: cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, fator de ativação plaquetária (PAF), um componente do sistema complemento (C5a) e substâncias liberadas localmente, das terminações nervosas (taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) (Williams, 1985; Brain & Williams, 1985; Hua, 1986).

A ativação da via da coagulação é um componente bem reconhecido da resposta pró-inflamatória, mostrando que esses dois processos estão intimamente entrelaçados. O endotélio vascular participa no controle da hemostasia por mecanismos que envolvem a síntese e a liberação de fatores pró-coagulantes e anticoagulantes. Quando o endotélio sofre uma injúria, como durante a inflamação, o balanço entre fatores pró-coagulantes e

anticoagulantes é perdido e o estado pró-coagulante predomina, mostrando realmente que há uma cooperação entre inflamação e coagulação (Cirino *et al.*, 2000).

A deposição de fibrina indica que a ativação da cascata de coagulação e a geração de trombina ocorreram no sítio da inflamação. Recentes estudos mostram que trombina não é importante apenas na indução da formação do coágulo de fibrina, mas também tem funções pró-inflamatórias diretas. Ela aumenta a permeabilidade vascular e promove migração celular de neutrófilos para o foco inflamatório, além de gerar um aumento da aderência leucocitária e da proliferação de fibroblastos (Cirino *et al.*, 2000).

O sistema gerador das cininas está intimamente associado ao sistema de coagulação, já que o fator de Hageman ativado por superfícies eletronegativas ou por endotoxinas, ativa a pré-caliceína em caliceína, a qual age sobre uma globulina, gerando bradicinina. Este nonapeptídeo vasoativo aumenta a permeabilidade vascular, além de gerar contração da musculatura lisa, dilatação de vasos sanguíneos e dor quando injetado na pele. A atuação deste mediador dura pouco, uma vez que a bradicinina é rapidamente inativada por uma enzima denominada quinase (Robbins, 1996).

O sistema complemento é um conjunto de proteínas (pró-enzimas) que se ativam em cascata. Este sistema atua na imunidade para a defesa contra agentes microbianos e culmina na lise dos micróbios pelo chamado complexo de ataque à membrana (CAM). Durante o processo de ativação, são gerados outros produtos com efeitos diversos: liberam mediadores de mastócitos, substâncias que atraem e ativam fagócitos e outras com grande atividade opsonizadora (Pereira & Bogliolo, 2003). Dentre os componentes do complemento, os mediadores inflamatórios mais importantes são os C3 e o C5, pois além de aumentarem a permeabilidade vascular e gerar vasodilatação pela liberação de histamina presente nos mastócitos, o componente C5 ativa também a via lipoxigenase do metabolismo do ácido araquidônico em neutrófilos e monócitos, intensificando ainda mais a liberação de mediadores inflamatórios e aumentando a adesão leucocitária ao endotélio através da ativação dos leucócitos. (Robbins, 1996; Pereira & Bogliolo, 2003).

Outro foco de estudo do processo inflamatório é o papel de serinoproteinases endógenas. Vimos que estas além de atuarem diretamente na inflamação, desempenham importantes funções em processos tais como a hemostasia, fibrinólise e ativação do

sistema complemento. Logo, as pesquisas têm focalizado o papel dessas proteinases no tecido lesado de alguma forma, e mostram que o balanço entre proteinases e inibidores é o principal determinante na manutenção da integridade do tecido. Serinoproteinases presentes em células do sistema inflamatório, incluindo os neutrófilos, estão envolvidas em várias desordens inflamatórias, tais como a doença pulmonar obstrutiva crônica ou enfisema pulmonar. Esta patologia é caracterizada pela destruição alveolar que por sua vez representa o principal dano da função pulmonar (Hiemstra, 2002).

Os inibidores de serinoproteinases α_1 -antitripsina (AAT) e α_1 -antiquimotripsina (ACT) são os principais e mais abundantes inibidores endógenos (membros da família “serpins”) presentes no plasma humano. O AAT possui ampla gama de atividades, incluindo a inibição de tripsina, quimotripsina, trombina, calicreína e plasmina. Porém, o papel primário dele é de proteger o trato respiratório da destruição proteolítica pela elastase liberada por neutrófilos. Além disso, uma deficiência genética deste inibidor está associada com uma predisposição em desenvolver enfisema pulmonar, particularmente em fumantes (Kalsheker *et al.*, 2002). O ACT inibe proteinases do tipo quimotripsina e sua função fisiológica primária é inibir a catepsina G. Tem sido mostrado que este inibidor é um dos componentes das placas associadas à doença de Alzheimer, sendo que a sua interação com o peptídeo amilóide neurotóxico A β (A β P) estimula a formação e a ruptura das fibrilas de A β de maneira concentração-dependente. AAT e ACT são reagentes positivos da fase aguda, isto é, as concentrações plasmáticas aumentam como resultado da inflamação (Kalsheker *et al.*, 2002).

Tem sido mostrado que muitos compostos derivados de plantas apresentam efeitos antiinflamatórios significativos. Por esta razão, eles são considerados moléculas importantes no desenvolvimento de novas drogas, especialmente aquelas destinadas ao tratamento ou ao controle de estados inflamatórios. Em 2000, Oliva *et al* mostraram que o inibidor de serinoproteinase presente em sementes de *Leucaena leucocephala*, o LITI, apresentava efeito antiinflamatório no edema de pata de rato induzido por carragenina, sendo que diminuía a liberação de bradicinina além de bloquear *in vitro* as enzimas envolvidas na coagulação sanguínea e na fibrinólise. Os autores sugeriram que o efeito antiinflamatório *in vivo* de LITI era devido a sua interferência no sistema calicreína-

cinina. Assim, a utilização de inibidores de proteinases presentes em plantas poderia auxiliar na elucidação dos múltiplos mecanismos decorrentes de mudanças patológicas que podem ativar ou bloquear as vias da inflamação. Além disso, o controle de uma via qualquer ou de uma substância em particular pela atuação direta do inibidor poderia esclarecer o papel específico de determinada célula ou até de seu produto no processo patológico.

6. OS INIBIDORES ISOLADOS DE SEMENTES DE *Dimorphandra mollis*

Este trabalho tem como objetivo geral melhor caracterizar dois inibidores presentes nas sementes da espécie *Dimorphandra mollis* (Leguminosae-Mimosoideae) e estudar sua ação inseticida e farmacológica. Diante do tema proposto, uma breve descrição de ambos auxiliaria a compreensão do desenvolvimento do trabalho.

DMTI e DMTI-II já foram purificados e caracterizados respectivamente por Macedo *et al.* (2000) e Mello *et al.* (2001). Eles foram purificados a partir de precipitação com sulfato de amônio (30-60%), cromatografias em coluna de exclusão molecular (Sephadex G-75), troca iônica (DEAE-Sepharose) e afinidade (Sepharose-Tripsina). DMTI apresenta uma massa molecular de 20 kDa e é constituído por uma única cadeia polipeptídica. Ele inibe a tripsina bovina na razão molar de 1:1, apresentando uma constante de inibição (K_i) de $5,3 \times 10^{-10}$ M, o que denota uma alta afinidade entre a enzima e o inibidor. O segundo inibidor purificado de *D. mollis*, DMTI-II, apresenta massa molecular de 23 kDa, cadeia polipeptídica única e K_i de $1,7 \times 10^{-10}$ M o que também indica alta afinidade entre enzima e o inibidor. A tripsina é inibida também na razão molar de 1:1. DMTI e DMTI-II, quando comparados entre si, apresentam um grau de homologia em sua sequência N-terminal (cerca de 50%) bem como quando comparados com outros inibidores da família de Kunitz, reforçando que ambos são membros desta família.

A realização de um estudo comparativo dos dois inibidores pode elucidar a existência de diferenças ou semelhanças quanto à aplicabilidade biológica de inibidores diferentes presentes na mesma semente, como é o caso deste trabalho.

II. OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo estudar dois inibidores de Kunitz presentes nas sementes de *Dimorphandra mollis*, realizando a (o):

- Caracterização físico-química de DMTI e DMTI-II;
- Estudo da atividade inseticida dos inibidores sobre dois lepidópteros através de ensaios *in vitro* e *in vivo*;
- Estudo da ação farmacológica, utilizando como modelo biológico, a indução de edema de pata de rato.

III. MATERIAIS

1. Material Biológico

1.1. A Planta – Sementes de *Dimorphandra mollis*

Dimorphandra mollis, conhecida também pelos nomes Faveiro-doce e Falso-Barbatimão, é uma espécie pertencente à família Leguminosae, subfamília Mimosoideae (Figura 2). É uma planta decídua, capaz de se adaptar a regiões degradadas, com solos pobres em sais minerais. Apresenta uma ampla distribuição, ocorrendo em boa parte do centro-oeste brasileiro, em regiões de cerrados de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Minas Gerais. Esta espécie pode ser encontrada no interior do estado de São Paulo (Lorenzi, 1992).

A árvore pode atingir alturas entre 8 e 14 metros, apresenta folhas compostas pinadas e sua madeira é moderadamente pesada, possuindo uma considerável resistência a organismos xilófagos. Sua florescência, normalmente, inicia-se em outubro e prolonga-se até janeiro, aproximadamente, sendo que a maturação dos frutos se dá entre os meses de agosto e setembro (Lorenzi, 1992).

As sementes são compridas, com uma coloração marrom claro, estão contidas em vagens as quais são expostas ao sol, para facilitar seu posterior beneficiamento; 1 Kg contém aproximadamente 3700 sementes (Lorenzi, 1992).

Neste trabalho foram utilizadas sementes de Faveiro-doce, coletadas no cerrado da região de Três Lagoas - Mato Grosso do Sul, na estrada para o rio Sucuriú.

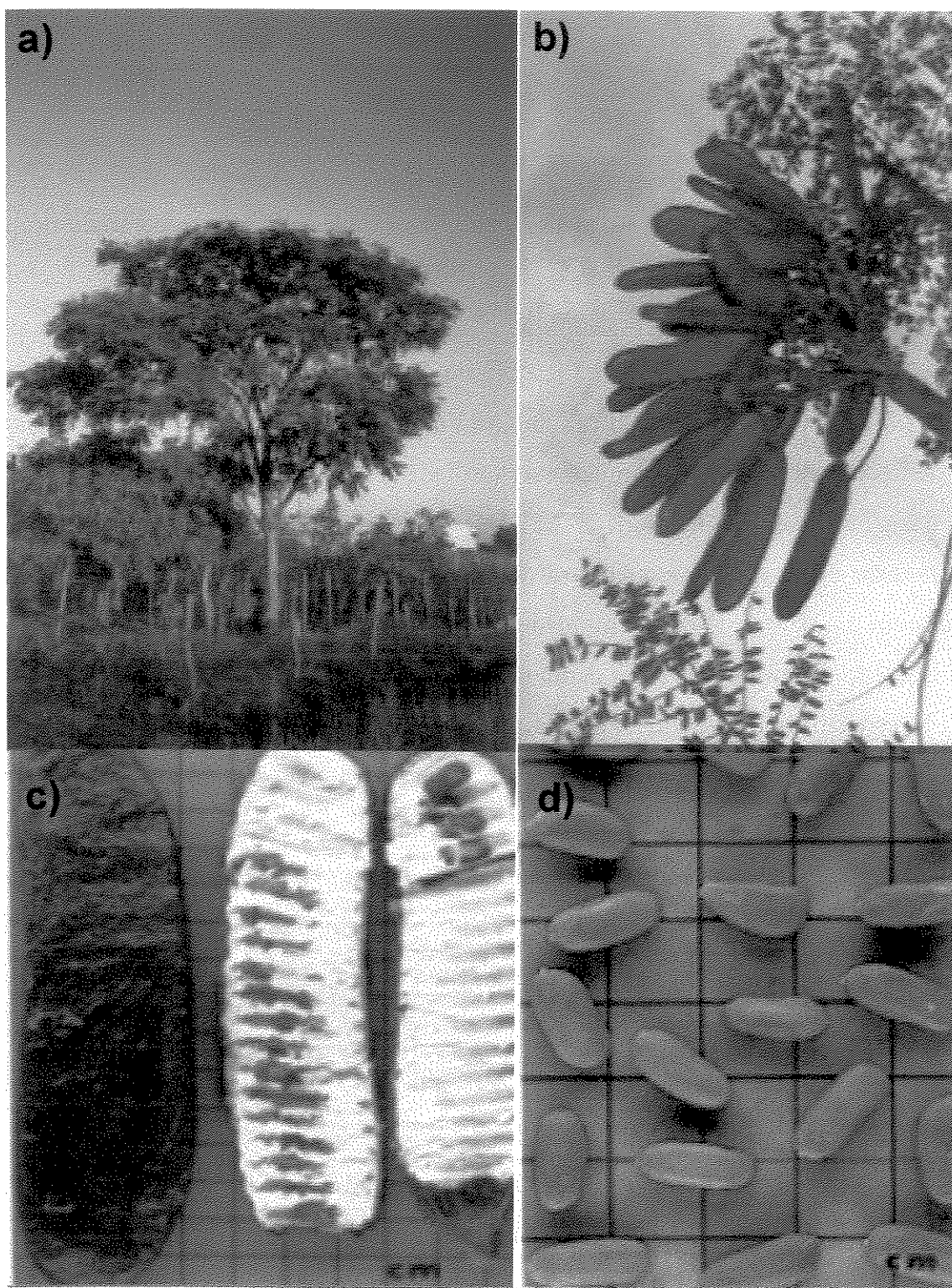


Figura 2 – *Dimorphandra mollis* (Faveiro-doce): (a) árvore, (b) frutos (Fotos de G.C. Mello), sementes (d) e sua disposição na vagem (c) (Fotos de H. Lorenzi).

1.2. Os Animais

a) Insetos

Os insetos da ordem Lepidoptera, família Pyralidae, utilizados no estudo do papel inseticida dos inibidores de *Dimorphandra mollis* foram as espécies *Anagasta kuehniella* Zeller (Figura 3) e *Corcyra cephalonia* Stainton (Figura 4). As colônias de ambas espécies foram fornecidas pelo Dr. J.R.P. Parra (Laboratório de Biologia dos Insetos da Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, USP, Piracicaba, SP) e são mantidas em condições ideais e rigorosamente controladas no Laboratório de Purificação de Proteínas e Suas Funções Biológicas (LPPFB) no Centro Universitário de Três Lagoas da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Essas duas colônias foram mantidas na temperatura de 28 ± 1 °C e uma umidade relativa de 65 – 75% e em períodos diários de iluminação de 16 horas, com dieta padrão de gérmen de trigo.

A espécie *Anagasta kuehniella* requer ambiente fechado e de alta temperatura ao longo do ano para obter pleno desenvolvimento. Possui envergadura de asas de 20 a 25 mm e quando larvas, chegam a medir 15 a 20 mm. As larvas apresentam coloração branca, às vezes rosadas com a parte posterior da cabeça marrom. A pupa mede em torno de 9 mm, em forma de fuso também de cor marrom, alojando-se num casulo. A fêmea deposita cerca de 200 a 300 ovos, mas dependendo da temperatura e umidade, uma fêmea pode depositar até 562 ovos. A temperatura favorável é de 26°C e a temperatura limite para o desenvolvimento deste inseto é de 35°C. Já a umidade relativa ideal é de 70%. O ciclo de vida total dura em torno de 3 a 4 meses e, sob condições adequadas de temperatura e umidade, têm aproximadamente quatro gerações por ano. Quando adultos este inseto apresenta um tempo de vida curto, de aproximadamente 14 dias. As larvas movem-se rapidamente, alimentando-se e lançando fios de seda, formando teias (Gallo *et al.*, 2002)

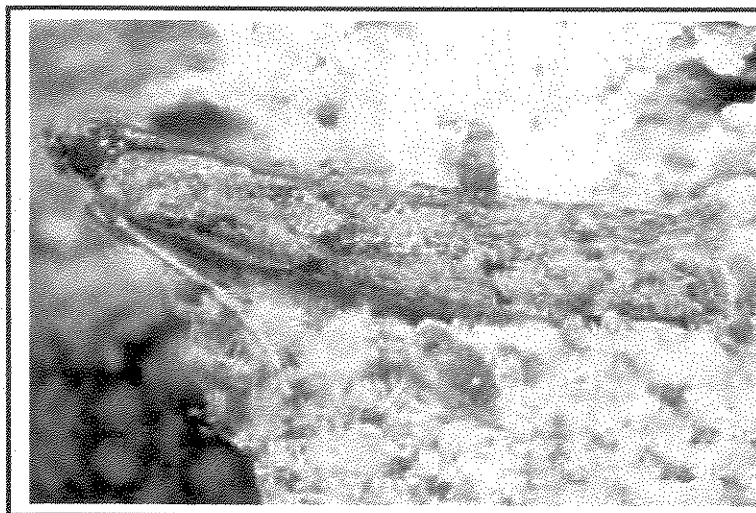


Figura 3 – Inseto adulto de *Anagasta kuehniella* (foto retirada da página www.euroguard.co.uk/pestimages/medflourmoth.jpg)

A lagarta da *Corcyra cephalonica* mede até 15 mm de comprimento e apresenta-se na cor branca ou creme, possui o corpo coberto com pêlos finos e normalmente se esconde na própria teia ou entre os grãos. A traça da adulta é cinzenta, freqüentemente com padrões mais escuros nas asas, cuja envergadura chega a 20 –23 mm (Pacheco & De Paula, 1995). Seu ciclo biológico é muito rápido em produtos triturados como farinha, cevada e trigo; fêmeas e machos acasalam-se logo após a emergência durante o período de 1 a 2 dias, e a oviposição é predominantemente à noite. Os ovos são pegajosos e de coloração branco-pérola, são colocados em maior número no 2º e 3º dias após a emergência (Gallo *et al.*, 2002).

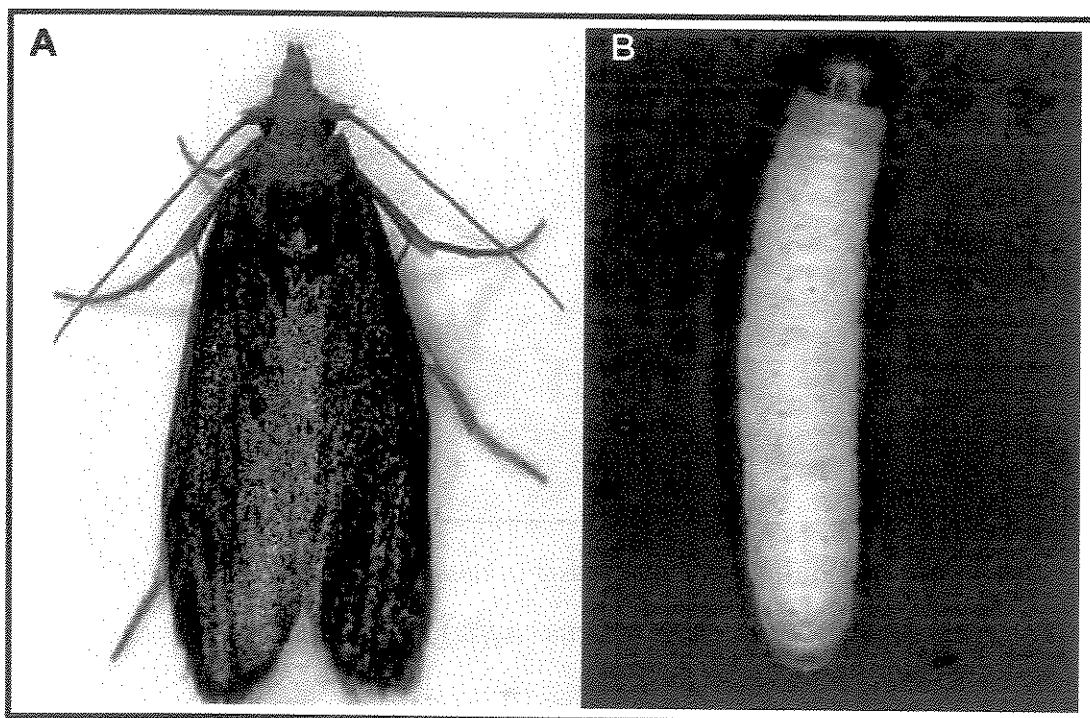


Figura 4 – Inseto adulto (A) e larva (B) de *Corcyra cephalonica* (foto retirada da página <http://www.nfri.affrc.go.jp/yakudachi/gaichu/zukan>)

b) Ratos

Foram usados ratos Wistar, machos, pesando 120 a 180 g, provenientes do Centro Multi-Disciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp. Esses animais foram transferidos para o Biotério do Departamento de Farmacologia, pelo menos 24 h antes dos experimentos, onde foram mantidos a 24 °C, com iluminação diária de 12 h e com água e alimentação *ad libitum*. Todos os experimentos com animais foram realizados conforme as diretrizes do cuidado animal da Universidade Estadual de Campinas.

2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados na realização deste trabalho foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

2.1. Enzimas

As enzimas utilizadas: tripsina bovina e porcina, quimotripsina bovina, pepsina, papaína e α -amilase foram adquiridas da *Sigma Chemical Company*.

2.2. Substratos

Os substratos colorimétricos, BAPNA e BTPNA, foram adquiridos da *Sigma Chemical Company*. Os substratos caseína e amido são procedentes da MERCK.

2.3. Reagentes para eletroforese

Para a realização de eletroforese, os materiais utilizados, tais como acrilamida, metilenobisacrilamida, TEMED, dodecilssulfato de sódio (SDS), Coomassie Brilliant Blue R-250 e persulfato de amônio, foram adquiridos da Bio-Rad Laboratories. Os padrões de massas moleculares fosforilase b (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e α -lactalbumina (14 kDa) são procedentes da Pharmacia Fine Chemical.

2.4. Drogas utilizadas

No estudo da ação farmacológica dos inibidores de *Dimorphandra mollis*, foram utilizadas as seguintes drogas:

- Capsaicina: depletor de neuropeptídeos de fibras C sensoriais
- Ciproheptadina: duplo antagonista de receptores de histamina e serotonina

- HOE 140 (Icatiban): antagonista do receptor B_2 da bradicinina
- indometacina: inibidor da ciclooxigenase
- Mepiramina: antagonista do receptor H_1 da histamina
- SR140333: antagonista seletivo para receptores de taquicininas NK_1
- SR48968: antagonista seletivo para receptores de taquicininas NK_2

Mepiramina, ciproheptadina, bradicinina, composto 48/80 e a indometacina foram obtidas da *Sigma Chemical Company* (St. Louis, MO, USA). HOE 140 (Icatiban) foi obtido de *Pharma Syntesis Hoechst AG*. As drogas SR140333 e SR48968 são procedentes de Sanofi Recherche (Montpellier, FR). A heparina foi obtida do Laboratório Roche (Rio de Janeiro, BR). O halotano é proveniente de Cristália Pro. Quim. Farm. LTDA (Itapira, BR).

IV. MÉTODOS

1. Caracterização físico-química dos inibidores isolados de sementes de *Dimorphandra mollis*

DMTI (Macedo *et al.*, 2000) e DMTI-II (Mello *et al.*, 2001) foram obtidos da seguinte maneira:

As sementes foram trituradas em moinho de grande porte e um moinho analítico para a obtenção de uma farinha fina. Esta foi submetida a uma delipidação com hexano devido a presença de lipídios nas sementes. A farinha delipidada foi submetida a uma extração com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6, na proporção de 1:10 (p/v), sob agitação constante durante 120 minutos; sendo subsequentemente centrifugada a $7500 \times g$ por 30 minutos. O sobrenadante (EB) foi fracionado por precipitação com sulfato de amônio de 0-30%, 30-60% e 60-80% de saturação. A fração precipitada com 30-60% de saturação (PII) foi selecionada para dar continuidade a purificação por apresentar maior atividade específica.

A fração PII liofilizada foi diluída em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6, contendo NaCl 0,1M e a solução aplicada numa coluna de cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75 equilibrada como mesmo tampão. Nesta etapa, apenas uma fração (FI) apresentou atividade inibitória sendo então dialisada e liofilizada. Em seguida, FI foi aplicada numa coluna de troca iônica DEAE-Sepharose equilibrada previamente com tampão Tris/HCl 0,05M, pH8,0. A eluição das proteínas absorvidas foi realizada com o mesmo tampão contendo NaCl num gradiente de 0 – 1 M. Duas frações com atividade inibitória são obtidas neste passo cromatográfico: uma é eluída antes do gradiente salino e denominada por DI; a outra, DII, é eluída com cerca de 0,5 M de NaCl. Finalmente, ambas são dialisadas, liofilizadas e submetidas, separadamente, à cromatografia de afinidade numa coluna de Sepharose-Tripsina (Macedo & Xavier-Filho, 1992) equilibrada com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,6 contendo NaCl 0,1M. A fração retida na coluna é eluída com HCl 0,1 M, NaCl 0,3 M. Portanto, as frações DI e DII provenientes da troca iônica deram origem respectivamente aos inibidores, DMTI-II e DMTI.

1.1. Efeito da temperatura na atividade inibitória

Os inibidores DMTI (Macedo *et al.*, 2000) e DMTI-II (Mello *et al.*, 2001) e foram submetidos a uma variação de temperatura (37 a 100°C), com o objetivo de avaliar os efeitos da temperatura nas atividades de ambos inibidores. Após incubação por 20 minutos em cada temperatura, a eficiência inibitória foi verificada através da determinação da atividade residual de cada inibidor. Foram feitas 3 repetições para cada temperatura, sendo determinado o desvio padrão para cada temperatura.

1.2. Efeito do pH na atividade inibitória

Neste ensaio, DMTI e DMTI-II foram submetidos a diferentes condições de pH, sendo incubados, por 30 minutos a 37°C, com os seguintes tampões: citrato de sódio 0,1M (pH 2; 3; 3,5; 4), acetato de sódio 0,1M (pH 4,5; 5; 5,5), fosfato de sódio (pH 6; 6,5; 7), Tris-HCl 0,1M (pH 7,5; 8; 8,5) e bicarbonato de sódio 0,1M (pH 9; 10). Após o período de incubação, o pH de todas as alíquotas foi ajustado para pH 8,0 para determinar a estabilidade da atividade inibitória, através do ensaio antitriptico, verificando assim a atividade residual. Foram feitas triplicatas para cada valor de pH e sendo determinado a média dos valores obtidos e o desvio padrão para cada um deles.

1.3. Efeito do DTT na atividade dos inibidores DMTI e DMTI-II

Para avaliar os efeitos do DTT sobre a atividade de DMTI e DMTI-II, amostras de ambos foram incubadas com soluções de DTT, com concentrações finais de 1, 10 e 100 mM. A reação foi encerrada pela adição de iodoacetamida, na quantidade de duas vezes a concentração final de DTT. Durante a incubação a 37°C, alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo de 15, 30 60 e 120 minutos. Para todos esses intervalos, um controle da amostra sem DTT foi feito. Após o período de incubação, essas alíquotas foram submetidas a ensaios antitripticos para verificar a atividade residual de cada inibidor. Os

resultados mostrados foram obtidos a partir da média de triplicatas, sendo também determinado o desvio padrão para cada valor encontrado.

1.4. Efeito da uréia na atividade inibitória de DMTI e DMTI-II

Os inibidores DMTI e DMTI-II foram incubados a 37 °C, por 60 minutos, em soluções de uréia com concentrações finais de 1, 2, 4 e 8M. Após o período de incubação a eficiência inibitória foi verificada através da determinação da atividade residual de cada inibidor. Para cada concentração foram feitas triplicatas e o resultado foi obtido a partir da média dos valores, sendo também determinado o desvio padrão.

1.5. Efeito do cloreto de guanidina na atividade inibitória de DMTI e DMTI-II

Para analisar os efeitos do cloreto de guanidina, os dois inibidores de *D. mollis* foram incubados a 37 °C, por 60 minutos, em soluções com concentrações finais de 1, 2, 4 e 6 M do agente desnaturante. Após o período de incubação, o ensaio antitriptico foi imediatamente realizado para verificar a atividade residual de DMTI e DMTI-II. Foram realizadas triplicadas para cada concentração de cloreto de guanidina, sendo determinados a média e o desvio padrão para cada uma delas.

1.6. Dicroísmo circular de DMTI e DMTI-II

As medidas de dicroísmo circular foram feitas utilizando um espectropolarímetro J-810 (JASCO) e expressas pela elipsidade residual média. Amostras de inibidores foram preparadas diluindo-os em concentrações de ~ 15-17 μ M em tampão fosfato 10 mM e em 30, 40, 60 e 90 % (v/v) da mistura TFE/água. Nos experimentos realizados na presença de SDS, a concentração deste foi aumentada pela adição do volume adequado de uma solução estoque de 200 mM. As medidas de CD foram feitas num espectro de 190-260 nm. Quatro scans consecutivos por amostra foram realizados em uma cubeta de quartzo de 0,1 cm de caminho ótico, numa velocidade de 50 nm/min, a 25 °C. Após a subtração

do sinal de CD do solvente e correção da diluição, no caso da adição de SDS, a elipsidade observada, θ (millidegree), foi convertida a média da elipsidade residual molar.

1.7. Calorimetria

Os estudos da energia envolvida em processos como a desnaturação podem ser diretamente realizados através da calorimetria, cujos experimentos foram realizados num microcalorímetro de varredura diferencial ultra-sensível, modelo VP-DSC (Microcal). O equipamento de DSC contém duas células: a célula de referência e a célula de amostra que são aquecidas sempre nas mesmas velocidades e têm suas temperaturas sempre igualadas. A obtenção dos dados e as análises foram realizadas num software padrão. O parâmetro que é extraído do desenovelamento térmico por DSC é o T_m ou temperatura de transição, que é o pico máximo da fase de transição no desenovelamento, onde 50% das proteínas estão enoveladas e outros 50% encontram-se desenoveladas. A célula de amostra foi preenchida primeiramente com 0,5 mL de tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4 para obtenção da linha de base. Os parâmetros experimentais foram: a variação de temperatura de 25 °-95°C, 3 corridas; pré-corrida inicial de 1 hora e as seguintes pré-corridas com duração de 2 horas; pós-corrida 0 h; velocidade de aquecimento de 90 °C/h e velocidade de resfriamento de 60 °C/h. A solução contendo o inibidor DMTI-II (1 mg/mL) foi aplicado na célula de amostra e o tampão no qual a proteína foi diluída foi aplicado na célula de referência, e assim ambas as células foram submetidas as condições acima citadas.

1.8. Inibição da tripsina bovina

Para um volume final de 1,5 mL, a mistura de pré-incubação continha 0,0133 M de tampão Tris-HCl pH 8,0, 50 μ l de uma solução estoque tripsina (0,3 mg/ml) dissolvida em HCl 0,0025N e diferentes concentrações do inibidor (DMTI ou DMTI-II). Após pré-incubação por 10 minutos a 37°C, foi adicionado à mistura, 1,0 ml de uma solução 0,01M de BAPNA, dissolvido em tampão Tris-HCl 0,1M, pH8,0; sendo a incubação prosseguida

por mais 30 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato pela enzima foi acompanhada fotometricamente a 405 nm. O cálculo da atividade inibitória foi feito pela determinação da atividade residual da tripsina no ensaio.

2. Estudo da atividade inseticida dos inibidores isolados de sementes de *D. mollis*.

2.1. Ensaio In Vitro

2.1.1. Efeito dos inibidores DMTI e DMTI-II sobre as enzimas digestivas de *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*

Enzimas presentes no homogenato de intestinos médios de larvas do 4º instar de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* (50µg de proteína) foram incubadas, separadamente, com concentrações crescentes dos inibidores de *D. mollis* (1mg/ml), dissolvido em tampão Tris/HCl 0,05 M, pH 8,0. O volume final do ensaio foi ajustado para 500 µl com o tampão acima mencionado. Após 20 minutos de incubação a 37°C, a atividade inibitória foi avaliada através da hidrólise de BAPNA, acompanhada fotometricamente a 410 nm, e calculada após a determinação da atividade residual enzimática.

2.1.2. Digestibilidade *in vitro* dos inibidores de *D. mollis* por enzimas digestivas de *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*

DMTI-II (Mello *et al.*, 2001) e DMTI (Macedo *et al.*, 2000) foram dissolvidos (2mg/mL) em tampão Tris/HCl 0,05 M, pH 8,0. Os extratos de intestinos médios das larvas dos insetos testados foram preparados de acordo o método descrito detalhadamente no item 2.1.4. Para a realização do ensaio de digestibilidade *in vitro*, o método descrito por Macedo *et al.* (2003) foi seguido. Incubou-se 50 µg de proteína deste extrato com, respectivamente, 30 µg de DMTI-II ou 40 µg de DMTI; 200 µl de tampão Tris/HCl 0,05M pH8,0. Os ensaios foram realizados à temperatura de 37°C, nos intervalos de tempo 3, 6, 12, 24, 48 e 72 horas e a reação foi detida por aquecimento a 100°C por 2

minutos, de acordo com Os produtos da reação (e provas em branco) foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (Laemmli, 1970)

2.1.3. Atividade inibitória de DMTI-II e DMTI após incubação com as enzimas digestivas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica*.

Após os inibidores terem sido incubados com as enzimas digestivas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* (item acima), foram realizados ensaios para dosagem da atividade residual do inibidor conforme descrito no item 1.8 de acordo com método descrito por Macedo *et al.* (2003).

2.1.4 Preparação do homogenato de intestinos médios de larvas de *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*

As larvas dos lepidópteros (4º instar de desenvolvimento) foram imobilizadas por ação de baixa temperatura por alguns minutos para facilitar a dissecação do seu intestino médio (IM). Em seguida, os intestinos médios foram cuidadosamente retirados com auxílio de pinças e sob lupa estereoscópica numa solução de NaCl 150 mM e guardados numa temperatura de -20 °C. Os intestinos médios (IM) de *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica* foram homogeneizados em Potter numa solução de NaCl 150 mM, em banho de gelo, durante 10 minutos, obtendo-se um extrato (10 IM/mL). O extrato foi centrifugado a 6.000 x g durante 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi imediatamente utilizado nos ensaios enzimáticos.

2.1.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (PAGE-SDS) foi desenvolvida segundo o método de Laemmli (1970). A concentração utilizada para o gel de corrida (“gel de separação”) foi de 12,5% de poliacrilamida (proporção 30:0,8 de acrilamida:bisacrilamida); a qual foi preparada em tampão Tris-HCl 0,4M pH 8,8,

contendo 0,2% de SDS, 0,025% de PSA (100 mg/mL) e 0,05% de TEMED, em volume final de 8 mL para cada gel. Após a polimerização do gel de corrida, foi preparado o gel superior (“gel de aplicação”) para aplicação das amostras. Para sua preparação foram utilizados 5% de acrilamida em 0,1M de tampão Tris-HCl, pH 6,8, contendo 0,5% de SDS, 0,025% de PSA (100 mg/mL) e 0,1% de TEMED, em um volume final de 2 mL. Preparados os géis, a eletroforese em SDS-PAGE foi realizada em um sistema duplo de placas SE 250 Mighty Small (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA).

As amostras foram dissolvidas no tampão de amostra (tampão Tris/HCl 0,08M, pH 6,8, contendo 10% de glicerol, 0,002% de bromofenol e 2% de SDS). Para a preparação das amostras reduzidas foi empregada uma solução de 1,0M de ditiotreitol no mesmo tampão.

A corrida eletroforética foi realizada em temperatura ambiente, em tampão Tris-HCl 0,025M, glicina 0,18M, pH 8,3, contendo 0,1% (m/v) de SDS com duração de, aproximadamente, 2 horas sob corrente de 30mA.

A coloração do gel, após a corrida foi feita em uma solução de Coomassie Blue R-250 0,25% dissolvida em metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5; v:v:v) durante 2 horas. A remoção do excesso de corante para melhor visualização das bandas de proteínas foi efetuada por lavagem numa solução descorante, contendo metanol, ácido acético e água destilada (4:1:5; v:v:v).

2.2. Ensaios in vivo

2.2.1. Efeito dos inibidores sobre o desenvolvimento larval dos lepidópteros

A) Sobrevivência e peso médio larval

Para examinar os efeitos de DMTI-II e DMTI sobre o desenvolvimento de larvas de *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*, dietas artificiais contendo os inibidores nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2% (w/w) foram fornecidas aos insetos. Para cada dieta de cada espécie de inseto, 5 ovos foram colocados em potes plásticos claros contendo 200 mg de dieta artificial, e fechados hermeticamente. Cada tratamento foi repetido 10 vezes

(n = 5 x 10). Após 22 dias de incubação a 28 °C e umidade relativa de 65-70%, as larvas sobreviventes foram contadas e o peso individual foi determinado. Dietas sem a adição de DMTI-II e DMTI foram preparadas e fornecidas a larvas, constituindo assim o grupo controle de cada tratamento.

B) Consumo e utilização do alimento

Para realização dos estudos de consumo e utilização de alimento, ao fim do período de alimentação necessário para as larvas atingirem o 4º instar, a dieta restante foi retirada do pote plástico e pesada, assim como as fezes depositadas pelas larvas. Para determinação dos índices nutricionais a metodologia de Scriber & Slansky Jr (1981) foi adotada. Para o cálculo desses índices, foram utilizados os seguintes parâmetros: (T): duração do período de alimentação em dias; (Ar): peso do alimento fornecido ao inseto; (Ar): peso da sobra do alimento fornecido; (F): peso das fezes produzidas; (B): ganho de peso pelo inseto; (C): peso médio das larvas; (I): peso do alimento ingerido; (I – F): alimento assimilado e (M): alimento metabolizado ($M = (I - F) - B$). Os parâmetros Ar, F, B, C, I e (I – F) só foram considerados durante o período de alimentação (T).

Com base nestes parâmetros, foram determinados os índices de consumo e utilização para cada tratamento, através das seguintes fórmulas:

- *Digestibilidade aparente (%)*: $AD = \frac{I - F}{I} \times 100$

- *Eficiência de conversão do alimento ingerido (%)*: $ECI = \frac{B}{I} \times 100$

- *Eficiência de conversão do alimento digerido (%)*: $ECD = \frac{B}{I - F} \times 100$

- *Custo metabólico (%)*: $CM = 100 - ECD$

C) Ação dos inibidores na atividade enzimática do inseto

Após o ensaio de alimentação com dieta artificial contendo ou não o inibidor, as enzimas presentes no fluido intestinal (IM) e nas fezes são submetidas ao ensaio tríptico e antitríptico com a finalidade de analisar a resposta das proteinases de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* frente à ação de DMTI-II ou de DMTI. As alíquotas enzimáticas são incubadas por 20 min a 37°C com o substrato sintético BAPNA, e a hidrólise é acompanhada fotometricamente a 410 nm. A atividade enzimática é determinada pela quantidade em nmol de BAPNA hidrolisado.

As alíquotas do IM das fezes são submetidas à detecção da atividade tríptica numa eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina. Após a eletroforese a 5 °C, o gel é lavado com uma solução de Triton X-100 a 2,5% por 30 minutos sob agitação para retirada do SDS. Em seguida, o gel é incubado com 100 mL de solução ativadora (100 mM de Tris-HCl contendo 40 µl de β-mercaptoetanol e 200 µl de Trinton X-100 a 95%) por 2 a 3 horas. Após esse período, o gel é submetido à coloração com Coomassie brilliant Blue R-250. Quando o inibidor sintético específico para tripsina é utilizado (TLCK), o fluido intestinal é submetido à pré-incubação com 1mM de TLCK numa temperatura de 37°C durante 20 minutos.

No ensaio antitríptico, o fluido intestinal (IM) das larvas lepidópteras alimentadas com dieta controle e com dieta contendo inibidor é incubado com concentrações crescentes (2,4,6 e 8 µg) de DMTI-II ou de DMTI, e a atividade tríptica residual do IM é analisada através da hidrólise de BAPNA.

3. Estudo da ação farmacológica dos inibidores de *Dimorphandra mollis*.

3.1. Efeito de DMTI-II e DMTI na indução de edema de pata de rato

Ratos Wistar machos (120 ± 150 g) foram anestesiados superficialmente com halotano e o edema de pata foi induzido pela injeção subcutânea na região subplantar de DMTI-II ou DMTI, dissolvidos em solução salina estéril, num volume final de 0,1 mL, e concentrações (doses) finais de 3, 10, 30 e 100 $\mu\text{g/pata}$. O volume da pata foi medido através de um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile, Itália), imediatamente antes da injeção (basal) e em intervalos de 0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 24 horas após a injeção dos inibidores. A injeção subplantar de solução salina estéril (SAL) e carragenina foram realizadas em grupos de animais controle.

3.2. Estudo do mecanismo de ação de DMTI-II na indução de edema

Grupos de ratos ($n = 6$) foram pré-tratados com diferentes drogas, tais como: (1) mepiramina (2 mg/kg, i.p., 60 min antes), um antagonista do receptor H1 que bloqueia competitivamente a resposta do tecido alvo mediada pelo receptor H1; (2) ciproheptadina (2 mg/kg, i.p., 30 antes), um duplo antagonista que além de inibir receptores da histamina, também atua nos receptores da serotonina; e finalmente, heparina (50 U/pata), uma molécula polianiónica que pode reduzir a ação de compostos com cargas catiónicas e que foi co-injetada com o inibidor. Após os pré-tratamentos, os ratos foram submetidos ao procedimento anterior para a indução de edema de pata pela injeção subcutânea na região subplantar de DMTI-II, cuja dose escolhida foi de 30 $\mu\text{g/pata}$. O volume da pata foi medido imediatamente antes da injeção (basal) e em intervalos de $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4 horas após a injeção. Ratos que não receberam o pré-tratamento com as drogas descritas constituem os grupos controle do experimento.

3.3. Efeito de DMTI-II na desgranulação *in vitro* de mastócitos peritoneais de ratos

3.3.1. Isolamento de mastócitos peritoneais

Mastócitos provenientes da cavidade peritoneal de 4-6 animais foram purificados em gradiente de Percoll como descrito previamente por Enerback & Syensson (1980). Para isto, os ratos foram exsangüinados sob anestesia e 10 mL de solução tampão fosfato Krebs-Ringer (KRP; pH 7,3) foram injetados na cavidade peritoneal. O abdômen foi gentilmente massageado e o fluido coletado, em tubo cônico de polipropileno, centrifugado (300 g, 5 min, 4°C). O precipitado resultante (no qual os mastócitos representaram cerca de 10% das células) foi reconstituído em KRP e submetido ao gradiente isotônico de percoll durante 10 min à temperatura ambiente, antes de ser centrifugado por 25 min (150 g, 4°C). A zona do gradiente que contém os mastócitos foi separada e lavada duas vezes com KRP. A contagem total de células foi realizada em câmara de Neubauer e a contagem diferencial foi realizada em lâminas confeccionadas em citocentrífuga, coradas com May-Grünwalds. Em todos os protocolos experimentais realizados a pureza das células obtidas foi em torno de 80% de mastócitos. A viabilidade dos mastócitos foi também avaliada com o uso do corante azul de Tripán, sendo que 80% das células foram consideradas viáveis.

3.3.2. Liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos

Alíquotas (0,5 mL) da suspensão de mastócitos, purificados segundo item 3.3.2, foram incubados à 37°C por 10 min. Os estímulos (DMTI-II e composto 48/80) foram adicionados a suspensão (perfazendo um volume final de 1 mL e 2×10^6 células) e incubados por 30 min. A seguir, interrompeu-se a reação colocando-se os tubos em banho de gelo. As células foram então centrifugadas (450g, 10 min) e os sobrenadantes foram removidos e colocados em outros tubos. Aos sobrenadantes e precipitados foram adicionados respectivamente 100 µl de HCl 1mol/l e 1 mL de HCl 0,1 mol/l, ambos em KRP. A seguir, os tubos foram colocados em banho fervente por 10 min para liberação da

histamina residual. As concentrações de histamina foram determinadas por espectrofluorometria (Shore *et al.*, 1959; Giraldeho *et al.*, 1994), através da marcação da histamina com *o*-phthaldialdehyde (OPT; 80 µl, solução 1% em metanol). A liberação de histamina foi expressa como porcentagem de liberação no sobrenadante em relação ao conteúdo celular total.

3.4. Edema de pata em ratos tratados com capsaicina

O tratamento de ratos neonatos com capsaicina foi realizado de acordo com JANCSÓ e cols. (1967). No segundo dia de vida, os ratos de ambos os sexos (7-8 g) são anestesiados superficialmente com halotano e neles, injetados subcutaneamente, na região dorsal, uma dose única de capsaicina (50 mg/kg, 100 µl). Os ratos controle recebem a injeção do veículo (1:1:8; Tween 80:etanol:NaCl 0.9%) no volume de 100 µl. Após tratamento, os ratos são mantidos aquecidos e sob observação por 1 hora, quando, então, são colocados junto às respectivas mães, retornando ao biotério de manutenção. Os ratos são amamentados até o 21º dia de vida e, então, separados da mãe e alojados em gaiolas coletivas e separados por sexo. Os animais são utilizados aleatoriamente para os diversos protocolos em diferentes tempos pós-tratamento (60°-70° dias).

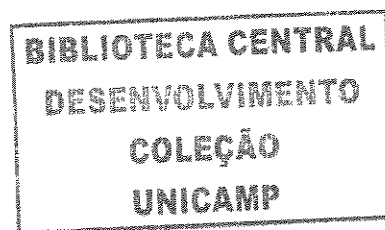
Após o tratamento com capsaicina, os ratos foram submetidos ao procedimento de indução de edema de pata conforme descrito no item 3.1. O inibidor DMTI-II foi dissolvido em solução salina estéril, sendo a concentração escolhida de 30 µg/pata. O volume da pata foi medido de acordo com a metodologia já descrita anteriormente nos intervalos ¼, ½, 1, 2 e 3 horas após a injeção do inibidor. A injeção subplantar de DMTI-II (30 µg/pata) foi também realizada no grupo controle dos animais tratados com capsaicina.

3.5. Edema de pata em rato induzido por DMTI-II e liberação de bradicinina

Para verificar se o edema de pata de rato induzido DMTI-II era devido à liberação de bradicinina, os seguintes experimentos foram realizados: grupos de ratos ($n = 6$) foram pré-tratados com as seguintes drogas: HOE 140 (Icatiban), um antagonista do receptor de bradicinina (0,6 mg/kg, i.p., 20 min antes); Indometacina, um potente inibidor da ciclooxigenase (5 mg/kg, i.p., 30 min antes); SR140333, um antagonista de receptores NK_1 (100 μ g/kg, i.v., 5 min antes); SR48968, antagonista de receptores NK_2 (1 mg/kg, i.v., 5 min antes). Após os pré-tratamentos, os ratos foram submetidos ao procedimento padrão para a indução de edema de pata pela injeção subcutânea na região subplatar de DMTI-II, cuja dose escolhida foi de 30 μ g/pata. O volume da pata foi medido imediatamente antes da injeção (basal) e em intervalos de $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4 horas após a injeção. Ratos que não receberam o pré-tratamento com as drogas descritas constituem os grupos controle do experimento. Também foi feito um grupo de animais controle que receberam a injeção subplatar de bradicinina (50 μ g/pata).

3.6. Análise estatística

Os resultados obtidos na indução de edema de pata de rato estão expressos como aumento do volume da pata (mL) em relação ao valor basal (sem estímulo), e representam a média de seis animais $\pm$ erro padrão (SE). Os valores encontrados foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) sendo escolhido o teste de Bonferroni, onde $P < 0,05$ foi considerado como significativo.



V. RESULTADOS

1. Caracterização físico-química dos inibidores isolados de sementes de *Dimorphandra mollis*.

1.1. Efeito da temperatura na atividade inibitória

A Figura 5 mostra o efeito das diferentes temperaturas na atividade inibitória de DMTI e DMTI-II, que foram incubados por 20 minutos nas temperaturas de 37, 50, 60, 80 e 100°C. A atividade residual dos inibidores foi determinada através da atividade enzimática da tripsina que foi acompanhada pela hidrólise do substrato BAPNA.

Nota-se que até 50°C, a atividade inibitória de ambos é ainda bastante alta, sendo que DMTI-II e DMTI sofreram uma perda, respectivamente de 20% e 10% na sua atividade. Quando aquecidos a 60 °C, enquanto DMTI-II sofre um decréscimo de 40%, DMTI perde apenas 20% de sua atividade, mostrando uma diferença na estabilidade entre eles. Na temperatura de 80°C, é mostrado que enquanto DMTI-II perde cerca de 80% de sua atividade, DMTI sofre um decréscimo de aproximadamente 67%. Já a 100 °C, a diferença na atividade residual de ambos não é tão marcante, pois DMTI apresenta cerca de 16% enquanto DMTI-II possui 14% de sua atividade.

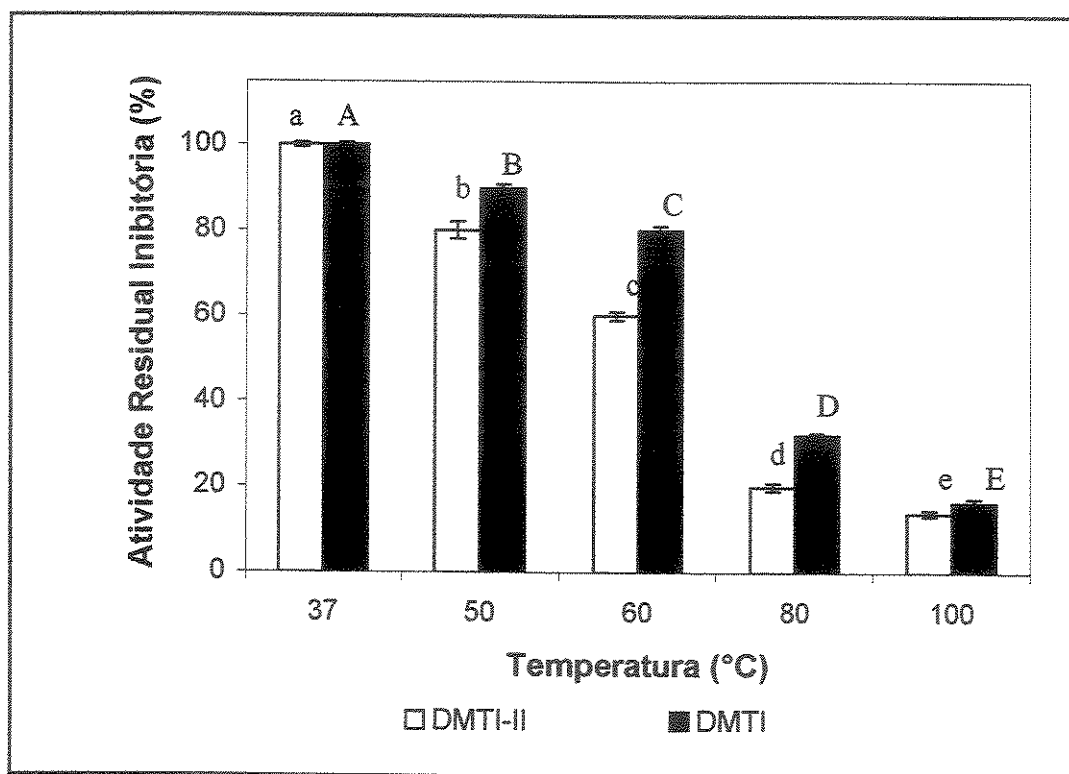


Figura 5 – Efeito da temperatura na atividade inibitória de DMTI e DMTI-II. A atividade residual dos inibidores foi determinada pela hidrólise do substrato BAPNA (0,1mM), após 20 minutos de incubação nas referidas temperaturas. Cada valor representa a média $\pm$ SD de 3 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si e com o controle de um mesmo grupo. Análises estatísticas mostraram que DMTI e DMTI-II diferem-se significativamente entre si ($*P < 0,01$) nos 4 níveis de temperatura (50, 60, 80 e 100 °C) (ANOVA, teste de Tukey).

1.2. Efeito do pH na atividade inibitória

Os inibidores de *D. mollis* foram submetidos a diferentes valores de pH, sendo incubados com tampões apropriados, de acordo com o método descrito. A atividade residual dos inibidores foi determinada através da atividade enzimática da tripsina, que foi acompanhada pela hidrólise do substrato BAPNA. A Figura 6 ilustra a comparação da estabilidade de DMTI e DMTI-II, os quais mostraram-se estáveis em uma ampla faixa de pH, sendo pouco sensíveis a valores extremos. Neste experimento, também foi observado que DMTI é relativamente mais resistente que DMTI-I.

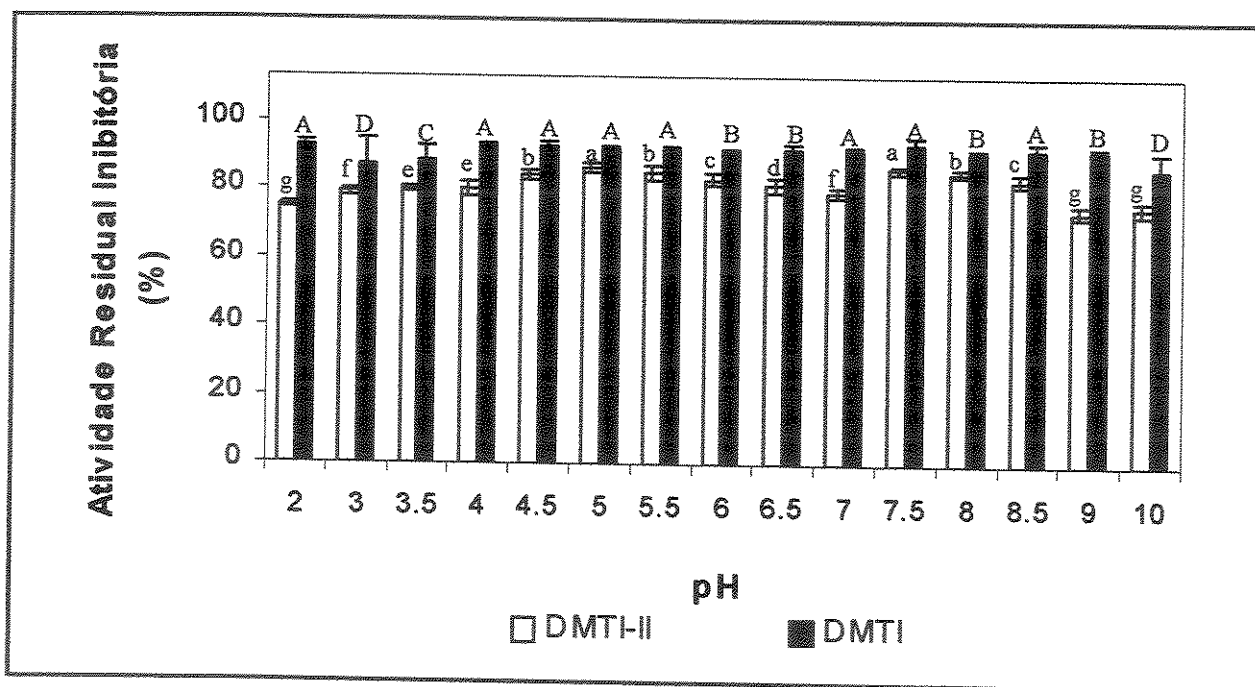


Figura 6 – Efeito do pH na estabilidade da atividade de DMTI e DMTI-II. A atividade residual dos inibidores foi determinada através da atividade enzimática da tripsina, que foi acompanhada pela hidrólise do substrato BAPNA. Os tampões utilizados, na concentração de 0,1M, foram: citrato de sódio (pH 2; 3; 3,5; 4), acetato de sódio (pH 4,5; 5; 5,5), fosfato de sódio (pH 6; 6,5; 7), Tris-HCl (pH 7,5; 8; 8,5) e bicarbonato de sódio (pH 9; 10). Cada valor representa a média $\pm$ SD de 3 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo. Análises estatísticas mostraram que DMTI e DMTI-II diferem-se significativamente entre si com $P < 0,001$ em todos os valores de pH (*ANOVA*, teste de Tukey).

1.3. Efeito do DTT na atividade inibitória dos inibidores DMTI e DMTI-II

Amostras de DMTI e DMTI-II foram incubadas com DTT, nas concentrações finais de 1, 10 e 100 mM, em intervalos de tempo de 15, 30, 60 e 120 minutos. A Figura 7 mostra os resultados obtidos após ensaio enzimático para verificação da estabilidade da atividade inibitória. DMTI e DMTI-II mostraram-se estáveis, sendo pouco sensíveis ao DTT, mesmo quando este se encontrava numa concentração final de 100 mM. Observou-se pouca redução em sua atividade residual após 2 horas de incubação com o agente desnaturante.

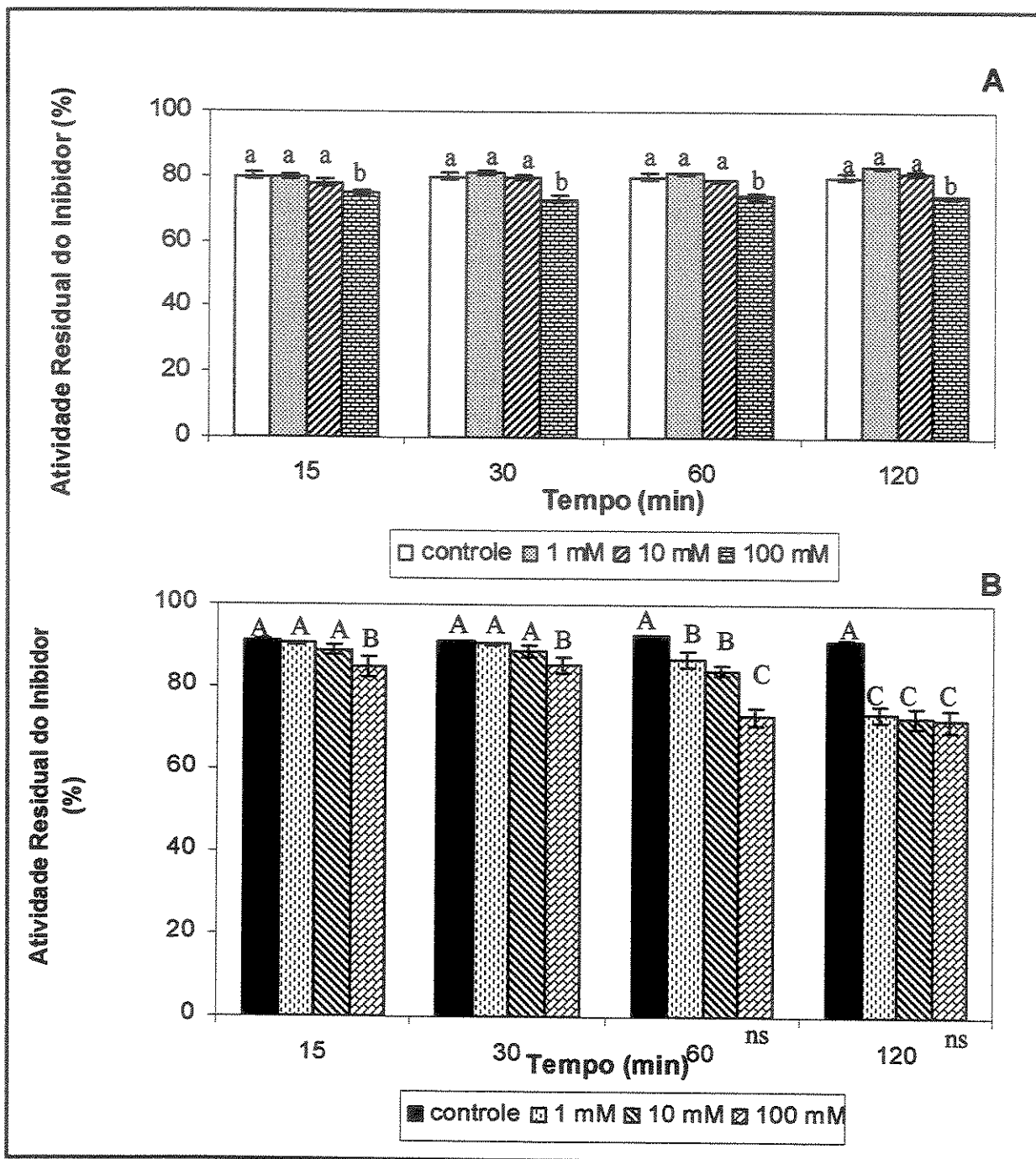


Figura 7 – Efeito do desnaturante DTT na atividade inibitória de DMTI-II (A) e DMTI (B). A atividade enzimática das amostras incubadas com as diferentes concentrações finais de DTT (1mM, 10mM e 100mM) foi determinada pela hidrólise do substrato BAPNA (0,1mM). Cada valor representa a média $\pm$ SD de 3 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo. Análises estatísticas mostraram que DMTI e DMTI-II diferem-se significativamente entre si com $P < 0,01$, mas na concentração de 100mM, nos tempos de 60 e 120 min, nenhuma diferença significativa (^{ns}) foi observada entre DMTI e DMTI-II (ANOVA, teste de Tukey).

1.4. Efeito da uréia na atividade inibitória de DMTI e DMTI-II

Conforme ilustra a Figura 8, a uréia não apresentou efeitos significativos na eficiência inibitória de DMTI e DMTI-II. Mais uma vez foi observado que DMTI aparenta ser mais resistente que DMTI-II, o que foi evidenciado quando foram submetidos à concentração máxima de uréia (8M) e as atividades residuais foram comparadas.

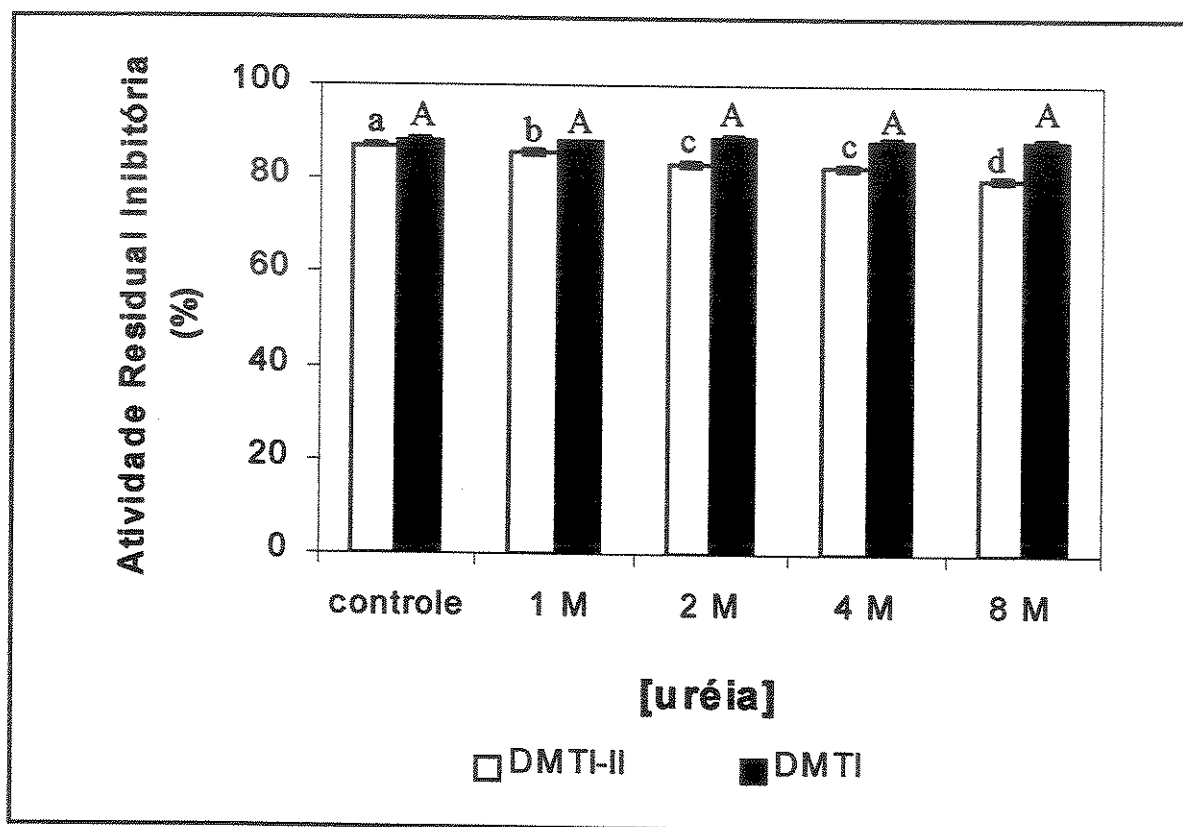


Figura 8 – Efeito de concentrações crescentes de uréia sobre a atividade dos inibidores de *D. mollis*, DMTI e DMTI-II, após incubação por 60 minutos, à 37°C. A atividade residual foi determinada pela hidrólise do substrato BAPNA, em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0. Cada valor representa a média $\pm$ SD de 3 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo. Análises estatísticas mostraram que DMTI e DMTI-II diferem-se significativamente entre si com $P < 0,01$ em todos os tratamentos (ANOVA, teste de Tukey).

1.5. Efeito do cloreto de guanidina na atividade inibitória de DMTI e DMTI-II

O agente redutor cloreto de guanidina (GdmCl) apresentou um maior efeito na estabilidade de DMTI-II conforme ilustrado na Figura 9. Os inibidores quando incubados com 4 M de GdmCl apresentaram uma diferença maior na sua atividade residual; enquanto DMTI-II perdeu cerca de 45%, DMTI sofreu um decréscimo de 14%. Quando na concentração máxima (6M), o agente causou um decréscimo de 50% na atividade inibitória de DMTI-II enquanto que DMTI apresentou apenas 23% na redução de sua eficiência inibitória.

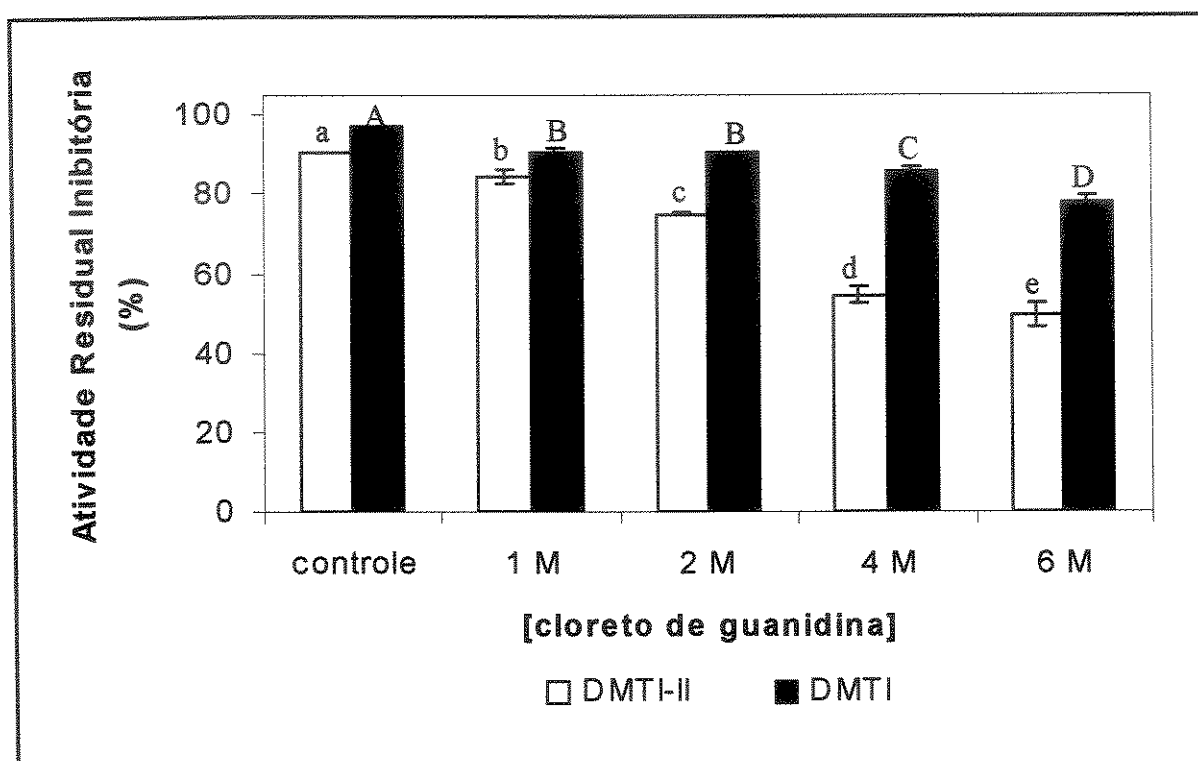


Figura 9 – Efeito de cloreto de guanidina na estabilidade da atividade inibitória de DMTI e DMTI-II. A atividade residual dos inibidores foi determinada pela hidrólise do substrato BAPNA, em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 8,0, imediatamente após o período de incubação (60 minutos) à 37°C das amostras nas crescentes concentrações do agente redutor. Cada valor representa a média $\pm$ SD de 3 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo. Análises estatísticas mostraram que DMTI e DMTI-II diferem-se significativamente entre si com $P < 0,01$ em todos os tratamentos (ANOVA, teste de Tukey).

1.6. Dicroísmo circular de DMTI e DMTI-II

As Figuras 10, 11, 12 e 13 ilustram os resultados obtidos nos experimentos de dicroísmo circular de DMTI e DMTI-II.

Em água, os dois inibidores apresentam uma estruturação desordenada ou randômica evidenciada pela presença de uma banda negativa em torno de 203 nm para DMTI e DMTI-II. Concentrações crescentes de TFE não foram capazes de induzir uma alteração no estado conformacional do inibidor DMTI-II (Figura 10); no entanto quando o mesmo experimento foi realizado com DMTI uma nítida alteração foi observada (Figura 11).

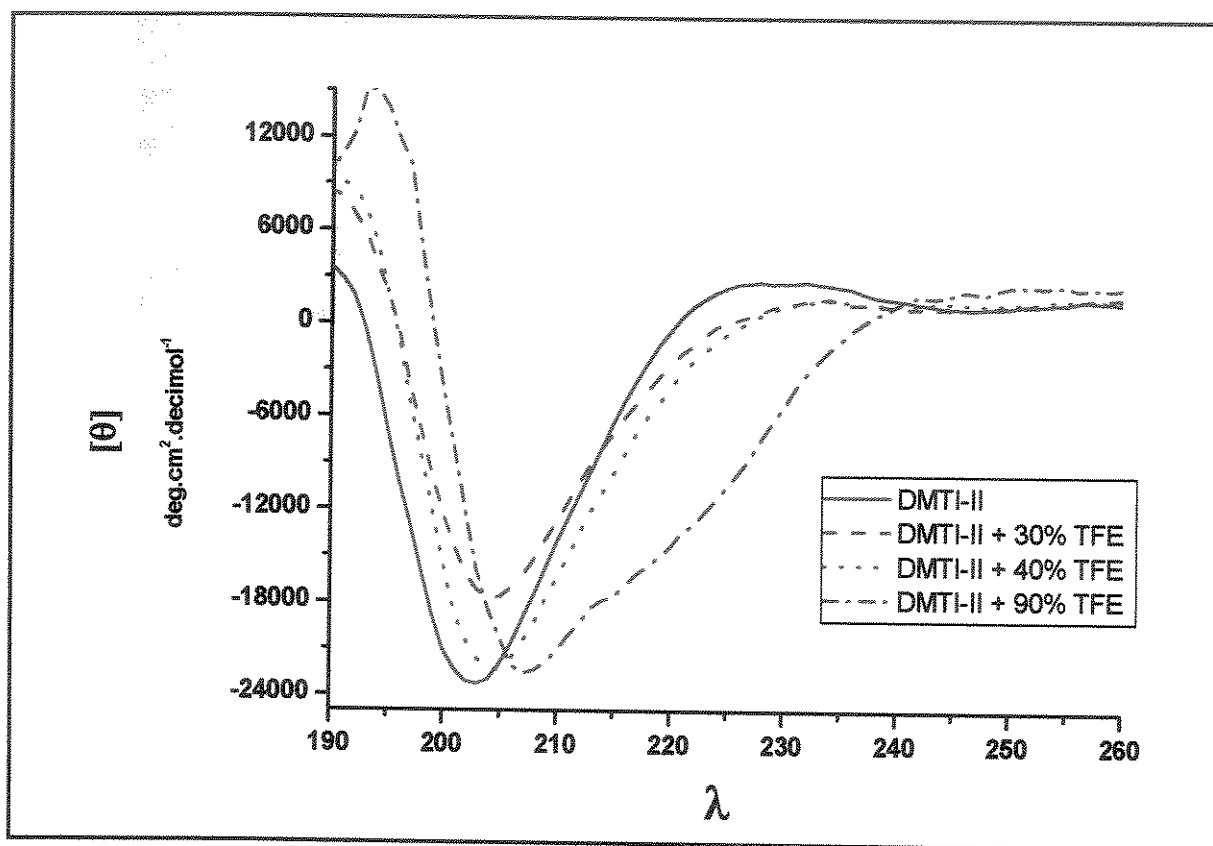


Figura 10 – Espectros do dicroísmo circular de DMTI-II (17 μM) na presença de concentrações crescentes de TFE. Os espectros foram obtidos utilizando uma cubeta de quartz (1mm), na região de 190 a 260 nm, numa velocidade de 50 nm/min, a 25 °C, num espectropolarímetro (JASCO J-810). Cada espectro é resultante da média de 4 scans.

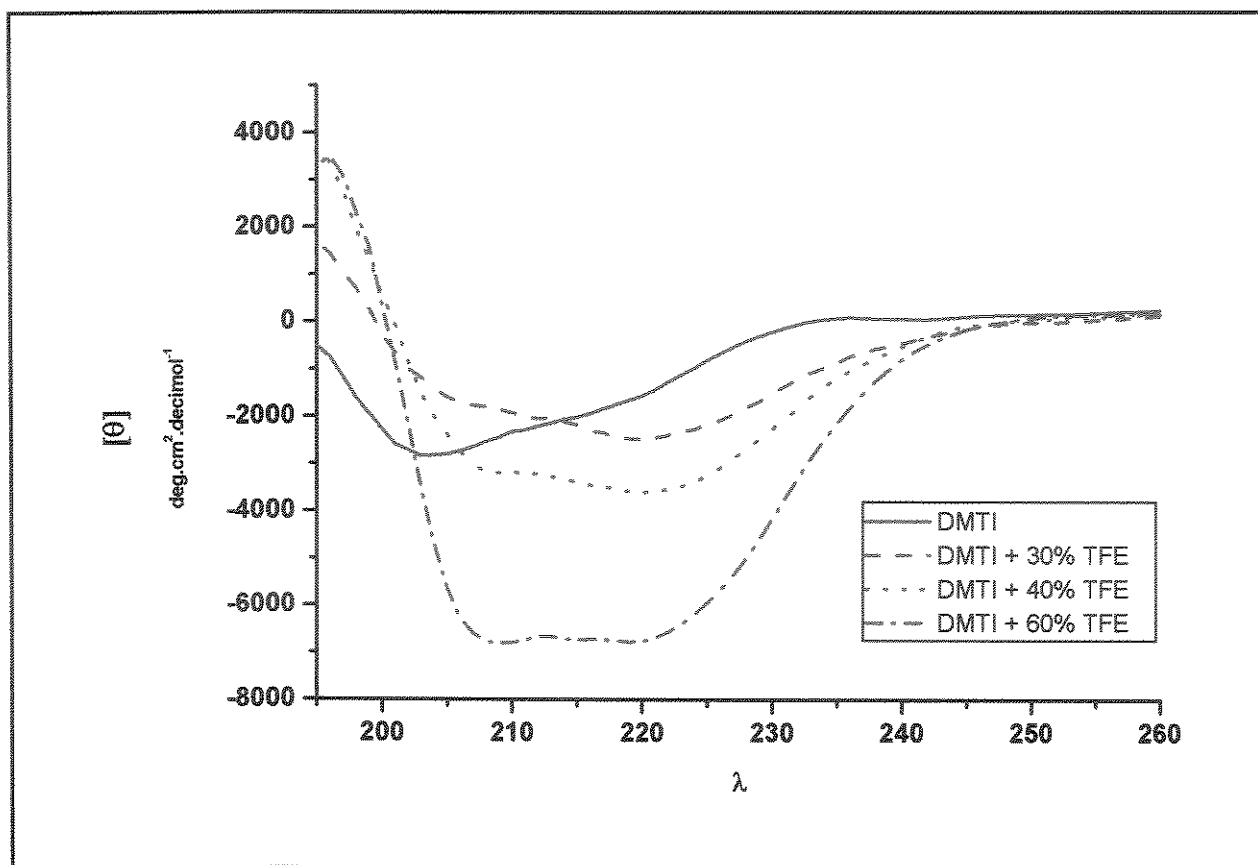


Figura 11 – Espectros do dicroísmo circular de DMTI (15 μ M) na presença de concentrações crescentes de TFE. Os espectros foram obtidos utilizando uma cubeta de quartz (1mm), na região de 190 a 260 nm, numa velocidade de 50 nm/min, a 25 °C, num espectropolarímetro (JASCO J-810). Cada espectro é resultante da média de 4 scans.

As Figuras 12 e 13 ilustram os espectros obtidos de DMTI-II e DMTI, respectivamente na presença de SDS e TFE, mostrando diferenças na transição conformacional.

Quando adicionado o SDS (100 mM), o espectro de DMTI-II manteve o mesmo comportamento, enquanto que o do DMTI, mostra uma suave modificação. A adição de TFE (40%) induziu uma transição conformacional no inibidor DMTI, favorecendo uma

propensão à formação de α -hélice. Estes resultados mostram que o inibidor mais estável, DMTI, apresenta uma maior potencialidade em se estruturar.

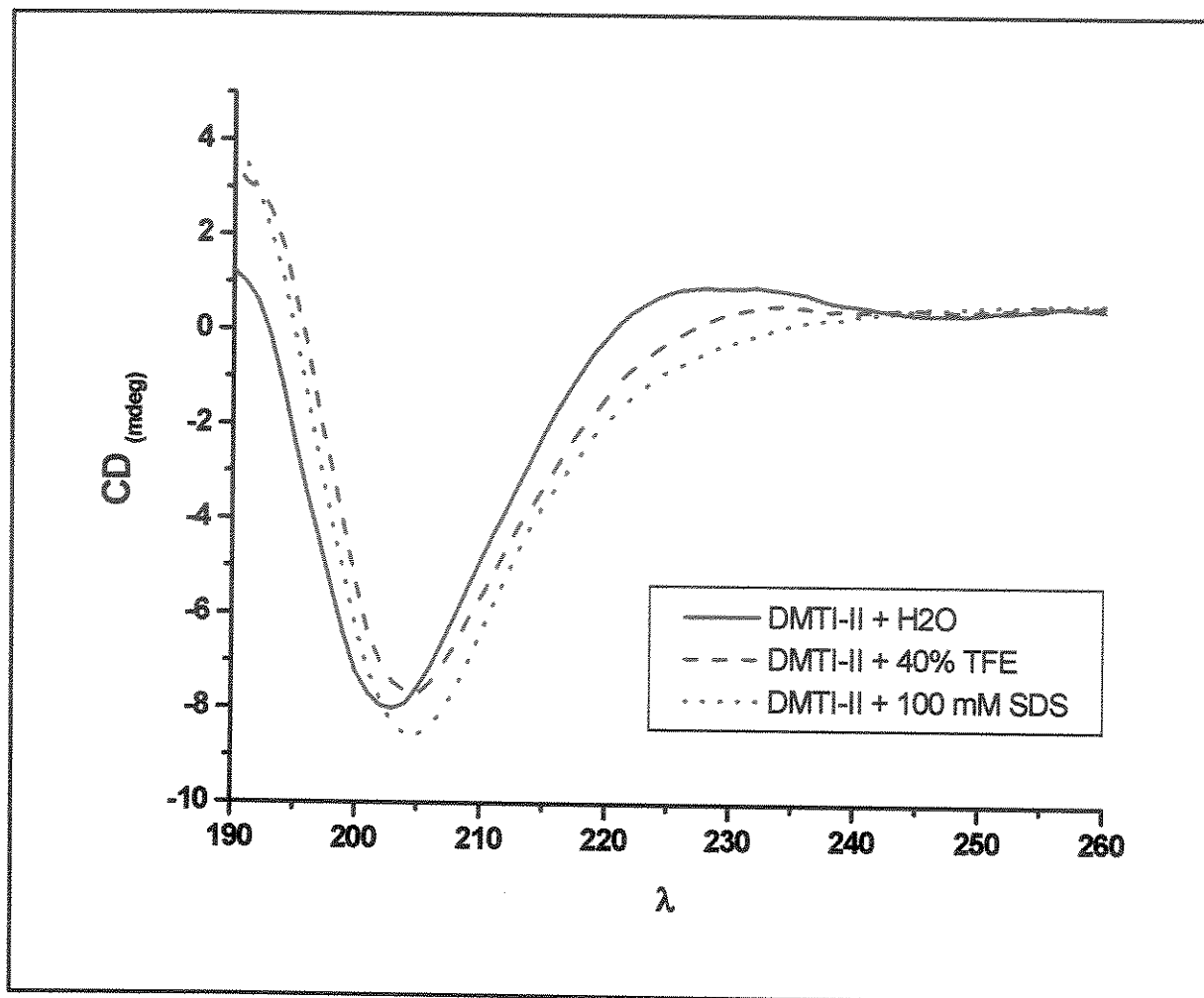


Figura 12 – Espectros do dicroísmo circular de DMTI-II (17 μ M) na presença de SDS (100 mM) e TFE (40%). Os espectros foram obtidos utilizando uma cubeta de quartz (1mm), na região de 190 a 260 nm, numa velocidade de 50 nm/min, a 25 °C, num espectropolarímetro (JASCO J-810). Cada espectro é resultante da média de 4 scans.

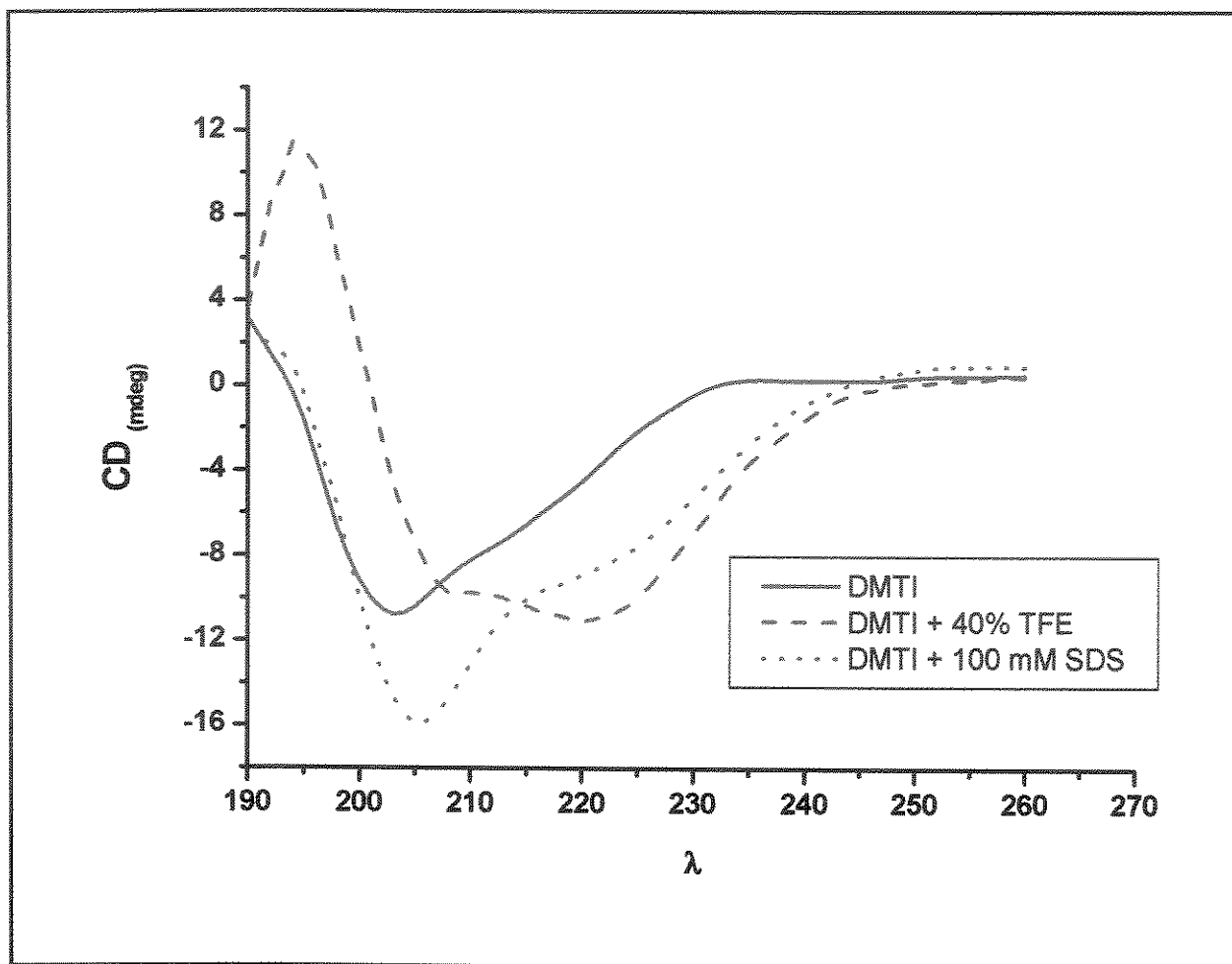


Figura 13 – Espectros do dicroísmo circular de DMTI (15 uM) na presença de SDS (100 mM) e TFE (40%). Os espectros foram obtidos utilizando uma cubeta de quartz (1mm), na região 190 a 260 nm, numa velocidade de 50 nm/min, a 25 °C, num espectropolarímetro (JASCO J-810). Cada espectro é resultante da média de 4 scans.

1.7. Calorimetria de DMTI-II

O estudo calorimétrico revelou que DMTI-II apresenta um $T_m = 70\text{ °C}$ e uma transição irreversível (Figura 14). Este resultado confirmou aquele obtido no estudo do efeito da temperatura na atividade inibitória de DMTI-II (Figura 5). Quando o inibidor é aquecido acima de sua T_m , a reação é irreversível, provavelmente porque as pontes

dissulfeto que estão presentes não se recuperam apropriadamente, assim o inibidor perde sua estrutura e conseqüentemente sua atividade.

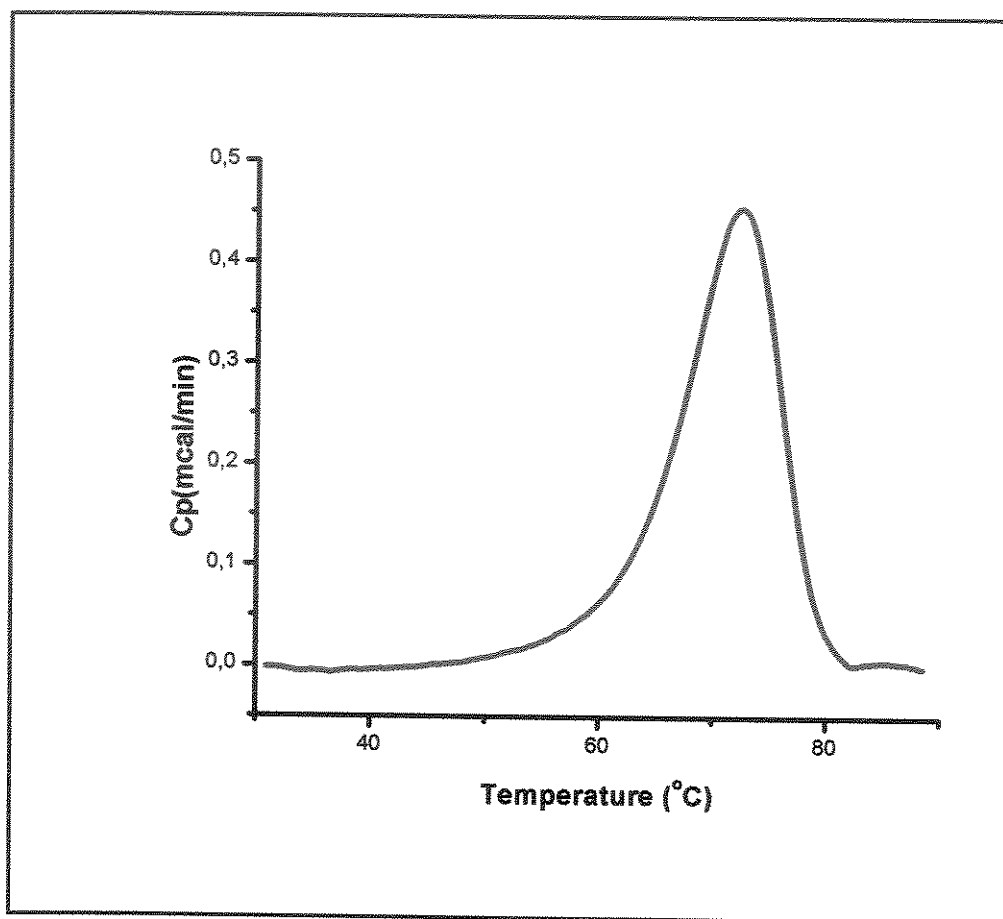


Figura 14 – Curva resultante do estudo de desnaturação de DMTI-II (1mg/ml) em tampão fosfato de sódio 10 mM, pH 7,4. as corridas foram realizadas num fluxo de 90 °C/hora. Os dados obtidos foram subtraídos de uma linha de base do tampão utilizado.

2. Estudo da atividade inseticida dos inibidores isolados de sementes de *D. mollis*

2.1. Ensaaios *In vitro*

2.1.1. Efeito dos inibidores DMTI e DMTI-II sobre as enzimas digestivas de *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*

A Figura 15 ilustra o resultado da incubação de concentrações crescentes dos inibidores DMTI e DMTI-II com o homogenato de intestinos médios de larvas do lepidóptero *Anagasta kuehniella*.

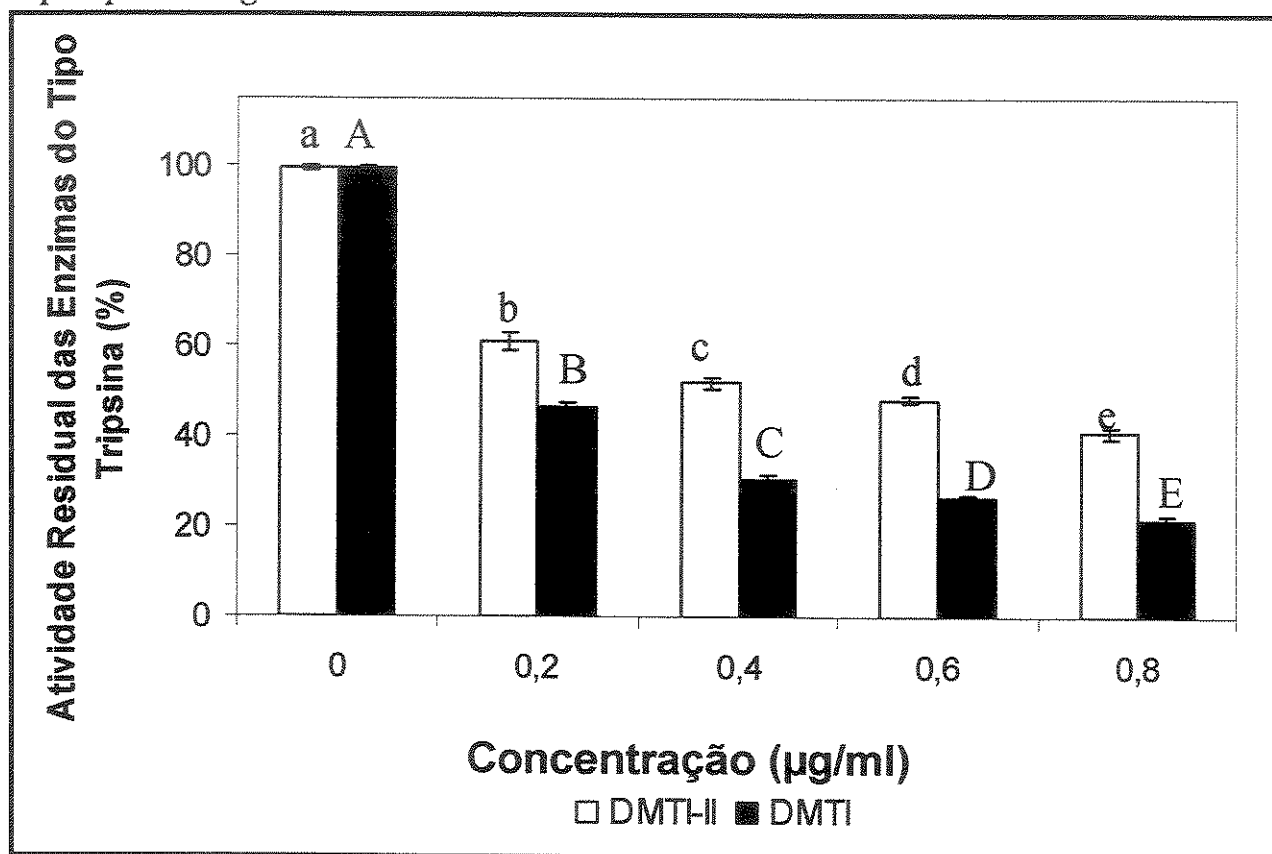


Figura 15 - Efeito dos inibidores de *D. mollis* sobre as enzimas digestivas de *A. kuehniella*. A atividade residual das enzimas foi determinada pela hidrólise de BAPNA (0,1mM), após 15 minutos de incubação nas referidas concentrações. Cada valor representa a média $\pm$ SD de 5 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,01$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo. Análises estatísticas mostraram que efeitos de DMTI e DMTI-II diferem-se significativamente com $P < 0,01$ em todas as concentrações (ANOVA, teste de Tukey).

Os resultados obtidos na incubação das mesmas concentrações dos inibidores de *D. mollis* testadas no experimento anterior com o homogenato de intestinos médios de larvas de *Corcyra cephalonica* estão ilustrados na Figura 16. Analisando as duas figuras, notamos que, *in vitro*, as enzimas de *Corcyra cephalonica* sofreram igualmente a ação dos dois inibidores; enquanto as enzimas de *Anagasta kuehniella* foram afetadas diferentemente por ambos (Figura 15).

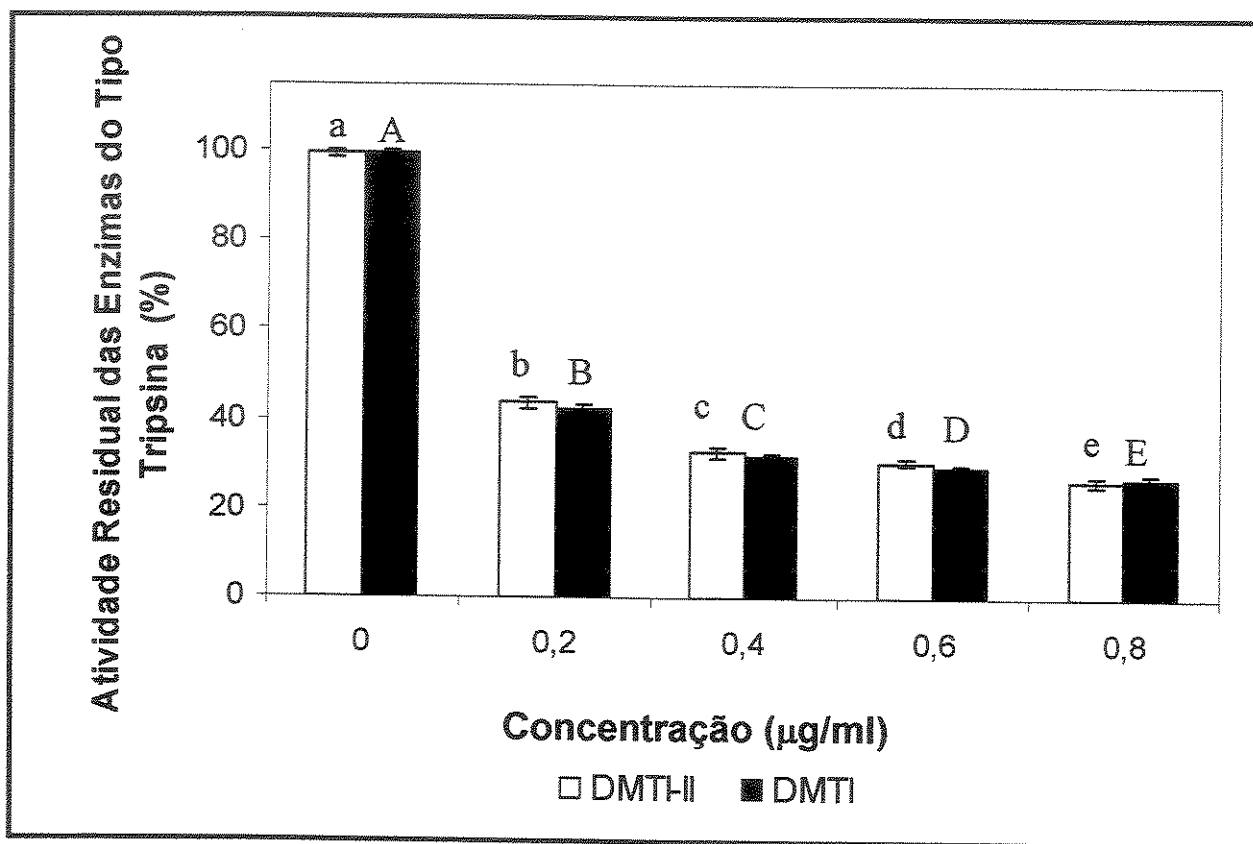


Figura 16 - Efeito dos inibidores de *D. mollis* sobre as enzimas digestivas de *C. cephalonica*. A atividade residual das enzimas foi determinada pela hidrólise de BAPNA (0,1mM), após 15 minutos de incubação nas referidas concentrações. Cada valor representa a média $\pm$ SD de 5 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,01$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo. Análises estatísticas mostraram que efeitos de DMTI e DMTI-II diferem-se significativamente com $P < 0,05$ apenas na concentração 0,6 ug/ml (ANOVA, teste de Tukey).

2.1.2. Digestibilidade *in vitro* dos inibidores de *D. mollis* por enzimas digestivas de *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*

A Figura 17 mostra os resultados analisados através de uma eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) na presença de SDS, do ensaio de digestibilidade *in vitro* dos inibidores DMTI e DMTI-II pelas enzimas presentes no homogenato de intestino médio de larvas de *Anagasta kuehniella*. Foi verificado que até 6 horas, os dois inibidores, aparentemente, não sofreram digestão enzimática pelas proteases.

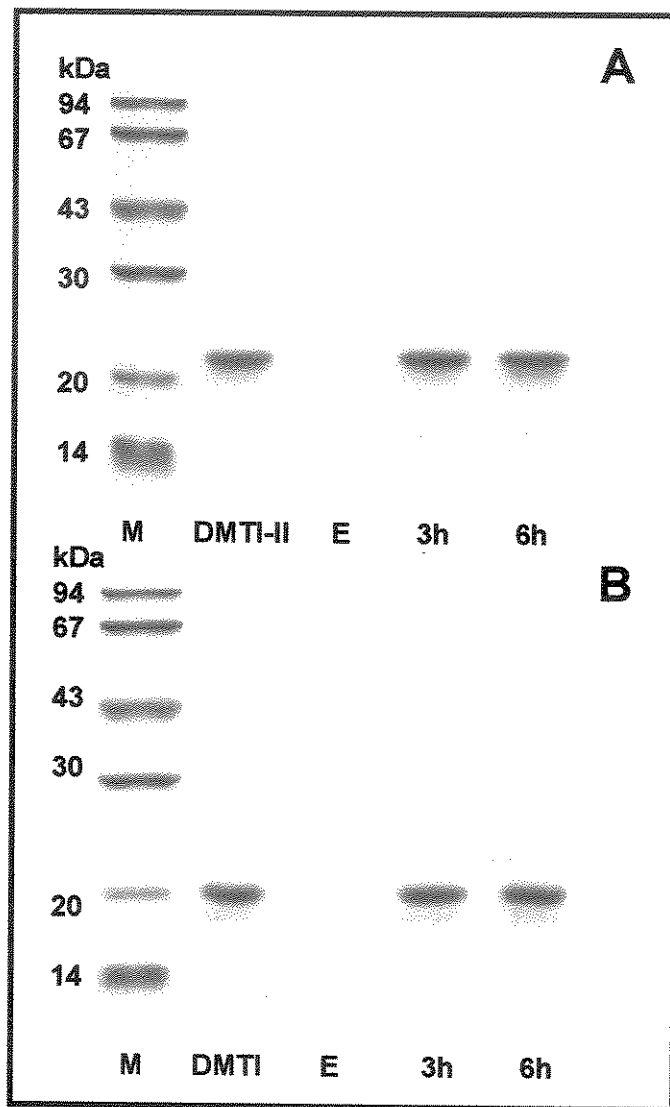


Figura 17 – Eletroforese em PAGE-SDS do ensaio de digestibilidade *in vitro* de DMTI-II (A) e DMTI (B) por proteinases do homogenato de intestino médio de larvas de *A. kuehniella* (E). Números verticais indicam o peso dos marcadores moleculares (M) em kDa. Números horizontais indicam o tempo da digestão.

Quando incubados com as proteases de *C. cephalonica* os inibidores DMTI e DMTI-II, aparentemente, não sofreram digestão enzimática até 6 horas, conforme ilustra a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS da Figura 18.

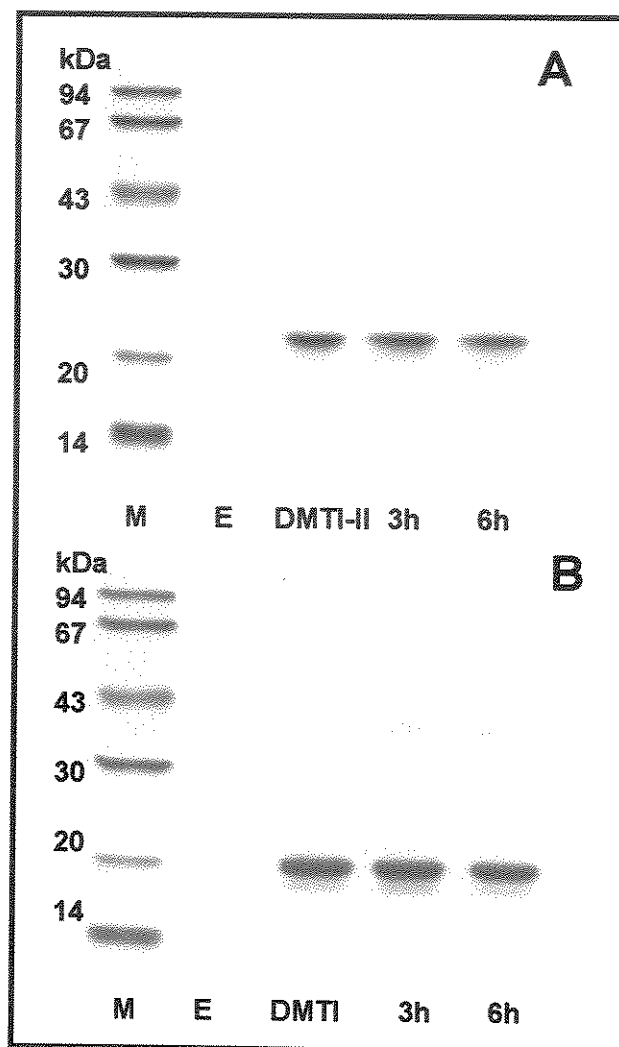


Figura 18 – Eletroforese em PAGE-SDS do ensaio de digestibilidade *in vitro* de DMTI-II (A) e DMTI (B) por proteinases do homogenato de intestino médio de larvas de *Corcyra cephalonica* (E). Números verticais indicam o peso dos marcadores moleculares (M) em kDa. Números horizontais indicam o tempo da digestão.

2.1.3. Atividade inibitória de DMTI e DMTI-II após a incubação com as enzimas digestivas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica*

Após a digestibilidade *in vitro* com as enzimas presentes no intestino médio de larvas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica*, os inibidores DMTI e DMTI-II foram submetidos a um ensaio antitriptico para verificar resistência da atividade inibitória após 6 horas de incubação.

Na Figura 19, podemos observar que até 6 horas de incubação, a atividade residual dos dois inibidores diminuiu; enquanto DMTI-II apresentava 39 % de atividade, DMTI apresentava cerca de 1% da sua atividade.

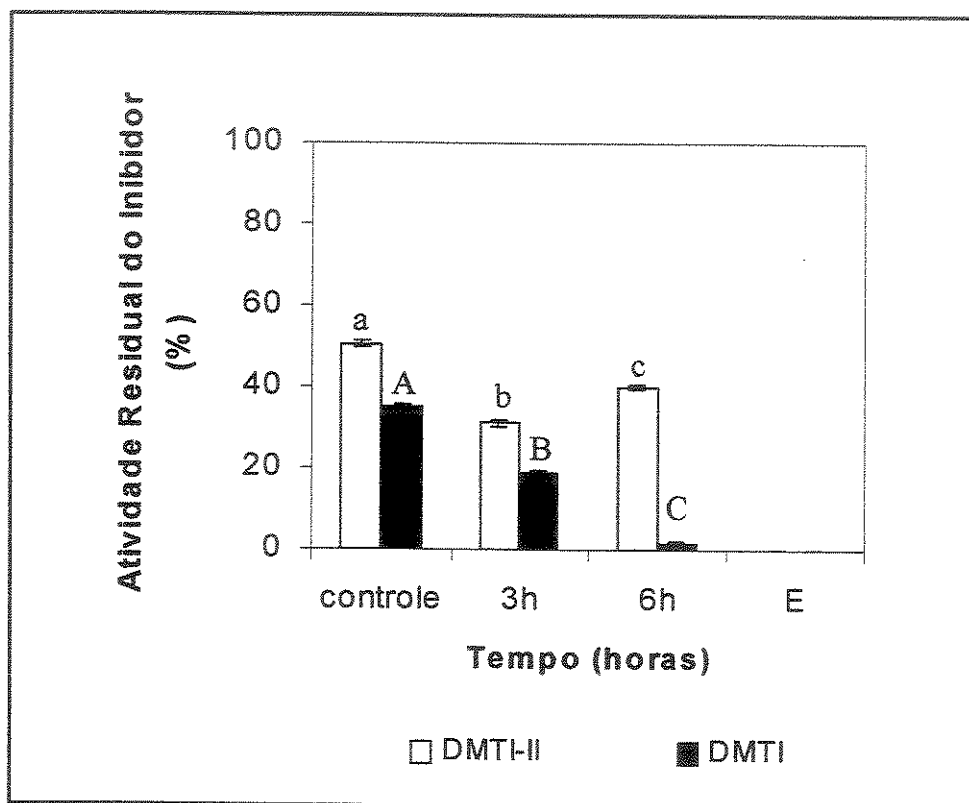


Figura 19 – Atividade residual inibitória de DMTI e DMTI-II após incubação com as enzimas digestivas do intestino médio de larvas de *Anagasta kuehniella*. Cada valor representa a média $\pm$ SD de 5 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,001$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo. Análises estatísticas mostraram que DMTI e DMTI-II diferem-se significativamente com $P < 0,01$ (ANOVA, teste de Tukey).

Quando analisamos os resultados obtidos após incubação com as enzimas de *C. cephalonica*, um decréscimo da atividade inibitória de DMTI-II e DMTI também foi observado. Após terem sido submetidos a um período de 6 horas de incubação com as proteases deste inseto, o ensaio antitriptico das alíquotas revelou que DMTI-II apresentava cerca de 32% enquanto DMTI apresentava cerca de 10% de sua atividade inibitória. Este resultado mostrou que DMTI parece ser também mais suscetível a ação das proteases de *C. cephalonica* do que DMTI-II.

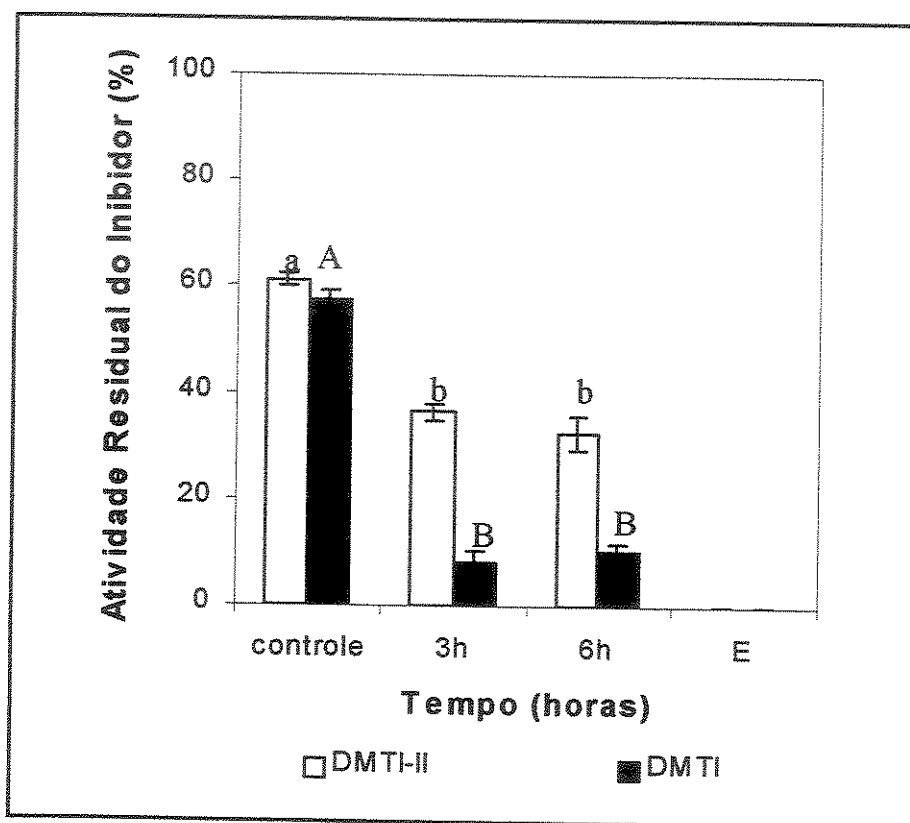


Figura 20 – Atividade residual inibitória de DMTI e DMTI-II após incubação com as enzimas digestivas do intestino médio de larvas de *Corcyra cephalonica*. Cada valor representa a média $\pm$ SD de 5 repetições. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,001$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo. Análises estatísticas mostraram que DMTI e DMTI-II diferem-se significativamente com $P < 0,01$ em todos os tempos, com exceção do tempo de 72 h (^{ns}) (ANOVA, teste de Tukey).

2.2. Ensaios *In vivo*

2.2.1. Efeito de DMTI-II sobre o desenvolvimento larval de *A. kuehniella*

A) Sobrevivência e peso médio das larvas de *A. kuehniella*

O efeito de DMTI-II sobre o lepidóptero *A. kuehniella* foi avaliado através da determinação do número de indivíduos e o peso médio das larvas de 4^o ínstar em dietas artificiais contendo quantidades crescentes de DMTI-II. O inibidor DMTI-II foi incorporado na dieta artificial aos níveis de 0,5, 1,0 e 2,0% que foi oferecida às larvas.

Em todas as concentrações, DMTI-II não apresentou efeito significativo na sobrevivência larval (Figura 21A). Quando analisamos o efeito do inibidor sobre o peso médio das larvas, foi verificado que nas concentrações de 1,0 e 2,0% de DMTI-I houve um decréscimo no peso médio larval respectivamente de 18 e 25% (Figura 21B).

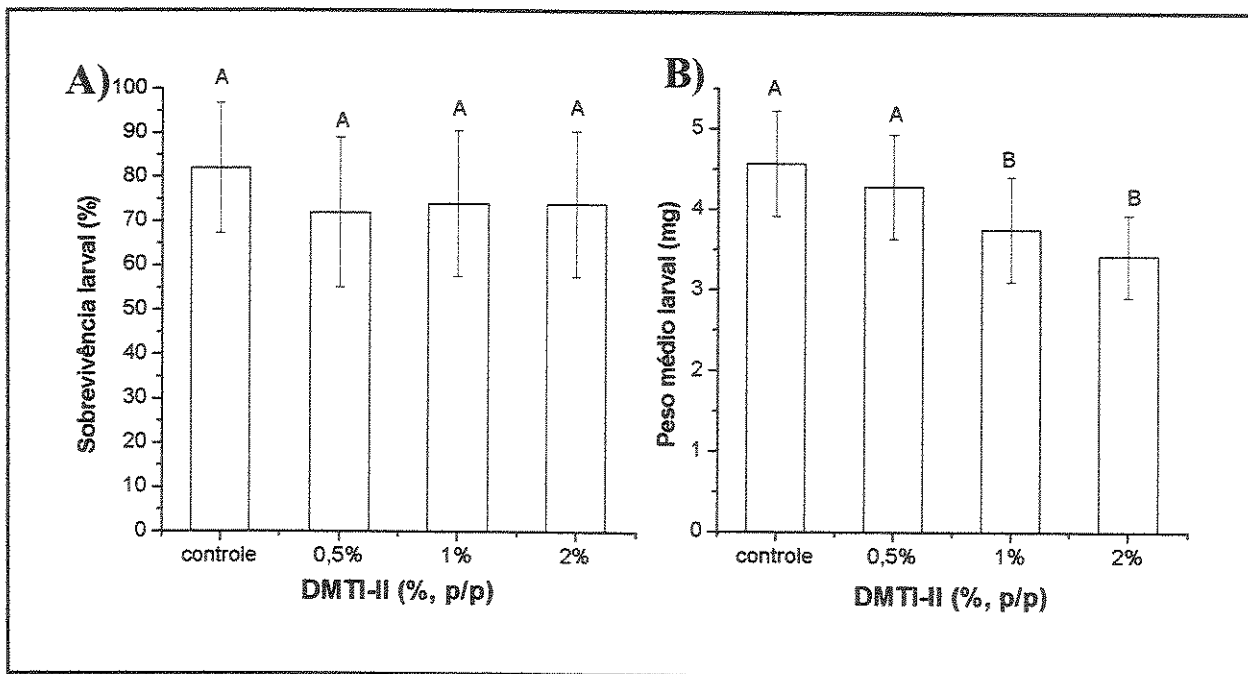


Figura 21 – Efeito de DMTI-II sobre as larvas de 24 dias de *Anagasta kuehniella* alimentadas com dieta artificial. (A) Número de larvas sobreviventes de larvas em dietas artificiais contendo quantidades crescentes de DMTI-I e em dieta controle. (B) Peso médio larval dos indivíduos sobreviventes. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 50$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

B) Consumo e utilização de alimento

As Figuras 22A e 22B mostram os efeitos de DMTI-II no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas pela larva de *A. kuehniella*. Apesar de DMTI-II não ter causado efeito significativo no consumo da dieta quando incorporado a 2 % (Figura 22A), a produção de fezes por larva sofreu uma diminuição em cerca de 27% quando comparada à produção de fezes das larvas alimentadas com dieta controle (Figura 22B).

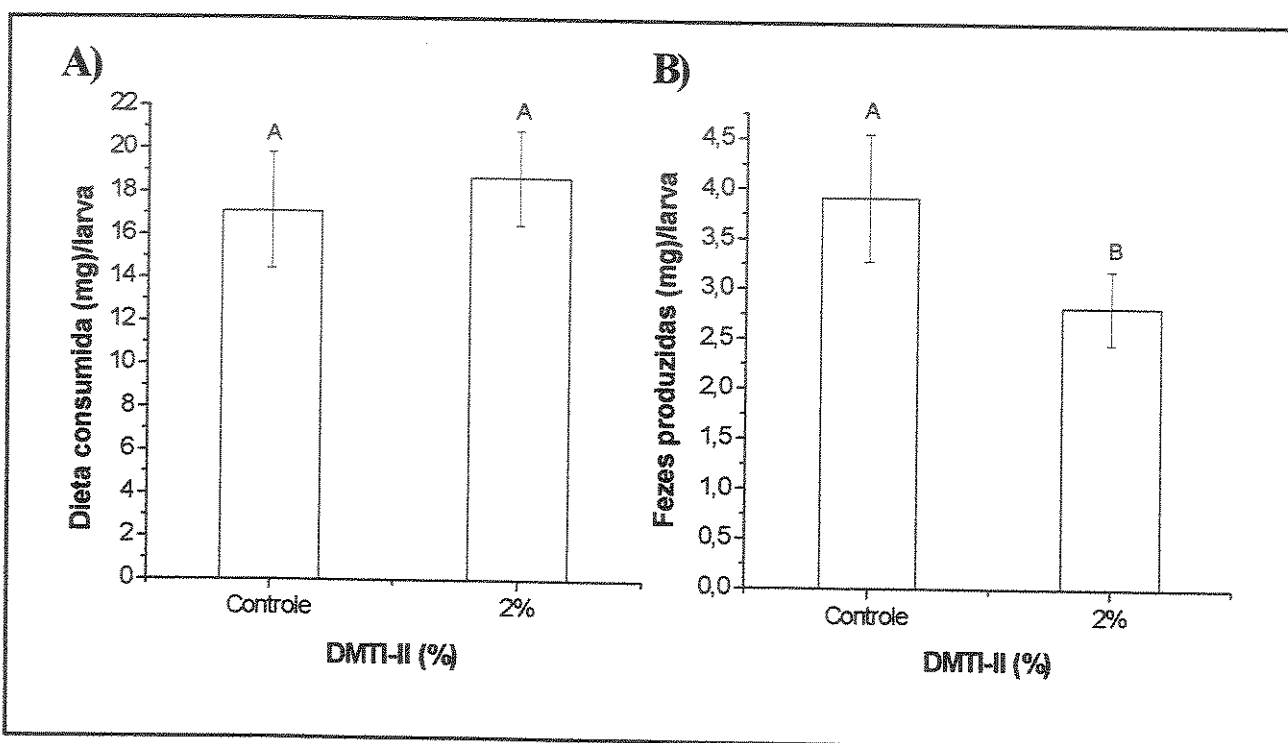


Figura 22 – Consumo e utilização de alimentos pelas larvas de *Anagasta kuehniella* alimentadas com DMTI-II. (A) dieta consumida/larva; (B) fezes produzidas/larva. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n \geq 50$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo

Os índices nutricionais relacionados na Tabela 1, mostram que as larvas alimentadas com a dieta contendo DMTI-II 2% sofreram a influência do inibidor no seu metabolismo quando comparadas as larvas alimentadas com a dieta controle.

Tabela 01 – Digestibilidade aparente (AD), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD) e custo metabólico (CM) das larvas de *Anagasta kuehniella* criadas em dieta contendo DMTI-II 2% e em dieta controle.

<i>Índices nutricionais</i>	<i>Dieta controle</i>	<i>Dieta com DMTI-II 2%</i>
ECI	30.633 ± 1.150 a	22.700 ± 0.500 b
ECD	35.916 ± 1.210 a	25.366 ± 0.288 b
CM	64.066 ± 1.193 a	74.633 ± 0.288 b
AD	85.333 ± 1.050 a	89.486 ± 1.209 b

C) Ação de DMTI-II na atividade enzimática do inseto

As enzimas presentes no intestino médio das larvas alimentadas com dieta controle e com DMTI-II tiveram sua atividade avaliada através da hidrólise do substrato BAPNA. A Figura 23A mostra que houve uma diminuição de 51% na atividade das enzimas presentes em larvas alimentadas com DMTI-II 2%. A hidrólise do substrato BAPNA pelas fezes também foi verificada, e também mostra que houve uma diminuição da atividade em cerca de 18% nas fezes de larvas alimentadas com DMTI-II 2% (Figura 23B).

A Figura 24 mostra a atividade triptica residual das enzimas presentes no IM de insetos alimentados com o inibidor DMTI-II. O resultado sugere que as proteinases dos insetos alimentados com DMTI-II 2% foram pouco sensíveis a ação do inibidor quando incubado no ensaio.

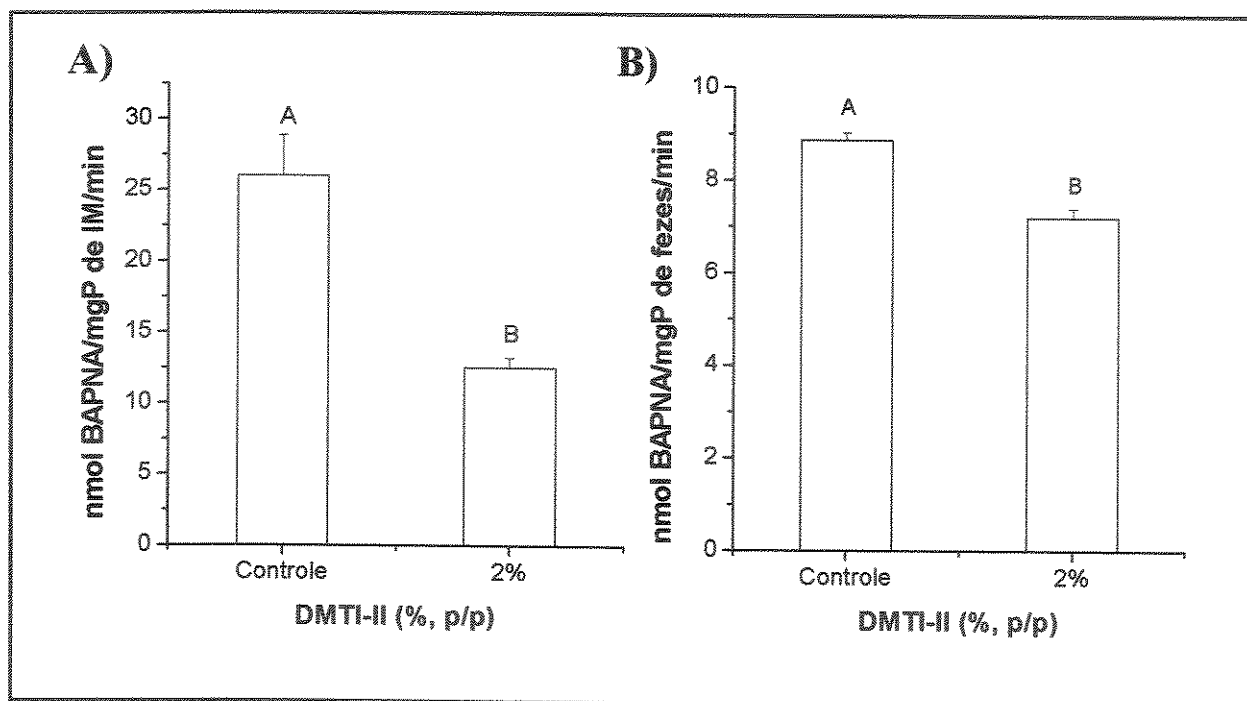


Figura 23 – Resposta das proteinases de *Anagasta kuehniella* a ingestão de DMTI-II 2%. (A) Atividade tríptica das enzimas do IM; (B) Atividade tríptica das enzimas presentes nas fezes. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n \geq 50$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo

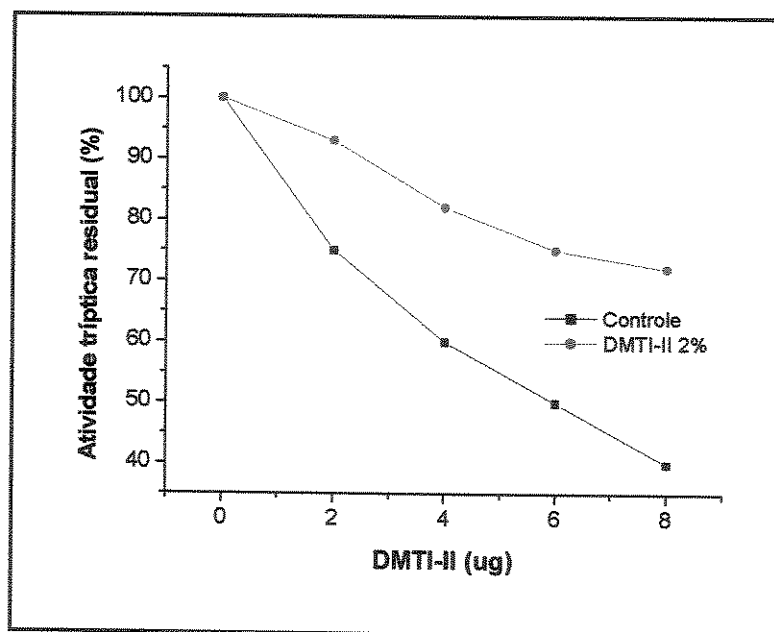


Figura 24 – Atividade antitriptica dos insetos alimentados com dietas artificiais contendo DMTI-II 2%. Aliquotas dos IMs de larvas são incubadas com concentrações crescentes de DMTI-II e a atividade tríptica residual é determinada pela hidrólise do substrato BAPNA.

Uma eletroforese em gel de poliacrilamida contendo gelatina a 0,1% foi realizada com finalidade de verificar a atividade das proteinases presentes no fluido do intestino médio (IM) e nas fezes dos insetos do 4º instar que foram alimentados com dieta artificial controle e dieta contendo DMTI-II a 2%.

A Figura 25 ilustra a atividade em gelatina das enzimas do tipo tripsina de aproximadamente 22 kDa presentes no IM das larvas alimentadas com dieta controle (linha 1). Quando as larvas foram alimentadas com DMTI-II 2%, aparentemente, a atividade sofreu uma redução tanto nas enzimas presentes no IM (linha 2) quanto nas fezes (linha 4) reforçando o que já foi mostrado na Figura 23A. Além da diminuição na atividade enzimática, foi observado que a ingestão do inibidor também provocou uma pequena alteração no peso molecular das bandas evidenciadas nas linhas 2 e 4. Para confirmar a atividade de enzimas do tipo tripsina, TLCK, um inibidor sintético específico de tripsina, foi incubado com as alíquotas do IM e das fezes das larvas alimentadas com o inibidor ou não. As linhas 5, 6, 7 e 8 mostram a ausência de atividade da enzima do tipo tripsina devido à presença de TLCK.

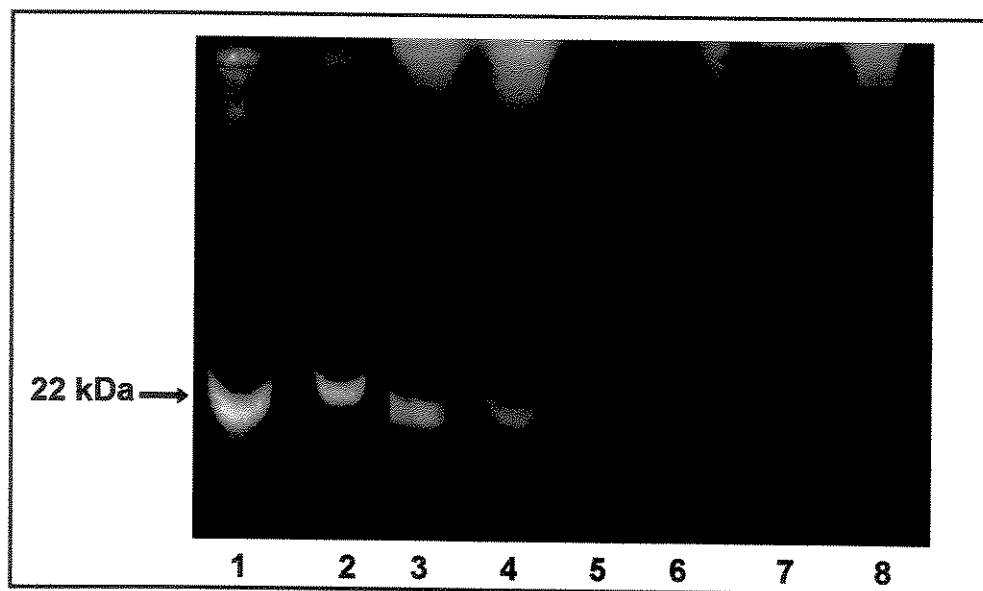


Figura 25 – Eletroforese em PAGE-SDS (12,5%) com gelatina a 0,1%, do fluido intestinal (IM) e das fezes das lagartas (4º instar). (1) IM das lagartas alimentadas com a dieta controle; (2) IM das lagartas alimentadas em dieta contendo DMTI-II a 2%; (3) fezes das lagartas alimentadas com dieta controle; (4) fezes das lagartas alimentadas com DMTI-II a 2%; (5) IM do controle incubado com TLCK; (6) IM do DMTI-II 2% incubado com TLCK; (7) fezes do controle incubado com TLCK; (8) fezes de DMTI-II (2%) incubado com TLCK.

2.2.2. Efeito de DMTI-II sobre o desenvolvimento larval de *C. cephalonica*

A) Sobrevivência e peso médio das larvas de *Corcyra cephalonica*

O efeito de DMTI-II sobre o lepidóptero *C. cephalonica* foi estudado através da determinação do número de indivíduos e o peso médio das larvas de 4 ° ínstar em dietas artificiais contendo quantidades crescentes de DMTI-II. O inibidor DMTI-II foi incorporado na dieta artificial aos níveis de 0,5, 1,0 e 2,0% que foi oferecida às larvas.

Em todas as concentrações, DMTI-II não apresentou efeito significativo na sobrevivência larval (Figura 26A) e também não afetou o peso médio larval (Figura 26B).

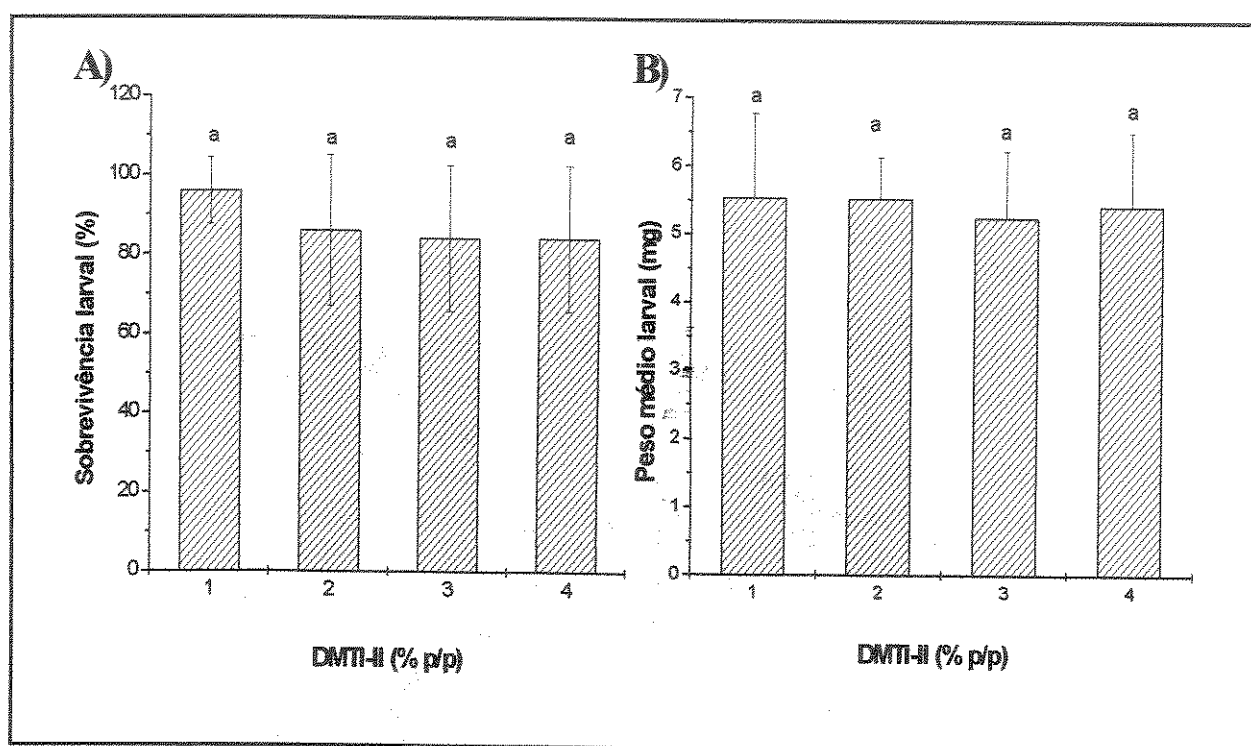


Figura 26 – Efeito de DMTI-II sobre as larvas de 24 dias de *Corcyra cephalonica* alimentadas com dieta artificial (1) controle e com concentrações do inibidor a (2) 0,5% ; (3) 1,0% e (4) 2,0%. (A) Número de larvas sobreviventes de larvas em dietas artificiais contendo quantidades crescentes de DMTI-II e em dieta controle. (B) Peso médio larval dos indivíduos sobreviventes. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 50$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

B) Consumo e utilização de alimento

A Figura 27 mostra os efeitos de DMTI-II no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas pela larva de *C. cephalonica*. A presença de DMTI-II 2% não interferiu significativamente no consumo da dieta (Figura 27A), bem como na produção de fezes (Figura 27B).

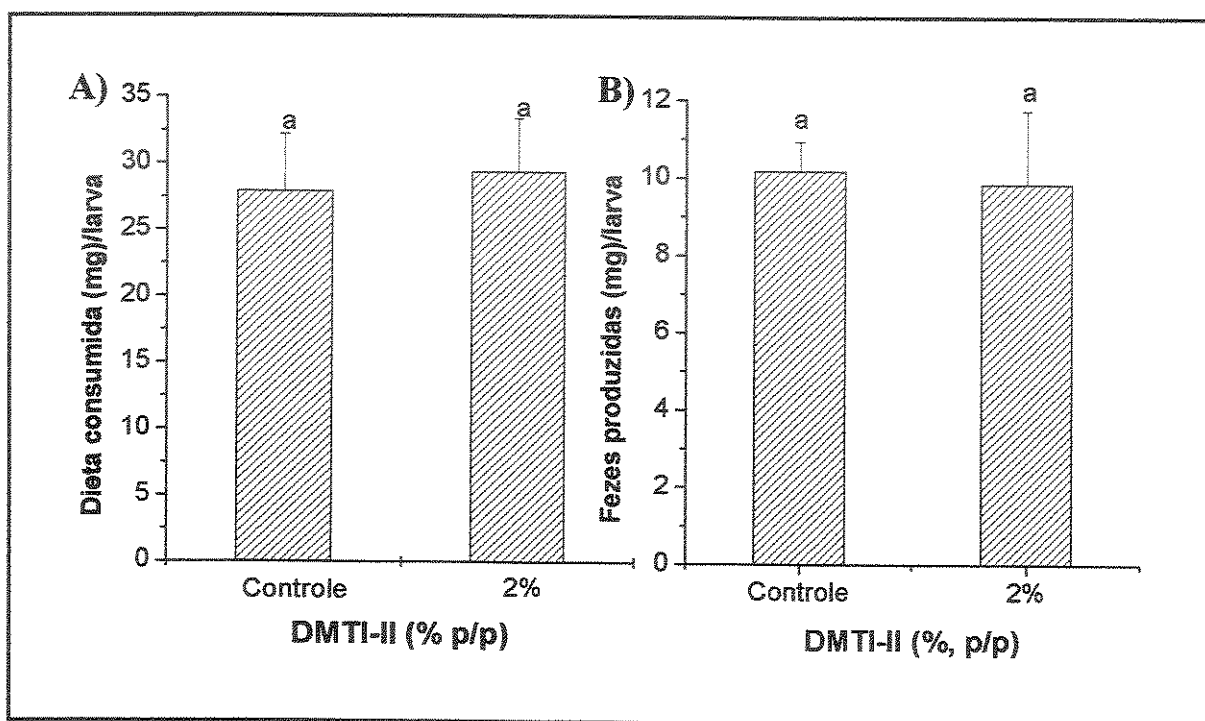


Figura 27 – Consumo e utilização de alimentos pelas larvas de *Corcyra cephalonica* alimentadas com DMTI-II. (A) dieta consumida (mg) por larva; (B) fezes produzidas (mg) por larva. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 50$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo

Os índices nutricionais relacionados na Tabela 2, mostram que o metabolismo das larvas de *Corcyra cephalonica* alimentadas com a dieta contendo DMTI-II 2% não foi afetado pela presença do inibidor quando aos índices obtidos das larvas alimentadas com a dieta controle.

Tabela 02 – Digestibilidade aparente (AD), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD) e custo metabólico (CM) das larvas de *Corcyra cephalonica* criadas em dieta contendo DMTI-II 2% e em dieta controle.

<i>Índices nutricionais</i>	<i>Dieta controle</i>	<i>Dieta com DMTI-II 2%</i>
ECI	19,65±1,60 a	19,55±1,65 a
ECD	28,72±2,25 a	27,62±2,1 a
CM	71,26±2,25 a	72,37±2,1 a
AD	67,36±1,68a	70,85±3,1a

C) Ação de DMTI-II na atividade enzimática de *Corcyra cephalonica*

Após a alimentação em dieta artificial, a atividade triptica do fluido intestinal (IM) e das fezes das larvas do grupo controle e alimentadas com DMTI-II a 2% foi verificada através da hidrólise do substrato BAPNA. As enzimas do IM não foram afetadas pela presença de DMTI-II a 2% (Figura 28A) pois não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo alimentado com o inibidor. Quando as fezes foram analisadas, o mesmo resultado foi obtido, a atividade enzimática presente nas fezes não foi afetada pela ingestão de DMTI-II a 2%.

A ensaio de incubação de crescentes concentrações DMTI-II com o IMs de larvas alimentadas com dieta artificial, mostrou que as enzimas das larvas alimentadas com DMTI-II foram pouco sensíveis a ação do inibidor. Quando o IM foi incubado com 4 e 6 µg de DMTI-II, a atividade residual do grupo controle foi de 73 e 62 % enquanto que a do grupo DMTI-II foi de 93,4 e 79,7% (Figura 29).

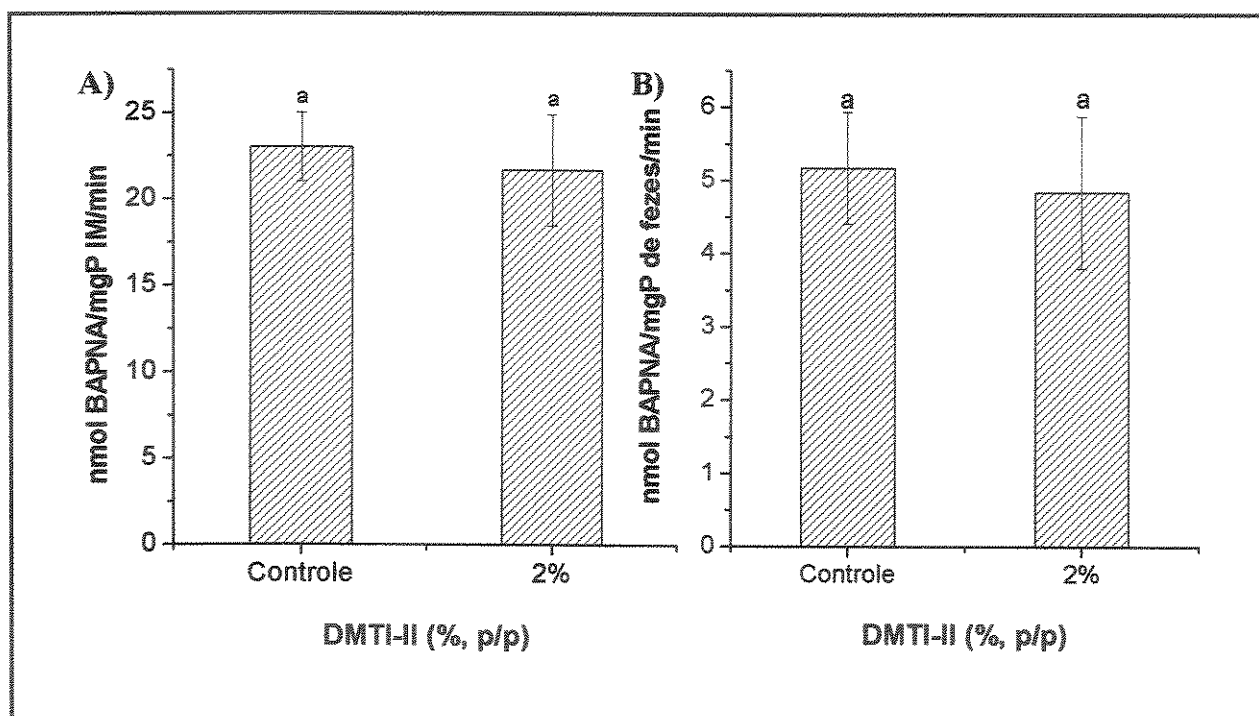


Figura 28 – Resposta das proteinases de *Corcyra cephalonica* a ingestão de DMTI-II 2%. (A) Atividade triptica das enzimas do IM; (B) Atividade triptica das enzimas presentes nas fezes. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n \geq 50$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo

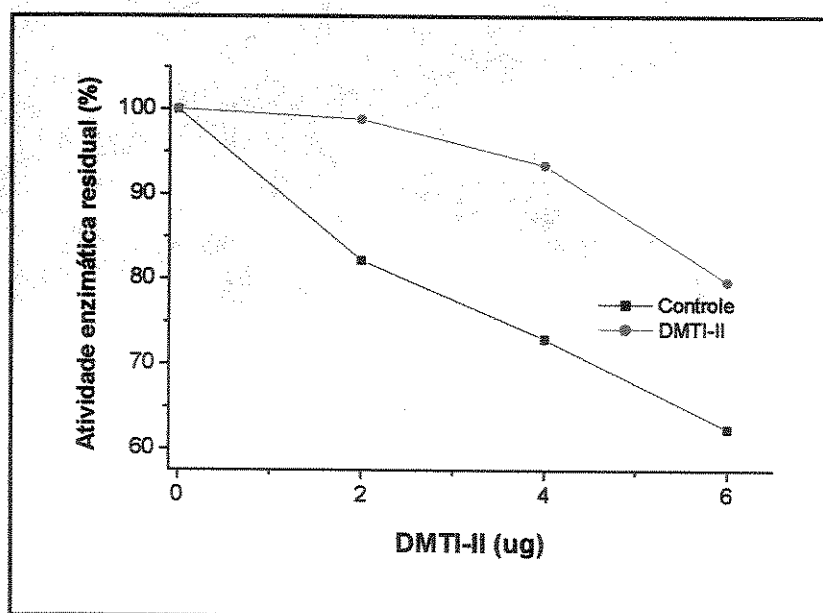


Figura 29 – Atividade antitriptica dos insetos alimentados com dietas artificiais contendo DMTI-II a 2%. Aliquotas dos IMs de larvas são incubadas com concentrações crescentes de DMTI-II e a atividade enzimática residual é determinada pela hidrólise do substrato BAPNA.

Uma análise eletroforética em gel de poliacrilamida contendo gelatina a 0,1% foi realizada com finalidade de verificar, após o ensaio de alimentação, a atividade das proteinases de *Corcyra cephalonica* presentes no fluido do intestino médio (IM) e nas fezes dos insetos do 4º instar (Figura 30).

Confirmando o resultado obtido e ilustrado na Figura 28, a atividade em gelatina das enzimas (22 kDa) presentes no IM das larvas alimentadas com DMTI-II (linha 2), aparentemente, não foi alterada, assim como a atividade das enzimas presentes nas fezes destas mesmas larvas (linha 4). Com intuito de comprovar a atividade de enzimas do tipo tripsina, as alíquotas do IM e das fezes também foram incubadas com TLCK. As linhas 5, 6, 7 e 8 mostram a ausência de atividade da enzima do tipo tripsina devido à presença do inibidor sintético específico para esta enzima (Figura 30).

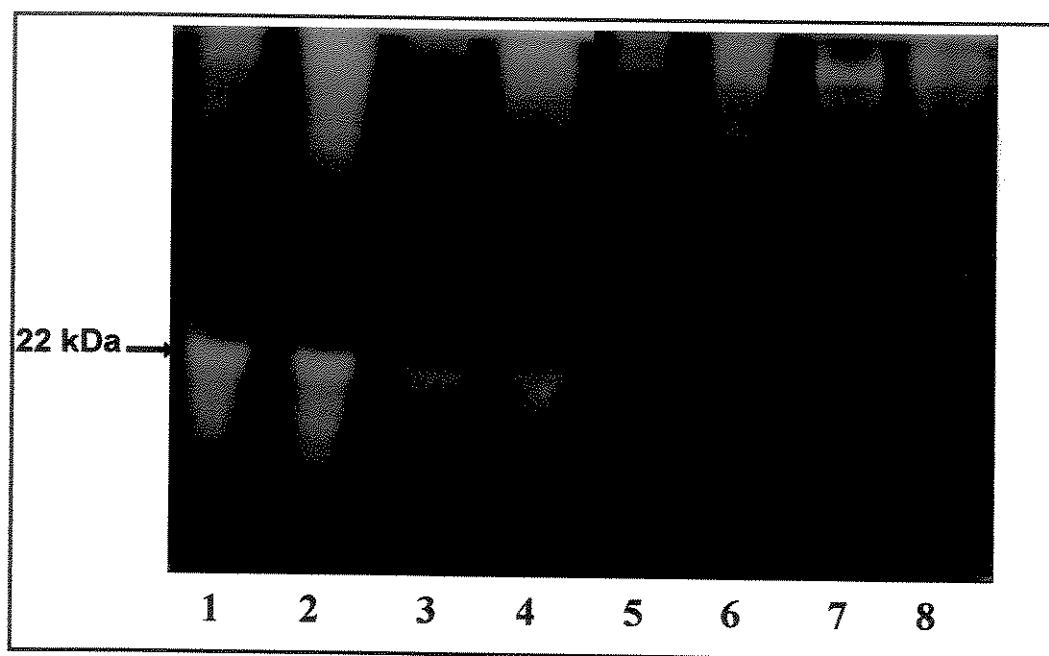


Figura 30 – Eletroforese em PAGE-SDS (12,5%) com gelatina a 0,1%, do fluido intestinal (IM) e das fezes das lagartas (4º instar) de *Corcyra cephalonica*. (1) IM das lagartas alimentadas com a dieta controle; (2) IM das lagartas alimentadas em dieta contendo DMTI-II a 2%; (3) fezes das lagartas alimentadas com dieta controle; (4) fezes das lagartas alimentadas com DMTI-II a 2%; (5) IM do controle incubado com TLCK; (6) IM do DMTI-II 2% incubado com TLCK; (7) fezes do controle incubado com TLCK; (8) fezes de DMTI-II (2%) incubado com TLCK.

2.2.3. Efeito de DMTI sobre o desenvolvimento larval de *A. kuehniella*

A) Sobrevivência e peso médio das larvas de *A. kuehniella*

O efeito de DMTI sobre o lepidóptero *A. kuehniella* também foi estudado através da determinação do número de indivíduos e o peso médio das larvas que foram alimentadas com dietas artificiais sem o inibidor e dietas artificiais contendo quantidades crescentes de DMTI (0,5, 1,0 e 2,0%).

Em todas as concentrações, DMTI não apresentou efeito significativo na sobrevivência larval (Figura 31A) e também não afetou o peso meio larval (Figura 31B).

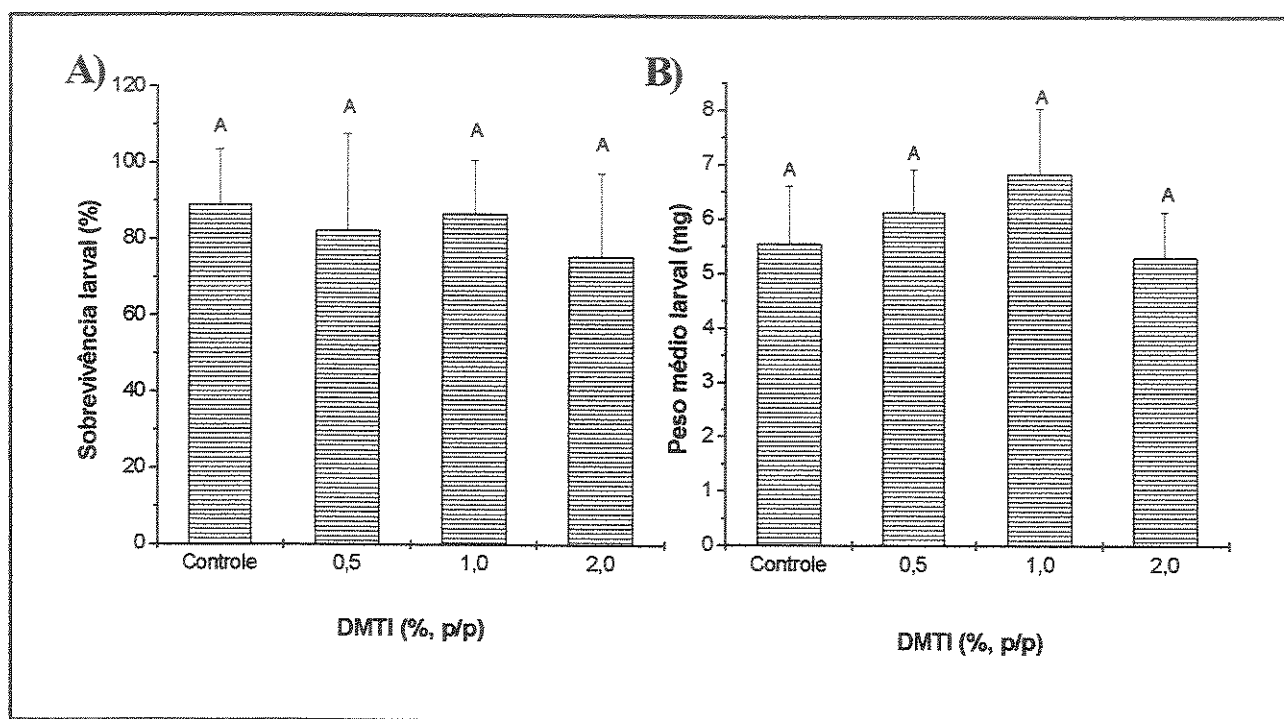


Figura 31 – Efeito de DMTI sobre as larvas de 24 dias de *Anagasta kuehniella* alimentadas com dieta artificial (1) controle e com concentrações do inibidor a (2) 0,5% ; (3) 1,0% e (4) 2,0%. (A) Número de larvas sobreviventes de larvas em dietas artificiais contendo quantidades crescentes de DMTI e em dieta controle. (B) Peso médio larval dos indivíduos sobreviventes. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 50$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

B) Consumo e utilização de alimento

A Figura 32 mostra os efeitos de DMTI no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas pela larva de *A. kuehniella*. A presença de DMTI 2% não interferiu significativamente no consumo da dieta (Figura 32A). A produção de fezes das larvas alimentadas com o inibidor (1,9 mg/larva) diminuiu cerca de 64% quando foi comparada à produção de fezes pelas larvas da dieta controle (5,5 mg/larva) (Figura 32B).

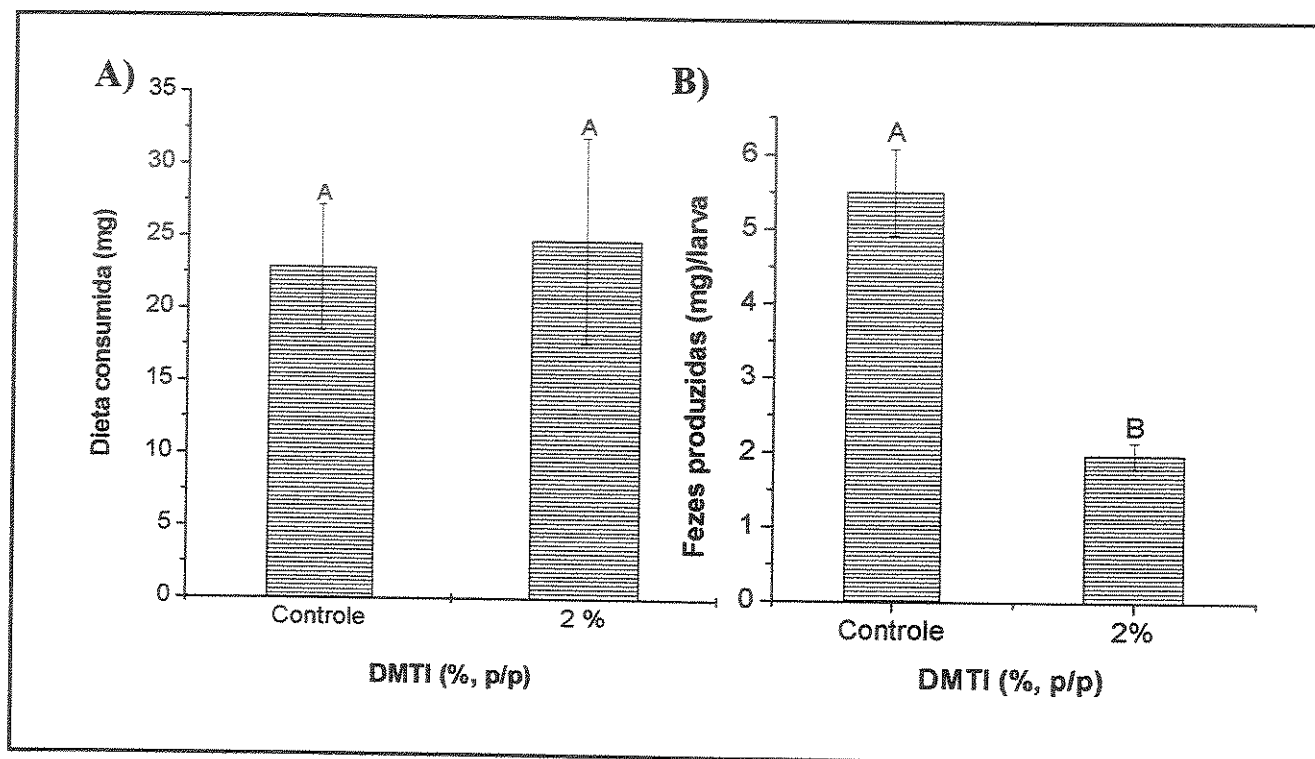


Figura 32 – Consumo e utilização de alimentos pelas larvas de *Anagasta kuehniella* alimentadas com DMTI a 2%. (A) dieta consumida (mg) por larva; (B) fezes produzidas (mg) por larva. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 50$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo

Os valores dos índices nutricionais relacionados na Tabela 3, eficiência de conversão do alimento digerido (ECD); custo metabólico e digestibilidade aparente (AD) foram significativamente diferentes nos dois grupos: larvas alimentadas com dieta controle e larvas alimentadas com DMTI a 2%.

Tabela 03 – Digestibilidade aparente (AD), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD) e custo metabólico (CM) das larvas de *Anagasta kuehniella* criadas em dieta contendo DMTI 2% e em dieta controle.

<i>Índices nutricionais</i>	<i>Dieta controle</i>	<i>Dieta com DMTI 2%</i>
ECI	25,3 ± 1,15a	24,3 ± 0,68 ^a
ECD	33,3 ± 1,15a	27,4 ± 1,5b
CM	66,7 ± 1,15a	72,6 ± 1,5b
AD	76 ± 1,0a	88,9 ± 2,5b

C) Ação de DMTI na atividade enzimática de *Anagasta kuehniella*

O estudo do efeito de DMTI sobre a atividade enzimática de *A. kuehniella* também foi realizado, através da hidrólise do BAPNA. Larvas alimentadas com dieta controle e com DMTI a 2% tiveram seus fluídos intestinais (IM) e fezes analisados. A atividade enzimática do IM de larvas alimentadas com DMTI a 2% sofreu um acréscimo de 14% (Figura 33A). Um aumento também foi observado na atividade das enzimas presentes nas fezes de larvas alimentadas com o inibidor cuja produção de BAPNA (nmol/mgP de fezes/min) aumentou cerca de 6%, que foi considerado significativo pelas análises estatísticas (Figura 33B).

A atividade trípica residual das enzimas do IM de larvas alimentadas com DMTI a 2 % permaneceu inalterada mesmo após a incubação com 6 µg de DMTI. Quando o IM dessas larvas que foram alimentadas com o inibidor, foi incubado com 8 µg de DMTI, a atividade trípica residual do grupo controle foi nula enquanto que a do grupo DMTI foi de 62% (Figura 34).

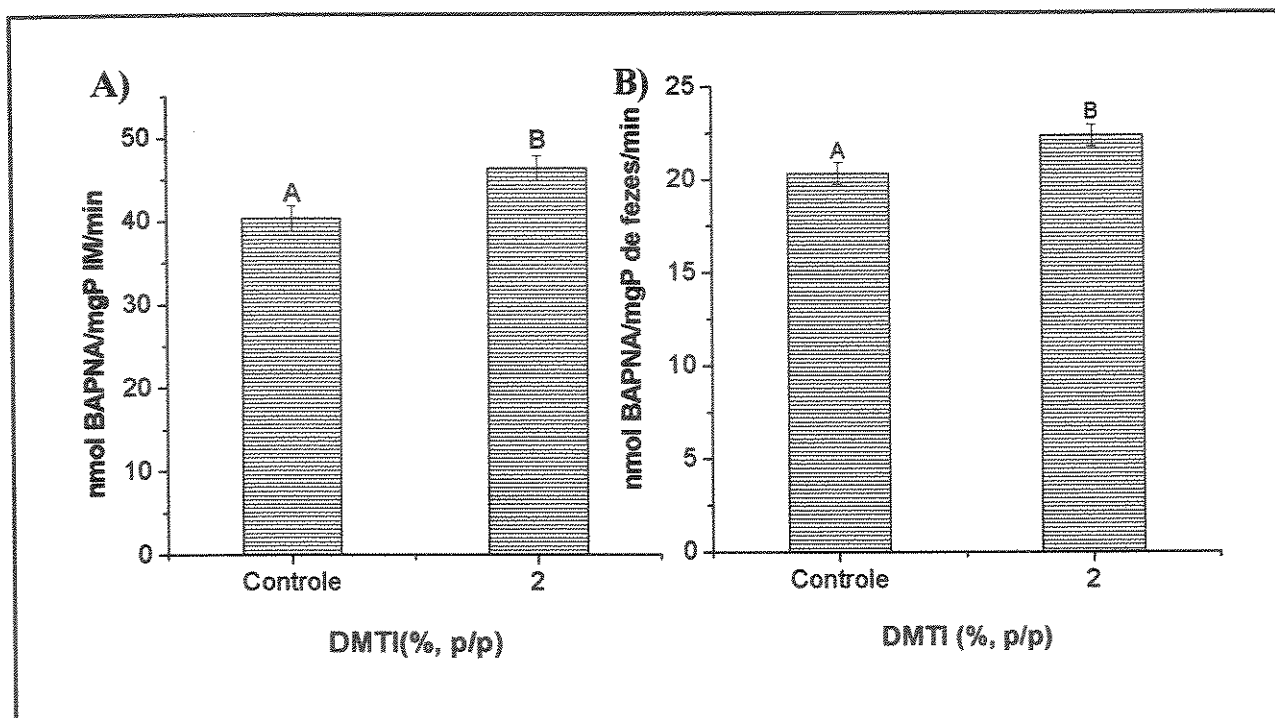


Figura 33 – Resposta das proteinases de *Anagasta kuehniella* a ingestão de DMTI 2%. (A) Atividade triptica das enzimas do IM; (B) Atividade triptica das enzimas presentes nas fezes. Cada valor representa a média $\pm$ SD de n = 50. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo

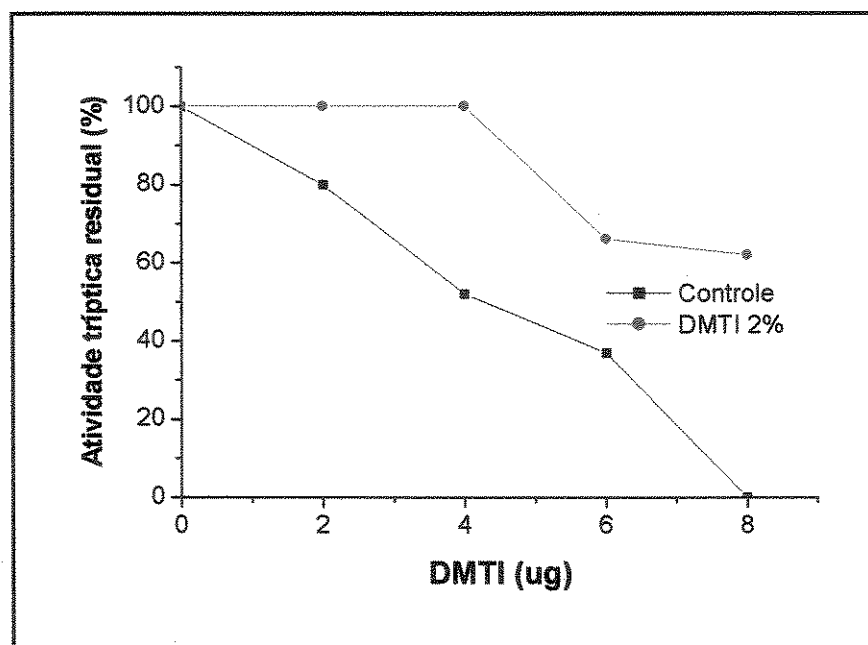


Figura 34 – Atividade antitriptica dos insetos alimentados com dietas artificiais contendo DMTI a 2%. Aliquotas dos IMs de larvas são incubadas com concentrações crescentes de DMTI e a atividade enzimática residual é determinada pela hidrólise do substrato BAPNA.

A Figura 35 mostra uma eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (12,5%) contendo gelatina a 0,1% para analisar a atividade aparente das proteinases de *Anagasta kuehniella* presentes no fluido do intestino médio (IM) e nas fezes das larvas do 4º instar.

A atividade em gelatina das enzimas presentes no IM de larvas alimentadas com DMTI foi maior do que a atividade do grupo alimentado com dieta controle (linha 1), pois na eletroforese é possível observar o aumento da intensidade da banda de aproximadamente 22 kDa na linha 2. Também foi observada uma pequena alteração no peso molecular da banda de 22 kDa.

Em relação à atividade enzimática das fezes, foi observado um aumento da ação enzimática no grupo alimentado com DMTI (linha 4) em relação ao grupo alimentado com a dieta controle (linha 3). Quando as alíquotas foram incubadas com TLCK, a atividade de enzimas do tipo tripsina foi inibida já que não há evidência da banda de 22 kDa nas linhas 5, 6, 7 e 8, permanecendo apenas uma banda em todas as linhas, sugerindo que esta não seja uma enzima do tipo tripsina (Figura 35).

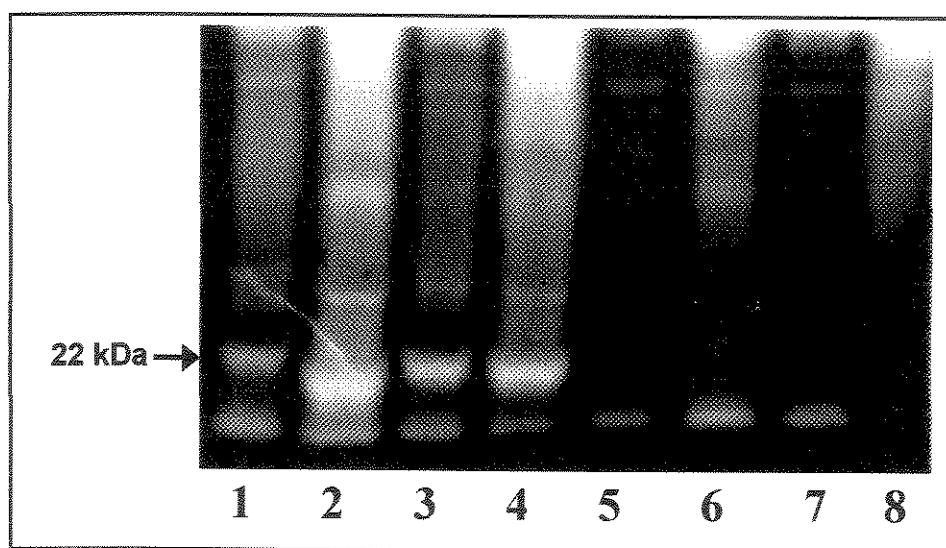


Figura 35 – Eletroforese em PAGE-SDS (12,5%) com gelatina a 0,1%, do fluido intestinal (IM) e das fezes das lagartas (4º instar) de *Anagasta kuehniella*. (1) IM das lagartas alimentadas com a dieta controle; (2) IM das lagartas alimentadas em dieta contendo DMTI a 2%; (3) fezes das lagartas alimentadas com dieta controle; (4) fezes das lagartas alimentadas com DMTI a 2%; (5) IM do controle incubado com TLCK; (6) IM do DMTI 2% incubado com TLCK; (7) fezes do controle incubado com TLCK; (8) fezes de DMTI (2%) incubado com TLCK.

B) Consumo e utilização de alimento

A Figura 37 mostra os efeitos de DMTI no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas pela larva de *C. cephalonica*. A presença de DMTI a 2% na dieta artificial interferiu significativamente no consumo da dieta, reduzindo o consumo em 36% (Figura 37A). A produção de fezes das larvas alimentadas com DMTI também foi afetada, com redução de 27% (Figura 37B).

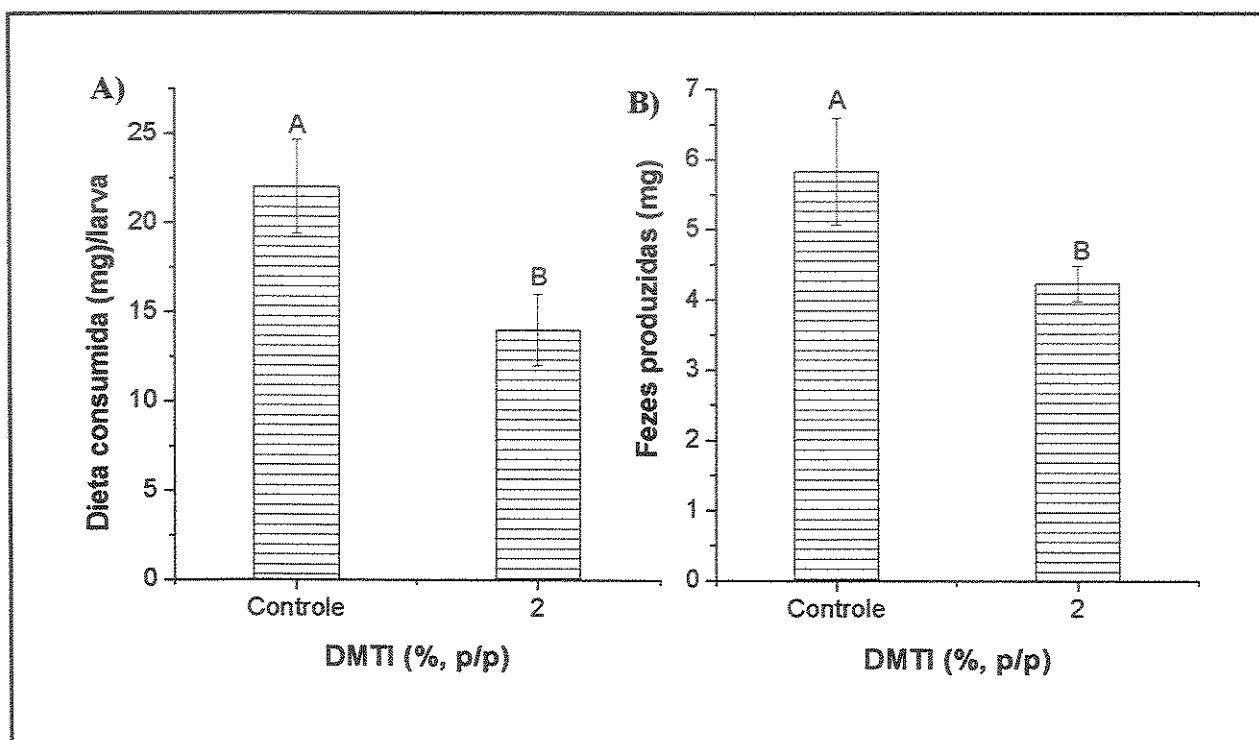


Figura 37 – Consumo e utilização de alimentos pelas larvas de *Corcyra cephalonica* alimentadas com DMTI. (A) dieta consumida (mg) por larva; (B) fezes produzidas (mg) por larva. Cada valor representa a média $\pm$ SD de $n = 50$. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo

Os índices nutricionais relacionados na Tabela 4, mostram que o metabolismo das larvas de *Corcyra cephalonica* alimentadas com a dieta contendo DMTI 2% não foi afetado pela presença do inibidor quando comparado aos índices obtidos das larvas alimentadas com a dieta controle.

Tabela 04 – Digestibilidade aparente (AD), eficiência de conversão do alimento ingerido (ECI) e digerido (ECD) e custo metabólico (CM) das larvas de *Corcyra cephalonica* criadas em dieta contendo DMTI 2% e em dieta controle.

<i>Índices nutricionais</i>	<i>Dieta controle</i>	<i>Dieta com DMTI 2%</i>
ECI	16,95±3,9 a	19,58±2,8 ^a
ECD	24,83±3,7 a	27,65±1,8 a
CM	66,10±4,6 a	70,37±5,6 a
AD	75,16±3,7 a	72,34±1,8 a

C) Ação de DMTI na atividade enzimática de *Corcyra cephalonica*

O efeito de DMTI sobre a atividade enzimática de *C. cephalonica* foi analisado através da hidrólise do substrato BAPNA pelas enzimas presentes no fluido intestinal (IM) e nas fezes. As enzimas do IM não foram afetadas pela ingestão de DMTI a 2% (Figura 38A) pois não houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo alimentado com o inibidor. Quando as fezes foram analisadas, foi observado que ocorreu uma redução de 89% na atividade enzimática presente nas fezes das larvas alimentadas com DMTI a 2%. A atividade trípica residual das enzimas do IM das larvas alimentadas com DMTI a 2 % quando incubadas com 6 µg do inibidor sofreu uma redução de 25% enquanto que a atividade das enzimas de larvas alimentadas com dieta controle foi reduzida em cerca de 60% (Figura 39).

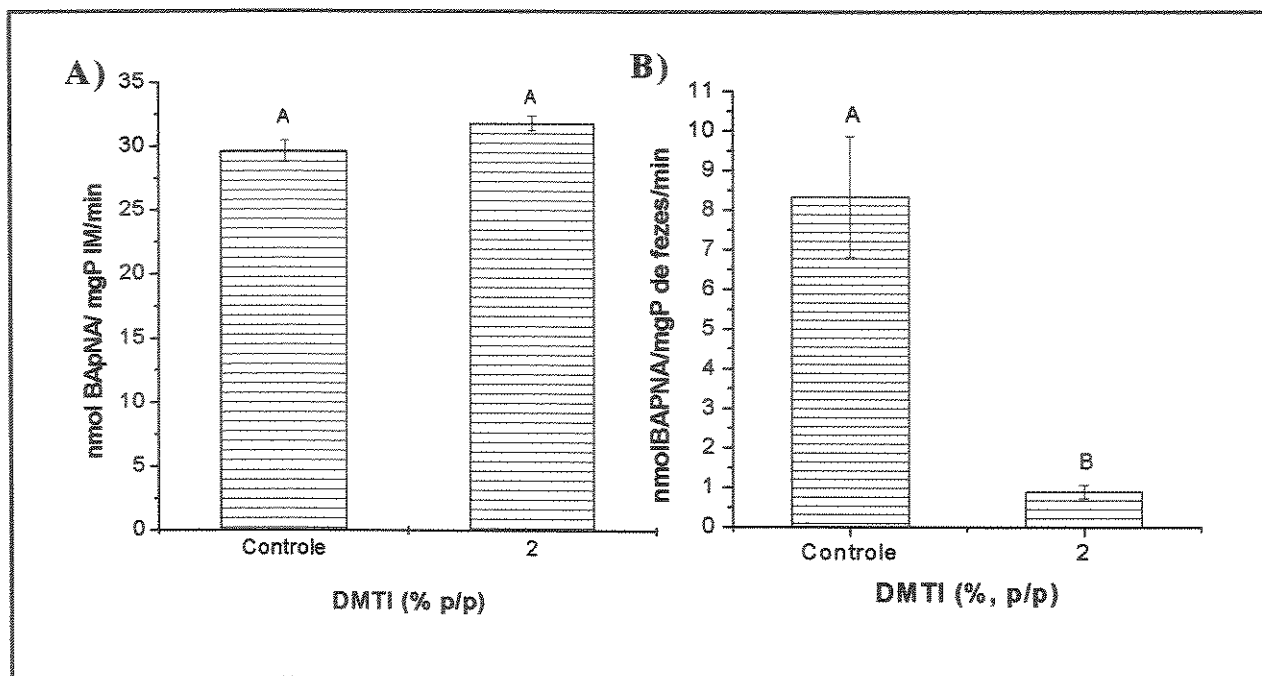


Figura 38 – Resposta das proteinases de *Corcyra cephalonica* a ingestão de DMTI 2%. (A) Atividade tríptica das enzimas do IM; (B) Atividade tríptica das enzimas presentes nas fezes. Cada valor representa a média $\pm$ SD de n = 50. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si dentro de um mesmo grupo.

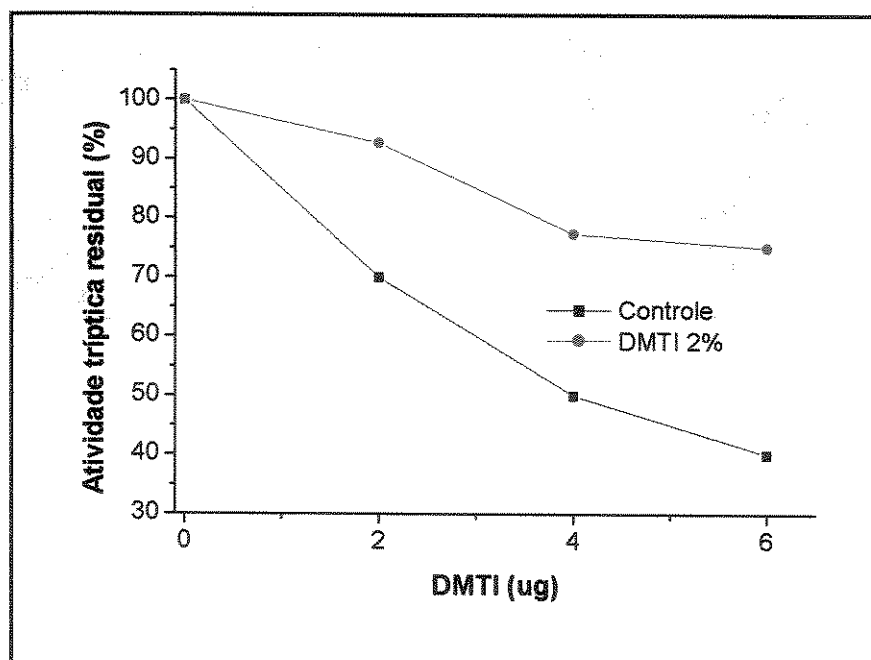


Figura 39 – Atividade antitriptica dos insetos alimentados com dietas artificiais contendo DMTI a 2%. Aliquotas dos IMs de larvas são incubadas com concentrações crescentes de DMTI e a atividade enzimática residual é determinada pela hidrólise do substrato BAPNA.

A Figura 40 ilustra a eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (12,5%) contendo gelatina a 0,1% que foi realizada para analisar atividade das proteinases de *Corcyra cephalonica* presentes no fluido do intestino médio (IM) e nas fezes dos insetos do 4º instar (Figura 40).

Aparentemente, a atividade em gelatina das enzimas presentes no IM das larvas alimentadas com DMTI (linha 2) não foi alterada, reforçando o que já foi mostrado na Figura 38A. A diminuição da atividade das enzimas presentes nas fezes alimentadas com DMTI (linha 4) também foi observada na eletroforese com gelatina a 0,1%, pois a intensidade da banda de 22 kDa sofreu um decréscimo. O inibidor sintético específico para tripsina, TLCK, também foi incubado com as alíquotas para confirmar a presença de enzimas do tipo tripsina.

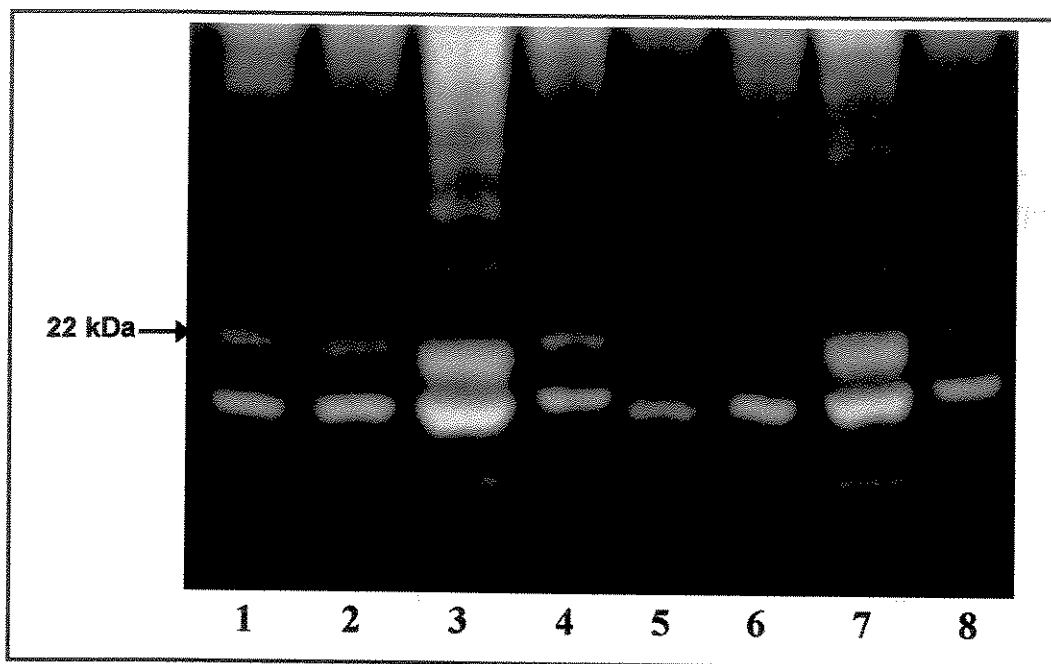


Figura 40 – Eletroforese em PAGE-SDS (12,5%) com gelatina a 0,1%, do fluido intestinal (IM) e das fezes das larvas (4º instar) de *Corcyra cephalonica*. (1) I.M. das larvas alimentadas com dieta controle; (2) IM das larvas alimentadas com dieta contendo DMTI a 2%; (3) fezes das larvas alimentadas com dieta controle; (4) fezes das larvas alimentadas em dieta contendo DMTI a 2%; (5) IM do controle incubado com TLCK; (6) IM das larvas alimentadas com DMTI a 2% incubado com TLCK; (7) fezes do controle incubado com TLCK; (8) fezes das larvas alimentadas com DMTI a 2 % incubados com TLCK.

3. Estudo da ação farmacológica dos inibidores de *Dimorphandra mollis*.

3.1. Efeito de DMTI-II e DMTI na indução de edema de pata de rato

3.1.1. Efeito de DMTI-II

A injeção subplantar de 0,1 ml de DMTI-II (3-100 $\mu\text{g/pata}$) induziu um edema de pata dose-dependente (Figura 41), sendo a resposta máxima observada 30 minutos após a injeção do inibidor, como é demonstrado na curva temporal de todas as concentrações de DMTI-II utilizadas (Figura 42).

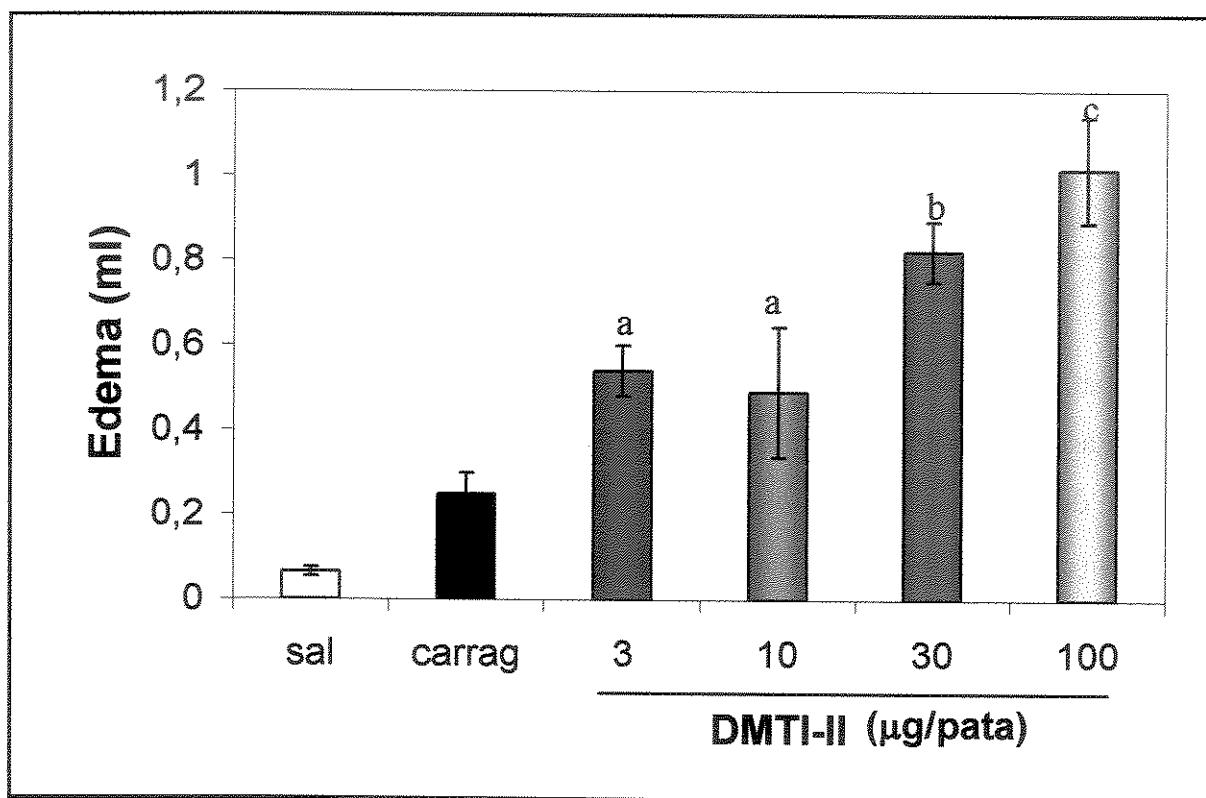


Figura 41 – Curva dose-resposta no edema de pata de rato induzido por DMTI-II. Diferentes doses do inibidor foram injetadas subcutaneamente na região subplantar no volume de 0,1 ml/pata. O edema está expresso como o aumento no volume (ml) da pata em relação ao volume inicial. A injeção subplantar de carragenina (carrag) e de salina (sal) foram feitas em animais controles. Cada coluna representa a média de seis animais $\pm$ SD. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si. (Anova, teste de Bonferroni).

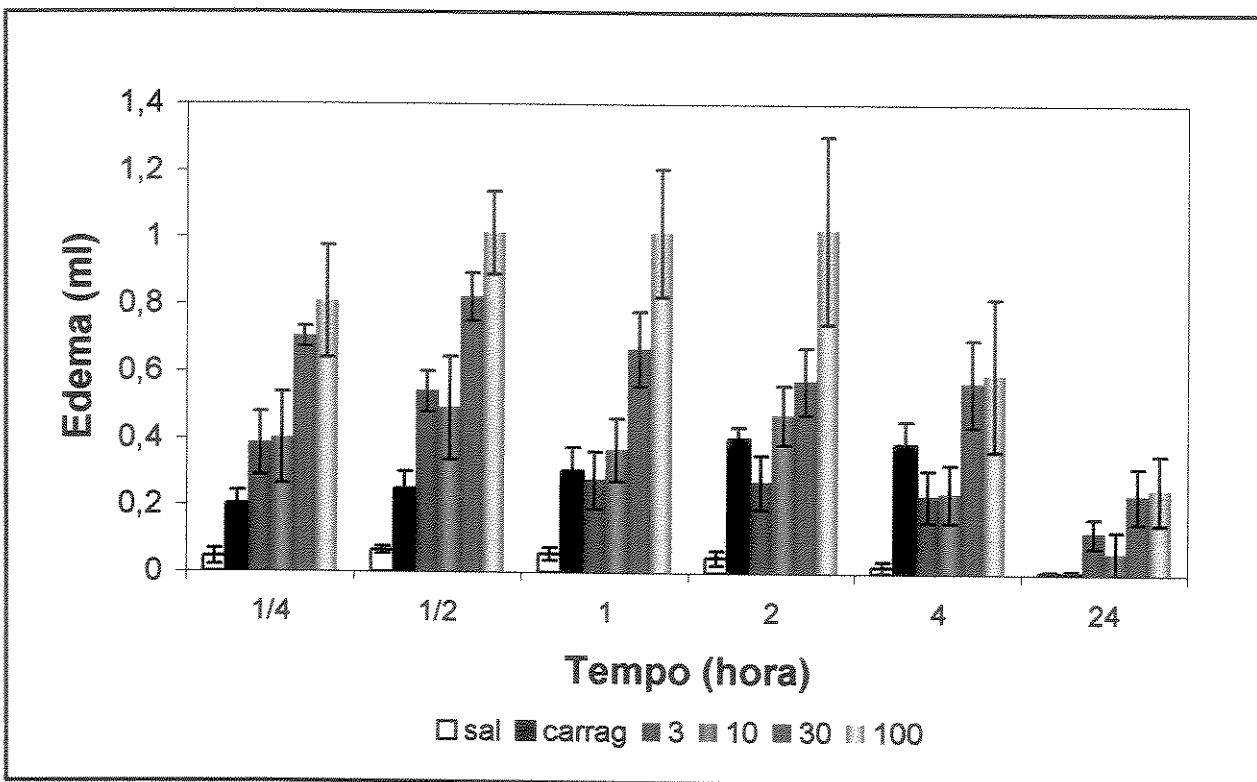


Figura 42 – Curva temporal de diferentes doses ($\mu\text{g/pata}$) de DMTI-II na indução de edema de pata de rato. O edema está expresso como o aumento do volume (ml) da pata em relação ao volume inicial, sendo medido após $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4 e 24 horas após a injeção subcutânea do inibidor na região subplantar. Animais controles foram injetados com carragenina (carrag) e salina (sal). Cada coluna representa a média de seis animais $\pm$ SD. Todos os valores de DMTI-II são diferentes daqueles encontrados para os grupos controles com $P < 0,05$. (ANOVA, teste de Bonferroni)

3.1.2. Efeito de DMTI

A Figura 43 mostra o efeito de DMTI na indução do edema de pata de rato. Diferentes doses deste inibidor (3-100 μg) foram administradas na região subplantar da pata do animal e o volume da pata medido após $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4 e 24 horas. Observou-se que a resposta máxima ocorreu 30 minutos como mostra a curva temporal de todas as concentrações de DMTI utilizadas (Figura 44).

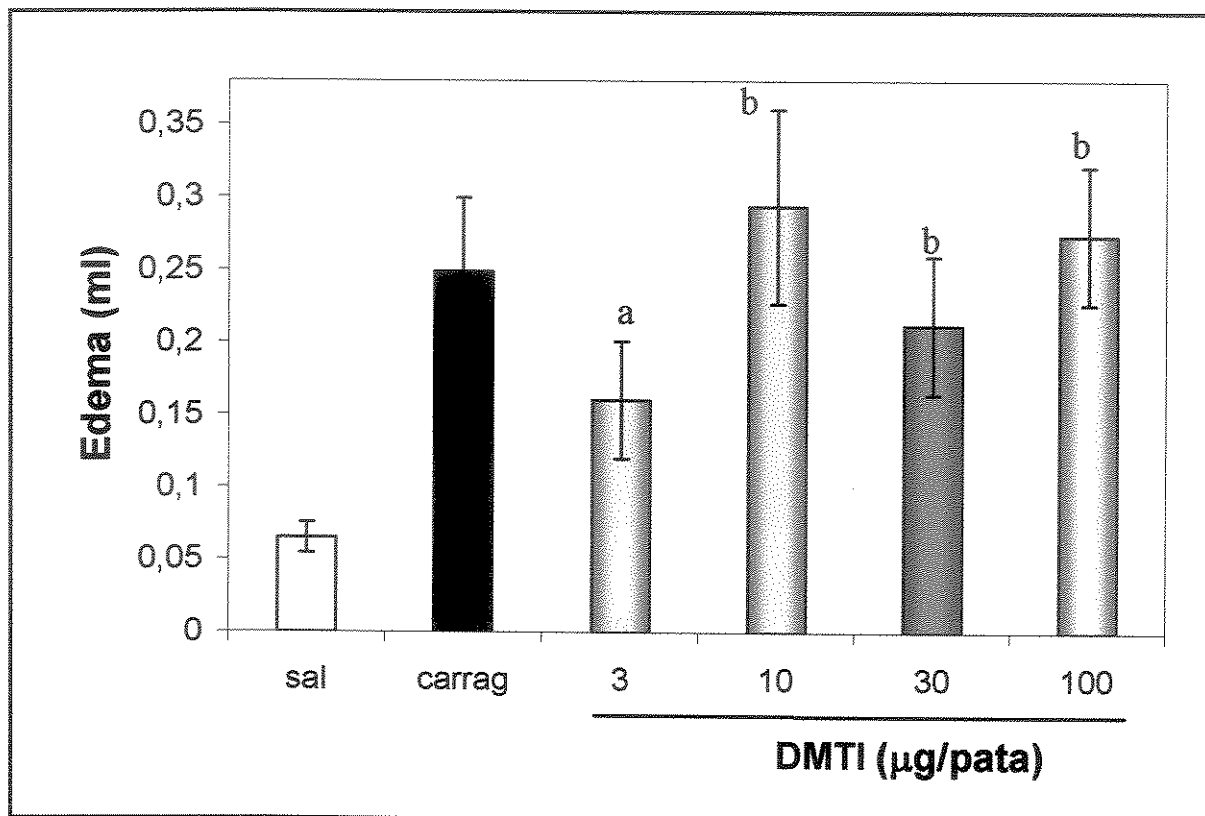


Figura 43 – Efeito de diferentes concentrações de DMTI na indução de edema de pata de rato. Diferentes doses do inibidor foram injetadas subcutaneamente na região subplatar no volume de 0,1 ml/pata. O edema está expresso como o aumento na volume (ml) da pata em relação ao volume inicial. A injeção subplatar de carragenina (carrag) e de salina (sal) foram feitas em animais controles. Cada coluna representa a média de seis animais $\pm$ SD. Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$) dos valores quando comparados entre si. (*Anova, teste de Bonferroni*).

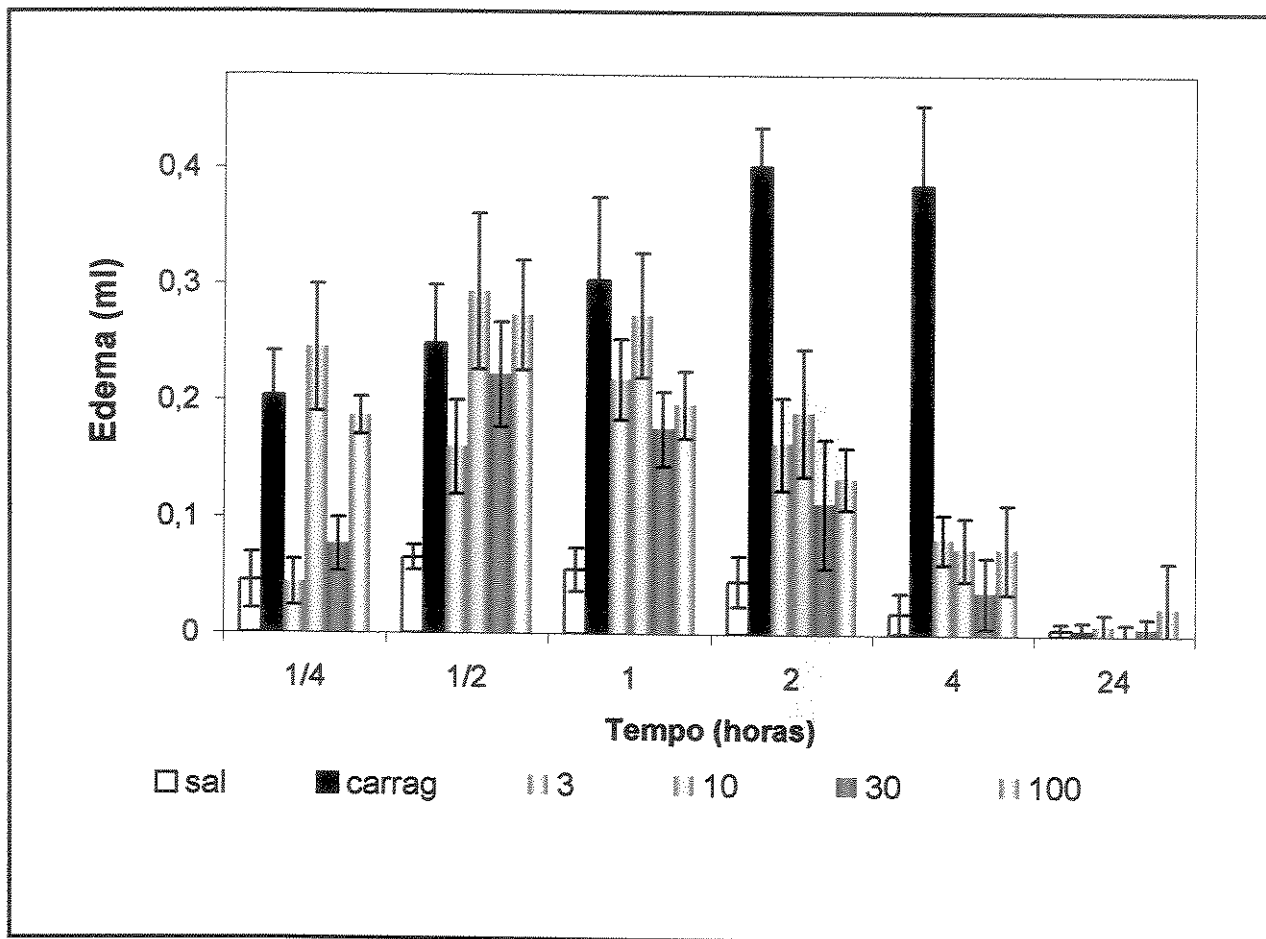


Figura 44 – Curva temporal de diferentes doses ($\mu\text{g/pata}$) de DMTI na indução de edema de pata de rato. O edema está expresso como o aumento do volume (ml) da pata em relação ao volume inicial, sendo medido após $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{2}$, 1, 2, 4 e 24 horas após a injeção subcutânea do inibidor na região subplantar. Animais controles foram injetados com carragenina (carrag) e salina (sal). Cada coluna representa a média de seis animais $\pm$ SD. Todos os valores de DMTI são diferentes daqueles encontrados para os grupos controles com $P < 0,05$. (ANOVA, teste de Bonferroni)

3.2. Estudo do mecanismo de ação de DMTI-II na indução de edema

Como o DMTI-II apresentou maior efeito na indução de edema de pata de rato, o provável mecanismo de ação deste inibidor foi investigado. Foi possível avaliar a provável atuação de DMTI-II através da utilização de drogas antiinflamatórias como a mepiramina, um antagonista de receptores H_1 , e a ciproheptadina, um duplo antagonista de receptores de histamina e serotonina. O edema induzido por DMTI-II foi eficientemente inibido por ciproheptadina (Figura 46), mas não pela mepiramina (Figura 45).

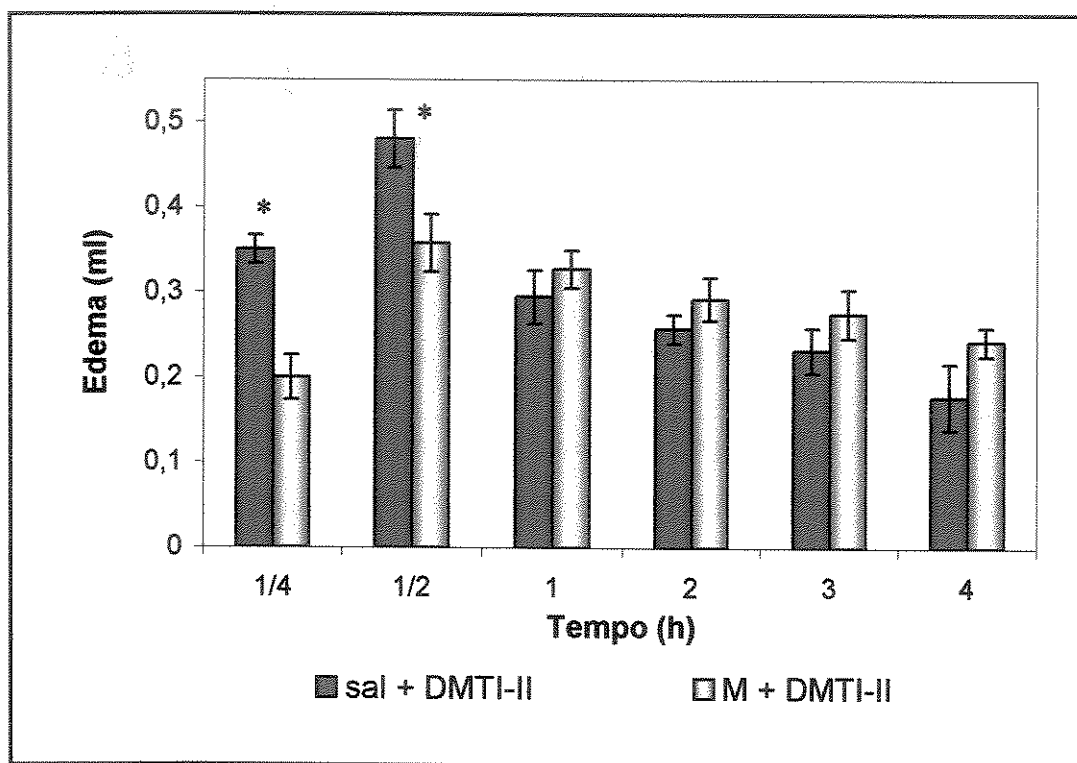


Figura 45 – Efeito da mepiramina (M) (2 mg/Kg), i.p., (administrada 60 min antes) no edema de pata de rato induzido por DMTI-II (30 μ g/pata). O edema foi medido nos tempos de 1/4, 1/2, 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção subcutânea de DMTI-II (30 μ g/pata). Cada coluna representa a média $\pm$ SD de 6 animais. No grupo controle (sal + DMTI-II), o mesmo volume de solução estéril de salina (sal) foi administrado 60 min (i.p.) sem a droga mepiramina. (*) Indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparado o grupo controle e o grupo mepiramina (ANOVA, teste de Bonferroni).

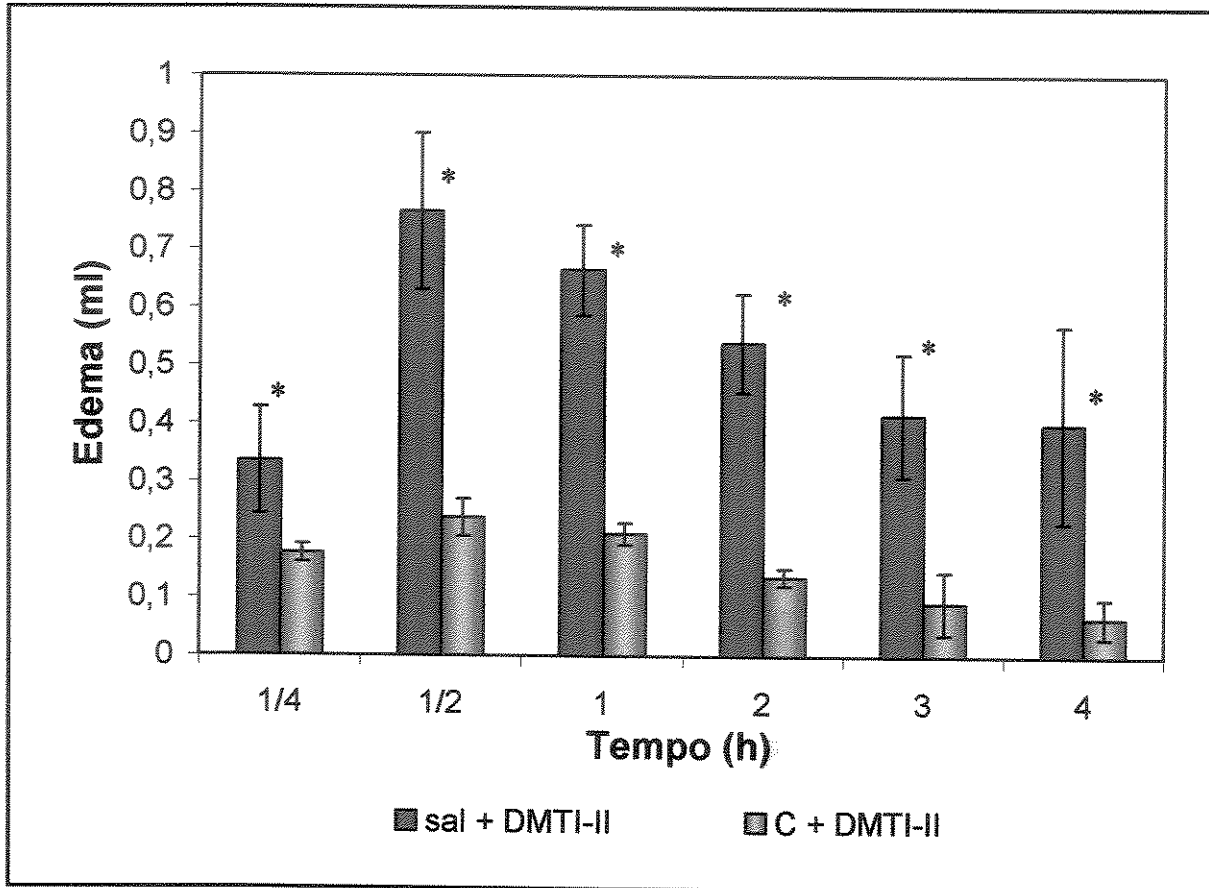


Figura 46 – Efeito inibitório de ciproheptadina (C) (2 mg/Kg), i.p., (administrada 30 min antes) no edema de pata de rato induzido por DMTI-II (30 μ g/pata). O edema foi medido após 1/4, 1/2, 1, 2, 3 e 4 horas da injeção subcutânea de DMTI-II (30 μ g/pata). Cada coluna representa a média $\pm$ SD de 6 animais. No grupo controle (sal + DMTI-II), o mesmo volume de solução estéril de salina (sal) foi administrado 30 min (i.p.) sem ciproheptadina. (*) Indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparado o grupo controle e o grupo ciproheptadina (ANOVA, teste de Bonferroni).

A Figura 47 mostra a curva temporal do edema de pata de rato induzido pela injeção da DMTI-II (30 μ g/pata) com salina, e co-injetado com heparina. No tempo de resposta máxima do edema induzido por DMTI-II (30 min), observamos que a heparina foi capaz de reduzir consideravelmente o efeito do inibidor.

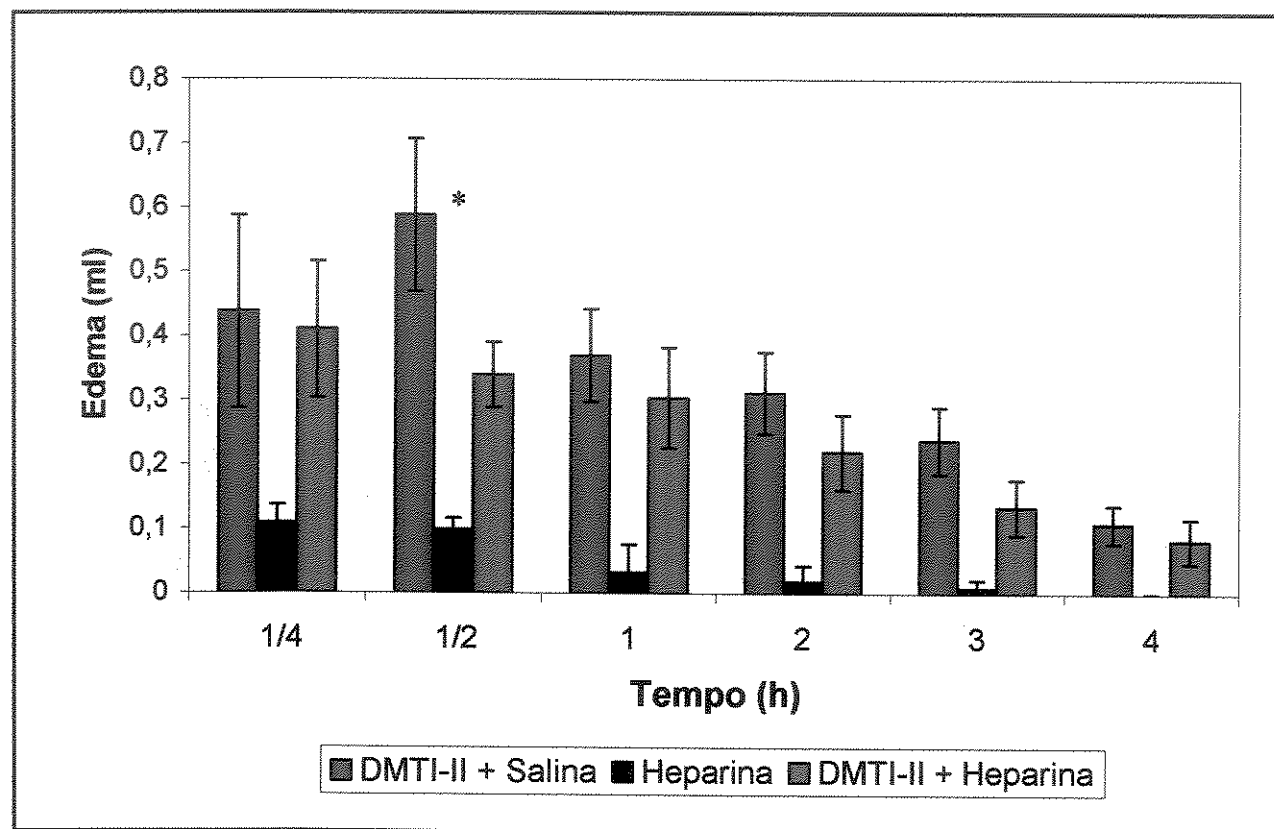


Figura 47 – Curva temporal do edema de pata de rato induzido por DMTI-II (30 μ g/pata) e heparina. O edema é expresso como o aumento do volume (ml) da pata em relação ao volume inicial. Cada coluna representa a média de seis animais $\pm$ SD. No intervalo de 30 min, os resultados são diferentes entre si com $P < 0,05$. (ANOVA, teste de Bonferroni)

3.3. Efeito de DMTI-II na desgranulação *in vitro* de mastócitos peritoneais de ratos

O inibidor DMTI-II não induziu a liberação *in vitro* de histamina presente em mastócitos de ratos como está evidenciado na Figura 48, pois quando comparado ao grupo controle, não é observado uma diferença significativa. A liberação *in vitro* de histamina causada pelo composto 48/80 representa a ação de um estímulo positivo no processo de desgranulação de mastócito

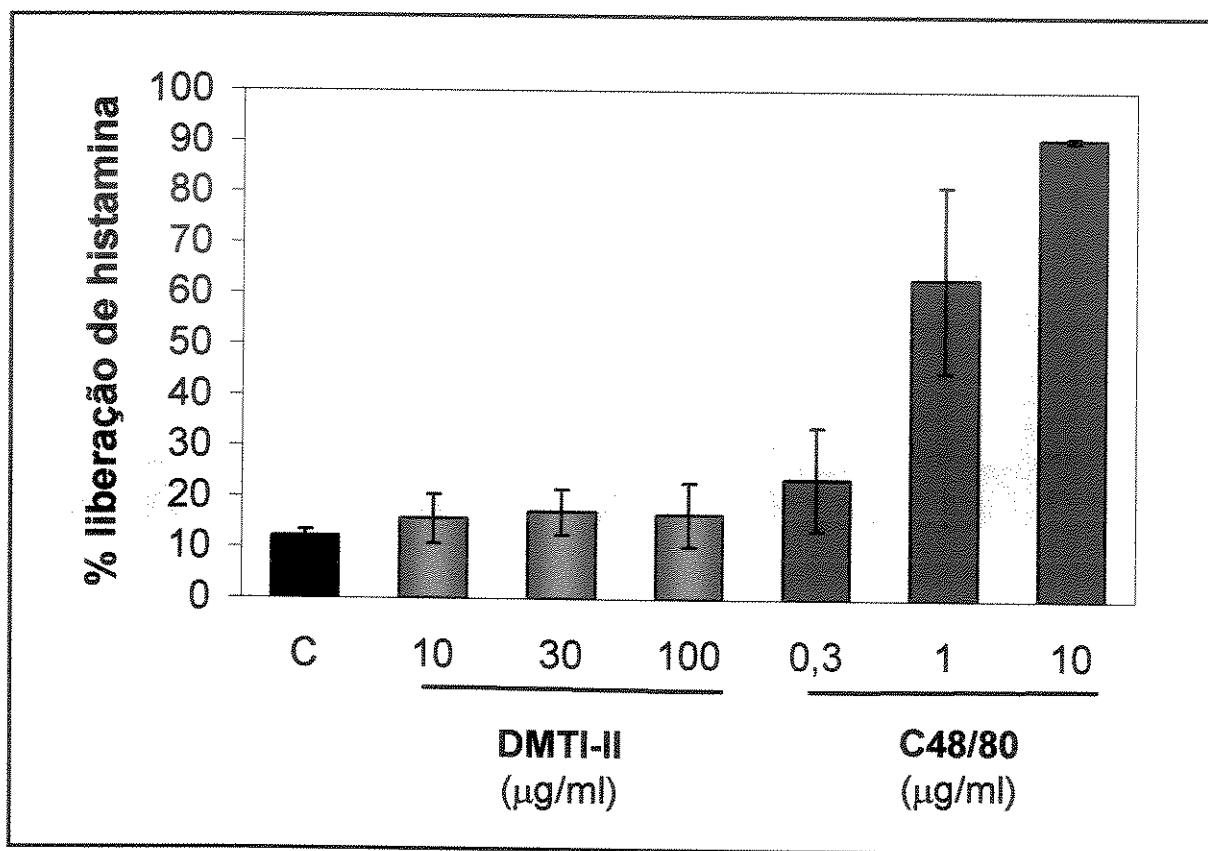


Figura 48 – Liberação de histamina de mastócitos peritoneais de ratos induzida por DMTI-II (10-100 µg/ml) e C48/80 (0,3 - 10µg/ml). Cada coluna representa a média de 4 experimentos $\pm$ SD, sendo a liberação de histamina expressa como a porcentagem de liberação no sobrenadante em relação ao conteúdo celular total. Nenhuma dose de DMTI-II apresentou uma diferença significativa na liberação de histamina, quando comparado ao controle, com $P < 0,05$ (ANOVA, teste de Bonferroni)

3.4. Edema de pata de ratos tratados com capsaicina

A Figura 49 ilustra que o edema de pata induzido por DMTI-II (30 μ g/pata) observado em ratos tratados com capsaicina, um depletor de neuropeptídeos de fibras sensoriais, não apresentou diferença significativa com o grupo controle, cujos animais foram tratados com o veículo da capsaicina.

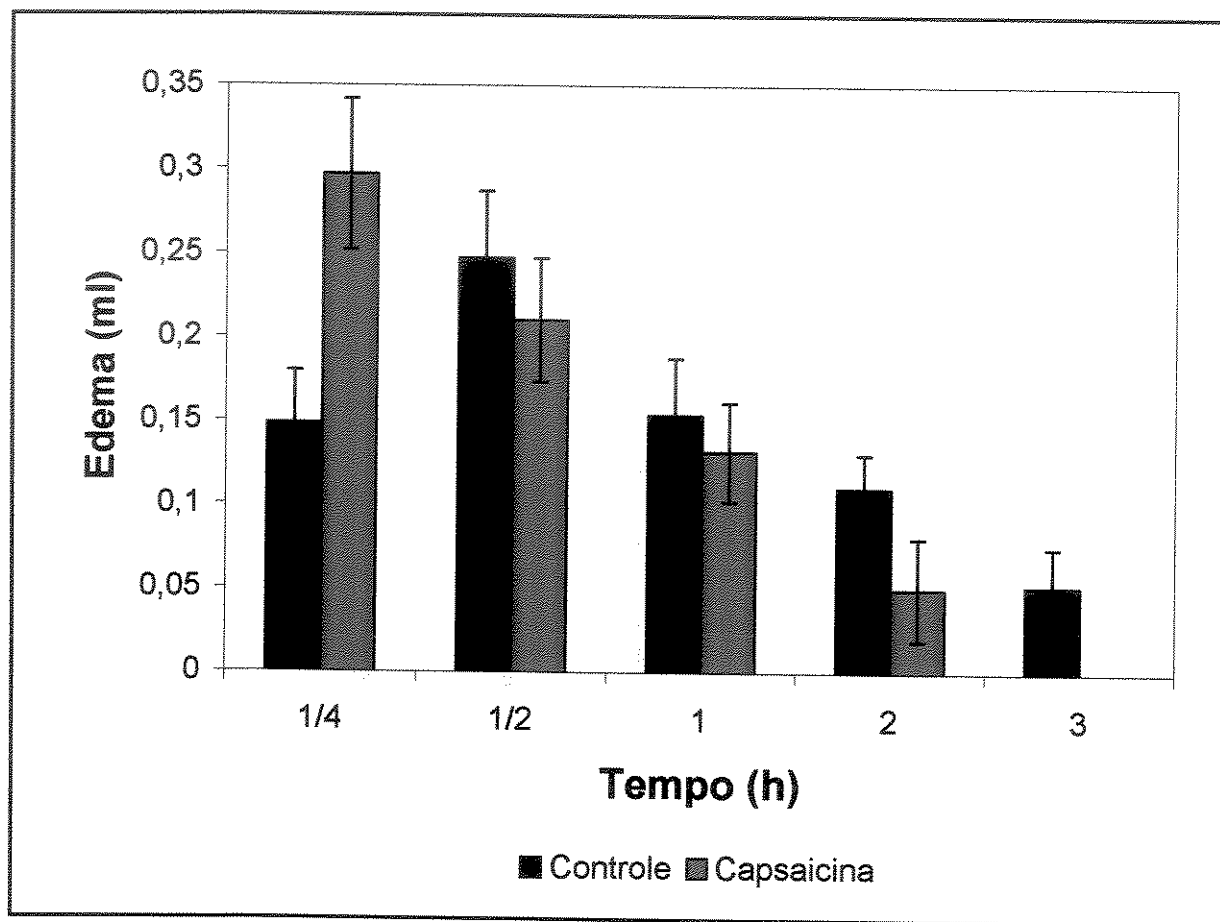


Figura 49 – Curva temporal do edema de pata de rato induzido por DMTI-II (30 μ g/pata) em ratos tratados com capsaicina. O edema é expresso como o aumento do volume (ml) da pata em relação ao volume inicial. Cada coluna representa a média de seis animais $\pm$ SD. No intervalo de 30 min, os resultados não foram diferentes entre si ($P < 0,05$; ANOVA, teste de Bonferroni).

3.5. Edema de pata em rato induzido por DMTI-II e a liberação de bradicinina

Quando os animais foram pré-tratados com a droga HOE 140 (Icatiban) (antagonista de receptores de bradicinina), o edema de pata induzido por DMTI-II (30 $\mu\text{g/pata}$), que tem resposta máxima 30 min após a injeção subplantar, foi reduzido em cerca de 33% (Figura 50). Para evidenciar o efeito desta droga, foram feitos dois grupos controles que tiveram edema de pata induzido por bradicinina (50 $\mu\text{g/pata}$). No grupo pré-tratado HOE 140, o edema induzido por bradicinina foi reduzido em cerca de 79%, 30 min após o estímulo.

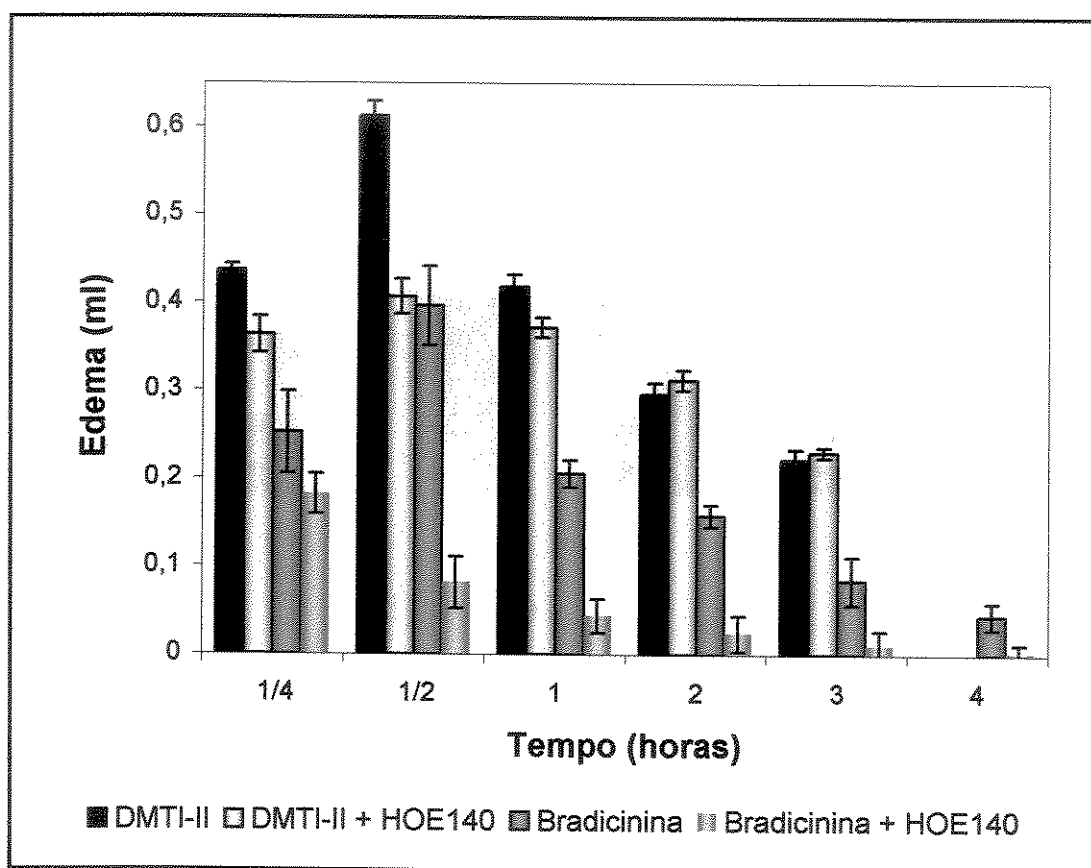


Figura 50 – Efeito de HOE 140 no edema de pata de rato induzido por DMTI-II (30 $\mu\text{g/pata}$) e bradicinina (50 $\mu\text{g/pata}$). Edema está expresso como o aumento do volume (ml) da pata em relação ao volume inicial. Cada coluna representa a média de seis animais $\pm$ SD. No intervalo de 30 min, apenas os valores do grupo *DMTI-II + HOE140* e *Bradicinina* não apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$; ANOVA, teste de Bonferroni).

A Figura 51 mostra os resultados obtidos quando os animais foram pré-tratados com indometacina (um inibidor da via da ciclooxigenase), SR140333 e SR48968 (antagonistas seletivos de receptores de taquicininas NK₁ e NK₂, respectivamente). O edema induzido pela injeção de DMTI-II (30 µg/pata), 30 minutos após o estímulo, foi reduzido em cerca de 50% pelo antagonista seletivo de receptores de taquicininas NK₂ (SR48968), 37% pelo antagonista seletivo de receptores de taquicininas NK₁ (SR140333); e 33% por indometacina (o inibidor da ciclooxigenase).

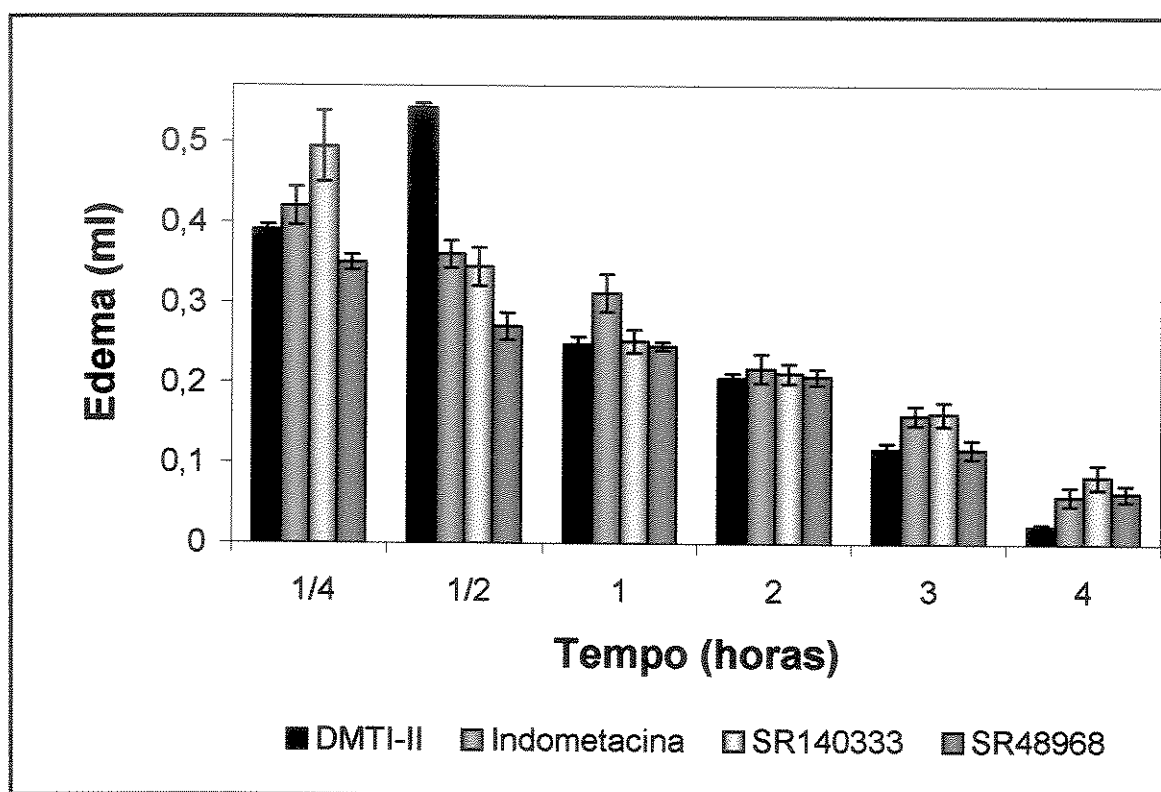


Figura 51 – Efeito de indometacina, SR140333 e SR48968 no edema de pata de rato induzido por DMTI-II (30 µg/pata). Edema está expresso como o aumento do volume (ml) da pata em relação ao volume inicial. Cada coluna representa a média de seis animais $\pm$ SD. Análises estatísticas mostraram que no intervalo de 30 minutos, os valores obtidos nos grupos pré-tratados (indometacina, SR140333 e SR48968) apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle (DMTI-II) ($P < 0,05$; ANOVA, teste de Bonferroni).

VI. DISCUSSÃO

Dois inibidores de tripsina, DMTI e DMTI-II, presentes nas sementes de *Dimorphandra mollis* (Leguminosae-Mimosoideae) foram purificados e caracterizados respectivamente por Macedo *et al.* (2000) e Mello *et al.* (2001). A realização de um estudo comparativo dos dois inibidores torna-se necessária para verificar a existência ou não de diferenças na estabilidade e características da atividade inibitória de ambos. Dessa forma, o inibidor DMTI foi também submetido às diferentes condições e reagentes para avaliar a estabilidade da atividade inibitória e assim os resultados foram comparados com aqueles obtidos para DMTI-II já publicados (Mello *et al.*, 2001). O estudo comparativo do papel biológico de ambos torna-se muito interessante, pois é possível mostrar que os inibidores presentes nas sementes de *Dimorphandra mollis* são diferentes em relação a sua aplicabilidade biológica.

As proteínas de modo geral, podem ser desnaturadas por uma variedade de condições e de substâncias, por exemplo, a atuação da variação de temperatura e pH, bem como a ação de agentes redutores tais como o DTT, uréia e cloreto de guanidina. Alguns estudos relatam a utilização de agentes redutores para monitorar a atividade inibitória e mudanças conformacionais, que são analisadas por métodos espectrofotométricos, tais como a emissão fluorescente (Lehle *et al.*, 1996; Ramasarma *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 2000).

Um grande número de inibidores de sementes é surpreendentemente resistente à desnaturação por aquecimento. Pesquisadores atribuem esta estabilidade incomum dos inibidores ao seu conteúdo, relativamente alto, de pontes dissulfeto, mas esta não pode ser a única razão da termoestabilidade dos inibidores de quimotripsina presente em batata e em cevada, que apresentam uma única ou nenhuma ponte dissulfeto (Richardson, 1991). Diante disso, os resultados da termoestabilidade de DMTI mostraram que este sofreu uma pequena diminuição de sua atividade após ter sido incubado a 60 °C, por 20 minutos. Nesta temperatura, DMTI perdeu cerca de 20% da atividade enquanto DMTI-II perdeu

40% da atividade inibitória (Figura 5), mostrando que DMTI é relativamente mais estável que DMTI-II. DMTI é mais um inibidor do tipo Kunitz que apesar das poucas pontes dissulfeto, apresenta uma termoestabilidade assim como o inibidor de *Schizolobium parahyba* descrita por Souza *et al.* (1995).

As variações de pH alteram o estado iônico das cadeias laterais de aminoácidos, alterando, portanto, a distribuição de cargas e a necessidade da existência de pontes de hidrogênio, que contribuem para a estabilidade das proteínas. Assim como DMTI-II, DMTI não sofreu variação considerável quando submetemos a diferentes condições de pH o que confirma que este inibidor também é notavelmente estável a uma ampla faixa de pH, inclusive nas condições extremas (Figura 6). A estabilidade de inibidores a diferentes condições de pH é fato já registrado na literatura (Richardson, 1991) e foi observado também por Batista *et al.* (1996) quando estudaram a estrutura primária de um inibidor do tipo Kunitz presente em sementes de *Enterolobium contortisiliquum*, o ECTI. Macedo *et al.* (2003) observaram que o inibidor de *Peltophorum dubium*, PDTI, também da família de Kunitz, não sofre redução de sua atividade inibitória; bem como Garcia *et al.* (2004) que caracterizaram o inibidor presente em sementes de *Poecilanthus parviflora*, o PPTI.

A ação de um agente redutor, como o DTT, sobre as pontes dissulfeto presentes no inibidor pode causar danos à sua integridade, e provavelmente, afetar a atividade antitriptica do mesmo, dependendo da localização dessas pontes em relação ao seu sítio reativo. Assim, foi realizado um estudo para verificar a ação do DTT sobre a atividade inibitória de DMTI e conseqüentemente comparar os efeitos causados pelo mesmo agente na atividade de DMTI-II. Observamos que o DTT não apresentou nenhum efeito considerável sobre a estabilidade da atividade inibitória de DMTI (Figura 6B), fato também observado com DMTI-II (Figura 6A). Lehle *et al.* (1996) também relataram que ETI, um inibidor de tripsina da família de Kunitz presentes em sementes de *Erythrina caffra*, conservou sua atividade inibitória após redução com DTT. Macedo *et al.* (2003) observaram que quando o inibidor PDTI foi incubado, por 120 minutos, com 10 mM de DTT, a atividade inibitória sofreu um decréscimo de 60%; já quando incubado com 100 mM do agente redutor, o mesmo perdeu 90% de sua atividade. Fato semelhante foi

demonstrado por Garcia et al. (2004), cujo inibidor PPTI perdeu 85% de sua atividade quando incubado com a mesma concentração de DTT por 120 minutos. Aparentemente, a estabilidade dos inibidores de *Dimorphandra mollis* não está relacionada à presença de pontes dissulfeto.

Outros agentes redutores tais como uréia e cloreto de guanidina (GdnHCl) são também utilizados para verificar sua possível ação na atividade e conformação dos inibidores como já fizeram Lehle *et al.* (1996), Ramasarma *et al.* (1995) e Souza *et al.* (2000). Em concentrações entre 5 e 8M, eles são os desnaturantes protéicos mais comumente utilizados; e a efetividade como desnaturantes é devida à sua habilidade em romper interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio. Enquanto a uréia atua sobre essas duas ligações, os íons originados do GdnHCl modulam as interações eletrostáticas (Wang *et al.* 2000). Para estudar os efeitos destes agentes na estrutura destas proteínas, utiliza-se método espectrofotométrico como o monitoramento da emissão fluorescente. Contudo este procedimento ainda não foi realizado no estudo da estabilidade dos dois inibidores de *Dimorphandra mollis*, sendo, portanto uma próxima etapa a ser cumprida.

Os resultados obtidos com a incubação por 1 hora, a 37°C, de DMTI-II e DMTI com concentrações crescentes de uréia e cloreto de guanidina intensificam a necessidade de aprofundamento do estudo. A Figura 8 mostra que a uréia não foi capaz de alterar significativamente a atividade dos dois inibidores, mesmo na concentração de 8M após 1 hora de incubação. No entanto, foi observado que a ação do cloreto de guanidina foi mais acentuada na atividade inibitória de DMTI-II, pois na concentração de 6 M de GdnCl, DMTI-II apresentou cerca de 50% de atividade residual enquanto DMTI, 78% (Figura 9). A diferença existente entre os efeitos dos dois agentes desnaturantes sugere que as interações hidrofóbicas não são as principais forças necessárias à estabilidade do sítio reativo dos inibidores, e talvez sim as interações eletrostáticas, pois o GdnHCl mostrou ter mais efeito em ambos inibidores. Já a diferença resultante deste efeito entre os dois inibidores pode estar relacionada com a exposição do sítio reativo aos íons de cloreto de guanidina.

Os resultados obtidos da caracterização físico-química dos inibidores de *D. mollis* motivaram a investigação da estrutura protéica de ambos. Com a finalidade de melhor elucidar, DMTI-II e DMTI foram submetidos a análises de dicroísmo circular (CD) e calorimetria de varredura diferencial (DSC). Em água ou em tampão fosfato, ambos apresentaram grande quantidade de estruturas desordenadas, fato descrito na literatura para esta classe de inibidores (Hag & Khan, 2003), conforme ilustrado nas Figuras 10 e 11. Batista *et al.* (2001) mostraram que o espectro de EcTI, obtido por dicroísmo circular, era constituído por 59% de estruturas do tipo folha- β e 41% de estruturas irregulares ou desordenadas. Quando incubados com SDS e TFE, os inibidores apresentaram diferenças na tendência estrutural. O TFE (2,2,2 trifluororetanol) é um agente capaz de induzir a formação de estruturas α -hélice em proteínas, favorecendo estabilização da mesma. DMTI (Figura 13) mostrou maior tendência em formar estruturas α -hélice, evento que não foi observado para DMTI-II (Figura 12).

O aumento de temperatura provoca o desenovelamento de uma proteína, este desenovelamento provoca uma variação da capacidade calorífica mensurável pela técnica de calorimetria de varredura diferencial (DSC). Um dos parâmetros que é extraído do desenovelamento térmico por DSC é o T_m ou temperatura de transição. No T_m , 50% das proteínas estão enoveladas e outros 50% encontram-se desenoveladas (Shnyrov, *et.al.*, 1997). No estudo de calorimetria de varredura diferencial de DMTI-II foi possível determinar que este inibidor possui um $T_m = 70\text{ }^{\circ}\text{C}$ e uma transição irreversível. Este resultado é condizente com aquele obtido para o experimento da estabilidade térmica de DMTI-II. Quando o inibidor foi aquecido numa temperatura maior que a temperatura equivalente ao seu T_m , a reação foi irreversível (Figura 5).

O estudo dos papéis biológicos dos inibidores de *Dimorphandra mollis* possibilita esclarecer a aplicação destas moléculas como ferramenta biológica. Baseado no conhecimento de que plantas utilizam substâncias químicas para se defenderem da agressão de animais predadores, insetos, microorganismos e muitos outros fitopatógenos, a ação desses inibidores como agentes inseticidas foi investigada. Muitos estudos têm sido realizados nesta área direcionando a ação de inibidores de proteinases já que estes se mostram capazes de reduzir o desenvolvimento e sobrevivência de uma gama de insetos, quando são adicionadas as suas dietas. Muitas pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de verificar a eficácia deste papel biológico, e trazer assim contribuições para a agricultura (Jouanin *et al.*, 1998).

Para verificar a aplicabilidade da ação inseticida dos inibidores e ou de qualquer outra proteína, são utilizados métodos que envolvem ensaios de inibição *in vitro* das proteases presentes no trato digestivo do inseto pelos inibidores alvo do estudo, testes de alimentação de insetos onde dietas artificiais contendo a proteína de estudo e numa fase mais avançada, a produção de plantas transgênicas, onde o aumento de sua resistência seria decorrente da transferência de genes codificantes de inibidores de proteinases.

Segundo Broadway (1997), os estudos de inibição *in vitro* tanto de enzimas comerciais ou daquelas presentes no trato digestivo do inseto alvo são necessários para determinar o efeito do inibidor sobre estas proteases. Através desta simulação, o potencial desta proteína em inibir o desenvolvimento do inseto quando ingerida pode ser avaliado.

Em geral, os inibidores de serinoproteinases são efetivos contra insetos da ordem Lepidoptera, já que estas são as enzimas majoritárias detectadas no intestino médio destes insetos (Mazumdar-Leighton & Broadway, 2001). No nosso estudo, duas espécies desta ordem, pertencentes à família Pyralidae, foram utilizadas, *Corcyra cephalonica* e *Anagasta kuehniella*. Ambas são responsáveis pelas perdas de grãos estocados importantes economicamente, tais como arroz, sorgo, trigo, além de produtos deles derivados.

Com o intuito de verificar os efeitos dos inibidores de tripsina presentes nas sementes de *Dimorphandra mollis*, DMTI e DMTI-II, sobre as enzimas digestivas de

larvas dessas duas espécies, estudos de inibição e de digestibilidade *in vitro* foram realizados. Primeiramente, foi realizado a incubação dos inibidores com as enzimas digestivas de ambas espécies para verificar a ocorrência da inibição. Quando incubadas as enzimas de *Anagasta kuehniella* com 0,4 µg/ml de DMTI e de DMTI-II, a inibição da atividade de enzimas do tipo tripsina foi, respectivamente, 69% e 49%. Na concentração máxima testada, de 0,8 µg/ml, enquanto DMTI-II inibiu cerca de 59%, DMTI inibiu cerca de 78% da atividade enzimática (Figura 15). Com exceção da concentração 0,6 µg/ml (segundo análise estatística), as enzimas do tipo tripsina de *Corcyra cephalonica* sofreram igualmente a ação dos dois inibidores nas concentrações testadas. Cerca de 74% da atividade enzimática foi inibida quando incubada com 0,8 µg/ml de DMTI e de DMTI-II (Figura 16).

Em seguida, foi realizado um estudo da digestibilidade *in vitro* de DMTI e DMTI-II pelas enzimas presentes no intestino médio das larvas de *Corcyra cephalonica* e *Anagasta kuehniella*, para verificar se esses inibidores eram refratários à digestão pelas enzimas destes insetos. Foi verificado que até 6 horas, os dois inibidores não sofreram digestão enzimática pelas proteases de *Anagasta kuehniella* (Figura 17). Quando analisada a eletroforese em PAGE-SDS das alíquotas do ensaio de digestibilidade dos inibidores pelas enzimas de *Corcyra cephalonica*, foi observada que DMTI-II e DMTI não sofreram digestão enzimática até 6 horas de incubação com as proteases (Figura 18). Macedo *et al.* (2003) também realizaram ensaios de inibição e digestibilidade *in vitro* do inibidor purificado de sementes de *Peltophorum dubium*, o PDTI. Este inibidor foi capaz de inibir proteinases de cinco espécies de insetos, entre elas a *Anagasta kuehniella*, e quando incubado com suas proteinases no teste de digestibilidade mostrou ser refratário à digestão por até 72 horas de incubação.

Outra questão abordada no estudo foi a resistência dos inibidores, ou seja, a manutenção da atividade inibitória após o ensaio de digestibilidade *in vitro* pelas proteinases de *A. kuehniella* e *C. cephalonica*. Assim, após terem sido incubados até 6 horas com as enzimas destes dois insetos, DMTI-II e DMTI apresentaram um decréscimo na atividade. No experimento com *A. kuehniella* (Figura 19), após 3 horas de incubação,

DMTI-II apresentava cerca 31% de sua atividade, enquanto DMTI, 18%. Quando analisadas as alíquotas que foram incubadas por 6 horas, os valores foram respectivamente, 39% e 1%, mostrando que DMTI-II provavelmente é mais resistente a ação proteolítica do que DMTI, embora este inibidor não tenha sofrido a digestão enzimática conforme ilustra a Figura 17. No ensaio de inibição *in vitro* (Figura 15), DMTI mostrou ser mais efetivo contra as proteases deste inseto, provavelmente devido a uma afinidade maior do que para DMTI-II. Provavelmente, a exposição do inibidor e de seu sítio reativo a ação enzimática das proteases de *A. kuehniella* tenha ocasionado modificações que acarretaram a perda de sua atividade após o ensaio de digestibilidade.

Em relação à resistência dos inibidores após incubação com as proteases de *C. cephalonica* (Figura 20), também foi constatado que até 6 horas, ocorre o decréscimo da atividade de DMTI-II e DMTI, sendo este mais suscetível à ação das proteases do que DMTI-II.

Os resultados obtidos dos experimentos *in vitro* conduziram a uma segunda etapa do estudo da atividade inseticida dos inibidores DMTI-II e DMTI, o ensaio *in vivo*, onde eles foram oferecidos como fonte de alimento numa dieta artificial com a finalidade de analisarmos os parâmetros de crescimento e desenvolvimento das duas espécies de insetos.

A quantidade e qualidade do alimento consumido na fase larval afetam a taxa de crescimento, o tempo de desenvolvimento, o peso corpóreo, sobrevivência, bem como influenciam a fecundidade, longevidade, movimentação e capacidade de competição dos adultos (Panizzi *et al.*, 1991). Em todas as concentrações testadas (0,5; 1,0 e 2,0 %) de DMTI-II não foram observados efeitos significativos do inibidor sobre a sobrevivência larval de *Anagasta kuehniella* (Figura 21A), embora tenha ocorrido uma diminuição no peso larval quando o inibidor foi incorporado nas concentrações de 1 e 2 % (Figura 21B). Resultado similar foi encontrado quando os foram avaliados os efeitos do inibidor no consumo da dieta e na quantidade de fezes produzidas (Figuras 22A e 22B), a presença de DMTI-II a 2% na dieta não afetou significativamente o consumo do alimento embora

tenha diminuído a produção de fezes. Estes resultados refletem nos índices nutricionais encontrados para o ensaio in vivo com *A. kuehniella* e relacionados na Tabela 1.

A eficiência de conversão de alimento ingerido (ECI) representa a percentagem de alimento ingerido que é transformada em biomassa; e a eficiência de conversão de alimento digerido (ECD) é a estimativa da conversão de alimento ingerido que é assimilado pelo inseto (Hernández, 1995). Os índices ECI e ECD foram menores na dieta contendo 2% de DMTI-II; significando que nesta dieta, uma menor quantidade de alimento foi utilizada para a produção de biomassa do inseto, o que justifica menor peso larval menor produção de fezes nos insetos alimentados com o inibidor. O custo metabólico (CM) dessa dieta foi maior que o da dieta controle, pois provavelmente uma quantidade maior de energia proveniente da dieta tenha sido utilizada no processo de degradação do inibidor presente. A digestibilidade aproximada (AD) também foi maior na dieta contendo DMTI-II, fato que sugere a necessidade de que o alimento permanecesse no tubo digestivo por um tempo maior para permitir a degradação ou neutralização dos efeitos do inibidor. Logo esse maior tempo de contato do alimento com as enzimas digestivas provavelmente tenha permitido maior digestibilidade do alimento.

Em resposta a ingestão de um inibidor, os insetos podem se adaptar a ingestão de inibidores de proteinases. Lepidópteros podem superexpressar proteases intestinais ou induzir a produção de novos tipos de proteases ou de formas insensíveis a estes inibidores com a finalidade de superar os efeitos deletérios da ingestão destas proteínas (Jonsgma & Boulter, 1997; Volpicella *et al.*, 2003).

Após o ensaio de alimentação, a atividade enzimática do fluído intestinal (IM) e das fezes dos insetos foi avaliada para avaliar os efeitos da presença de DMTI-II na dieta. Foi constatado que tanto no IM quanto nas fezes, a atividade das enzimas do tipo tripsina foi reduzida devido à presença do inibidor já que a produção de nmol de BAPNA hidrolisado foi menor nos dois casos (Figura 23). Entretanto, a exposição das enzimas do IM do grupo alimentado com o inibidor novamente a concentrações crescentes de DMTI-II mostrou que estas enzimas foram pouco sensíveis (Figura 24). A atividade em gelatina das enzimas do IM e das fezes de larvas alimentadas com as dietas artificiais (Figura 25)

além de reforçar os resultados mostrados nas Figuras 23A e 23B, confirma a atividade de enzimas do tipo tripsina., embora essas enzimas tenham sofrido uma pequena alteração no peso molecular.

Em relação aos efeitos de DMTI-II sobre a espécie *Corcyra cephalonica*, a presença do inibidor na dieta não afetou a sobrevivência e o peso corpóreo das larvas (Figura 26), bem como consumo da dieta e a produção das fezes (Figura 27). Conseqüentemente, o metabolismo das larvas deste inseto não foi alterado quando comparado ao metabolismo das larvas alimentadas com dieta sem DMTI-II (Tabela 2). Em resposta a ingestão do inibidor, a atividade das enzimas do IM e das fezes não foi afetada (Figura 28); dado também confirmado quando a atividade dessas enzimas em gelatina foi verificada (Figura 30). Entretanto, a exposição destas enzimas a concentrações crescentes de DMTI-II sugere que, de alguma maneira, a ingestão do inibidor tornaram-nas insensíveis (Figura 29) aparentemente sem interferir diretamente no metabolismo do inseto. Estes resultados evidenciam uma diferença no modo de ação de um mesmo inibidor sobre duas espécies diferentes de lepidópteros.

Quando DMTI foi oferecido às larvas de *Anagasta kuehniella* em concentrações crescentes, nenhuma alteração na sobrevivência e no peso larval foi constatada (Figura 31), logo não houve diferença na eficiência de conversão de alimento ingerido (ECI) quando comparado o grupo controle com o grupo alimentado com DMTI a 2% (Tabela 3). A presença de DMTI a 2 % não interferiu no consumo da dieta (Figura 32A) embora tenha afetado a produção de fezes das larvas alimentadas com o inibidor (Figura 32B). Em decorrência disto, a eficiência de conversão de alimento digerido (ECD) foi menor no grupo alimentado com DMTI, enquanto que o custo metabólico (CM) e a digestibilidade aparente (AD) neste mesmo grupo foi maior do que o valor encontrado para o grupo controle (Tabela 3). O aumento desses dois índices, CM e AD, indicam que provavelmente que o inseto necessitou além de mais energia, maior tempo de digestão do alimento ingerido a fim de possibilitar, por exemplo, o aumento da produção enzimática para proporcionar a neutralização da ação do inibidor que poderia prejudicar o seu desenvolvimento.

Embora não tenham ocorrido alterações na sobrevivência e peso larval, a atividade enzimática do IM e das fezes sofreu um acréscimo significativo de, respectivamente, 14% e 6% (Figura 33); fato que foi confirmado através da eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina (Figura 35). No ensaio antitriptico, as enzimas do IM do grupo alimentado com o inibidor quando incubadas com concentrações de 4 e 6 $\mu\text{g/ml}$ de DMTI mantiveram cerca de 100% da atividade triptica, enquanto que as enzimas do grupo controle perderam respectivamente, 20 e 48% da atividade; mostrando que além de aumentar a produção de enzimas, *A. kuehniella* talvez tenha sintetizado enzimas do tipo tripsina insensíveis ao inibidor DMTI (Figura 34).

Quanto aos efeitos de DMTI a 2% sobre o lepidóptero *Corcyra cephalonica*, a presença do inibidor na dieta não interferiu na sobrevivência e no peso larval (Figura 36), reforçando os valores de ECI que não foram diferentes entre os grupo alimentados com a dieta controle e com o inibidor. A inexistência de uma diferença significativa entre o ECD do grupo controle e do grupo alimentado com DMTI mostra que também não houve diferença quanto à taxa de alimento assimilado. Isto se explica pelo fato de que embora o inibidor tenha causado redução no consumo e na produção de fezes, respectivamente de 36% e 27% (Figura 37), não houve diferença na relação peso médio larval/alimento assimilado de ambos os grupos e o consumo e produção de fezes foram proporcionais.

Os índices AD e CM também não apresentaram diferença significativa nos dois grupos, mostrando que a presença de DMTI não interferiu no metabolismo do inseto. Este fato é confirmado também pela resposta da atividade das proteinases presentes no IM de *C. cephalonica* que não sofreram nenhuma alteração (Figura 38A). Já a atividade enzimática das fezes das larvas alimentadas com DMTI sofreu uma redução de 89% talvez porque além da diminuição das fezes, o inibidor tenha sido eliminado quase que totalmente nelas, justificando também a ausência de alteração no metabolismo do inseto. O resultado da atividade antitriptica das enzimas do IM de larvas alimentadas ou não com DMTI a 2% demonstra que quando incubadas com 6 μg do inibidor ocorre uma redução de 25% enquanto que nas enzimas da dieta controle houve uma redução de 60%, indicando, possivelmente, a produção de enzimas do tipo tripsina pouco sensíveis.

Buscar alternativas naturais que possam ser utilizadas no controle de pragas causadoras de prejuízos na produção agrícola tornou-se um objetivo de muitos pesquisadores que procuram amenizar os diversos problemas provenientes do uso de inseticidas sintéticos. Esclarecer e compreender os mecanismos de ação dos inibidores como agentes inseticidas é de fundamental importância para o avanço da biotecnologia que visa melhorar a produção de alimentos bem como aumentar a qualidade de vida da população mundial. Embora, DMTI-II e DMTI não tenham apresentado um potencial como agente inseticida contra os lepidópteros aqui estudados, não é descartado de forma alguma a sua aplicabilidade contra outras espécies de insetos.

De acordo com a literatura, os inibidores de proteinases são ferramentas úteis nos estudos bioquímicos e fisiológicos (Oliva *et al.* 1999), podendo ser utilizados para a purificação de enzimas proteolíticas por cromatografia de afinidade ou para esclarecer o papel destas no processo de coagulação sanguínea (Hayashi *et al.* 1994; Oliva *et al.* 2000). Outra aplicação dos inibidores de proteinases seria a atuação destes no processo inflamatório. Oliva *et al.* (2000) mostraram que o inibidor de *Leucaena leucocephala* (LITI), além de inibir algumas enzimas da coagulação sanguínea; quando administrado intravenosamente, atuava no processo inflamatório, causando uma diminuição no edema de pata de rato induzido por carragenina ou pelo calor, apresentando assim uma ação antiinflamatória.

Todavia, esta propriedade antiinflamatória não foi observada para os inibidores de *Dimorphandra mollis*. O estudo dos efeitos de inibidores de serinoproteinases num modelo inflamatório, tal como a indução de edema de pata de rato, tendo estas moléculas como agentes inflamatórios ainda não havia sido relatado na literatura. Os resultados obtidos com DMTI-II e DMTI permitem analisar um novo papel biológico destas proteínas. A Figura 41 mostra o primeiro resultado obtido com DMTI-II na indução de edema de pata de rato. Quando DMTI-II foi injetado em doses crescentes na região subplantar da pata do animal, foi observado um aumento no volume da pata em relação ao volume inicial. Até mesmo o edema induzido por um agonista clássico no estudo de processos inflamatórios, a carragenina, foi menor do que o induzido por este inibidor. A injeção de concentrações ou doses crescentes de DMTI-II resultou numa curva dose-dependente (Figura 41), sendo que a resposta máxima para todas as doses ocorreu 30 minutos após a injeção do inibidor, conforme ilustra a Figura 42.

Já o inibidor DMTI foi menos efetivo na indução do edema de pata de rato, conforme mostra a Figura 43. A resposta máxima também ocorreu 30 minutos após a injeção do inibidor (Figura 44), entretanto quando os resultados de DMTI foram comparados com os obtidos pela indução com DMTI-II, foi observado que não há uma resposta dose-dependente; além disso, o efeito da carragenina nos animais controle foi até mais efetivo que DMTI.

Como DMTI-II apresentou maior efeito na indução do edema, tornou-se interessante aprofundar os estudos relacionados ao processo inflamatório. A realização de novos experimentos possibilitaria, talvez, esclarecer o seu mecanismo de ação neste modelo biológico. Na inflamação experimental induzida por carragenina em patas de ratos, acredita-se que ocorra inicialmente uma primeira fase (em torno da 1ª hora após o estímulo) com participação de histamina e serotonina oriundos da desgranulação de mastócitos. Em uma segunda fase (2ª à 3ª hora após o estímulo), ocorreria a liberação de cininas plasmáticas e, finalmente, uma terceira fase (3ª à 4ª hora após o estímulo) onde as prostaglandinas seriam os principais mediadores presentes no sítio inflamado (Medeiros, 1995). Quando comparados os resultados obtidos no edema induzido por DMTI-II com o controle positivo do edema que foi induzido por carragenina, observa-se que o inibidor apresenta uma resposta máxima após 30 minutos de sua injeção, portanto ele estaria tendo uma participação importante na primeira fase da inflamação, ou seja, sua atuação provavelmente estaria envolvida com a liberação de histamina e ou serotonina.

A utilização de drogas antiinflamatórias, como a mepiramina e a ciproheptadina, permitiu verificar a ação do inibidor de *D. mollis*. A primeira droga é um antagonista do receptor H_1 , ou seja, trata-se de um anti-histamínico clássico que não interfere com a síntese ou liberação de histamina, mas bloqueia competitivamente a resposta do tecido-alvo mediada por receptor. A mepiramina impede a ligação da histamina liberada no meio à célula alvo. Já a segunda droga, a ciproheptadina, além de inibir receptores da histamina, também atua nos receptores da serotonina. As Figuras 46 e 45 evidenciam que o edema de pata de rato induzido por DMTI-II foi eficientemente inibido por ciproheptadina, mas não por mepiramina, já que em ratos é comum ser a serotonina um mediador mais atuante do que a histamina.

A heparina, uma molécula polianiónica, pode reduzir amplamente a ação de compostos com cargas catiónicas envolvidas na ativação de mastócitos, e consequentemente, diminuiria a liberação de histamina e ou serotonina (Lomonte *et al.*, 1994; Landucci *et al.*, 1998). Quando co-injetado com heparina, o edema de pata de rato induzido por DMTI-II foi reduzido a 32%. Existe a possibilidade das cargas catiónicas do

inibidor estarem influenciando a produção do edema já que houve a redução do mesmo quando a heparina está presente. Quando Landucci *et al.* (1998) estudaram os efeitos *in vivo* (edema de pata e de pele de rato) e *in vitro* (desgranulação de mastócitos) de duas fosfolipases A_2 homólogas presentes no veneno de *Bothrops jararacussu*: a bothropstoxina-I e a bothropstoxina-II, os pesquisadores observaram que tanto a indução do edema de pata e de pele em ratos quanto a desgranulação de mastócitos provocados pelas toxinas foram reduzidas significativamente pela presença da heparina.

Para verificar se o edema de pata induzido pelo inibidor era devido a sua ação direta na liberação de histamina através da desgranulação de mastócito, a liberação *in vitro* deste mediador por DMTI-II foi realizada. Neste experimento (Figura 48) ficou evidente que DMTI-II não foi capaz de induzir a desgranulação dos mastócitos do lavado peritoneal, devido à baixa porcentagem de histamina liberada.

Algumas toxinas apresentam mecanismo de ação que envolve a estimulação de três tipos celulares principais: os neurônios do trato-gastrintestinal, macrófagos e linfócitos, sendo este último estimulado somente quando estas toxinas são administradas sistemicamente. A estimulação dos neurônios sensoriais do trato gastrintestinal é seguida pela liberação de neuropeptídeos, que podem incluir a substância P, o principal mediador da inflamação neurogênica. Estes neuropeptídeos agiriam então em mastócitos, levando à liberação de leucotrienos, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), histamina e serotonina (Micusan & Thibodeau, 1993). A inflamação neurogênica pode ser provocada pela estimulação elétrica, química e mecânica de neurônios sensoriais e envolve ainda eventos tais como a vasodilatação, extravasamento de proteínas plasmáticas e ativação de mastócitos (Inoue, 1997). A capsaicina é uma substância classicamente empregada para depletar as fibras sensoriais do seu conteúdo de neuropeptídeos e é capaz de reduzir acentuadamente o edema e a exsudação plasmática inibindo assim a inflamação neurogênica (DeSouza & Ribeiro-da-Silva, 1998; Nimmo *et al.*, 2004). Com base nesses dados, ratos foram pré-tratados com capsaicina a fim de provocar a depleção total das fibras sensoriais para verificar se DMTI-II estaria ocasionando inflamação através desta via. Segundo a Figura 49, o edema induzido por

DMTI-II em ratos submetidos ao pré-tratamento com capsaicina não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo não tratado com esta substância.

O processo de formação do edema depende de um sinergismo entre os mediadores que aumentam a permeabilidade vascular e o fluxo sanguíneo (Brain & William, 1985). O sistema gerador de cininas está intimamente associado ao sistema da coagulação, já que o fator de Hageman ativado por superfície eletronegativa ou por endotoxinas ativa a pré-caliceína em caliceína, a qual age sobre uma globulina, o cininógeno de alto peso molecular (HMWK) gerando um nonapeptídeo vasoativo, a bradicinina, um potente agente que aumenta a permeabilidade vascular. A bradicinina também gera a contração da musculatura lisa, a dilatação de vasos sanguíneos e dor quando injetada na pele (Robbins, 1996). A utilização de um antagonista de receptores B₂ de bradicinina, HOE 140, no pré-tratamento de ratos, reduziu em cerca de 79% o edema induzido por DMTI-II (30µg/pata), 30 min após o estímulo (Figura 50); mostrando a possível participação indireta da bradicinina na ativação de mastócitos, que por sua vez liberará histamina e serotonina. Sabe-se que o edema inflamatório é dependente da ativação de fibras sensoriais aferentes (Fibras C) pela presença de cininas e subsequente ativação dos receptores B₂, que por sua vez leva à liberação local de neuropeptídeos pró-inflamatórios tais como a substância P, que finalmente induzem a desgranulação de mastócitos liberando assim a histamina e a serotonina.

O metabolismo do ácido araquidônico intensifica ainda mais a produção de mediadores inflamatórios, via a ação de ciclooxigenase ou lipooxigenase. O pré-tratamento com antagonistas seletivos para receptores NK₁ (SR140333) e NK₂ (SR48968) de taquicininas reduziu, 37% e 50%, respectivamente o edema induzido por DMTI-II (30 µg/pata) indicando a participação indireta de cininas liberadas localmente nas terminações nervosas, as taquicininas. A redução de 33 % por indometacina também indica a provável participação da via ciclooxigenase na formação do edema (Figura 51).

Tem sido mostrado que muitos compostos derivados de plantas apresentam efeitos antiinflamatórios significativos. Por esta razão, eles são considerados moléculas importantes no desenvolvimento de novas drogas, especialmente aquelas destinadas ao

tratamento ou ao controle de estados inflamatórios. Já foi mencionado que em 2000, Oliva *et al* mostraram que o inibidor de serinoproteinases presente em sementes de *Leucaena leucocephala*, o LITI, apresentava efeito antiinflamatório no edema de pata de rato induzido por carragenina, sendo que diminuía a liberação de bradicinina além de bloquear *in vitro* as enzimas envolvidas na coagulação sanguínea e na fibrinólise. Os autores sugeriram que o efeito antiinflamatório *in vivo* de LITI era devido a sua interferência no sistema calicreína-cinina.

Diante dos resultados obtidos no estudo do papel inflamatório de DMTI-II, é provável que sua ação inflamatória seja ocasionada por induzir um aumento da liberação de bradicinina e também a indução de outros mediadores que irão aumentar a permeabilidade vascular. Sabe-se que a bradicinina também atua na liberação de metabólitos do ácido araquidônico tais como a prostaciclina e a prostaglandina E₂, dois mediadores capazes de amplificar as reações inflamatórias devido a suas ações vasodiladoras. Estes resultados contribuem para o melhor esclarecimento do mecanismo de ação de DMTI-II no processo inflamatório e estimulam a continuidade desse estudo num futuro próximo com a finalidade de esclarecer, por exemplo, se o outro inibidor de *D. mollis*, DMTI, apresenta propriedade inflamatória de fato, ou talvez, possa apresentar ação antiinflamatória assim como o inibidor isolado por Oliva *e al.* (2000).

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antcheva, N.; Patthy, A.; Athanasiadis, A.; Tchorbanov, B.; Zakhariev, S.; Pongor, S. (1996). Primary structure and specificity of a serine proteinase inhibitors from paprika (*Capsicum annuum*) seeds. *Biochim. Biophys. Acta*, 1298: 95-101.
- Ashwell, G.; Harford, J. (1982). Carbohydrate – specific receptors of the liver. *Ann. Rev. Biochem.*, 51: 531-554.
- Batista, I.F.C.; Oliva, M.L.V.; Araujo, M.S.; Sampaio, M.U.; Richardson, M.; Fritz, H.; Sampaio, C.A.M. (1996). Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Phytochemistry*, 41: 1017-1022.
- Belitz, H.D. & Weder, J.K.P. (1990). Protein inhibitor of hydrolases in plant foodstuffs. *Food Rev. Int.*, 6: 151-211.
- Birk, Y. (1994). Protein proteinase inhibitors in legume seeds – overview. *Arch. Latinoam. de Nutricion*, 44: 26S-30S.
- Blanco-Labra, A.; Chagolla-Lopez, A.; Gallardo, M.; Rodriguez, V. (1995). Further characterization of the 12 kDa protease/alpha amylase inhibitor present in maize seeds. *Food Nutrition Press*, 3: 27-41.
- Boulter, D. (1993). Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Phytochemistry*, 34: 1453-1466.
- Brain, S.D., Williams, T.J. 1985. Inflammatory mechanism of inflamed-tissue factor. *Agents Actions* 3, 348-356.
- Brito, L.O.; Lopes, A.R.; Parra, J.R.P.; Terra, W.R.; Silva-Filho, M.C. (2001) Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. *Comp. Biochem. Physiol.* 128B: 365-375.
- Broadway, R.M. & Duffey, S.S. (1986). Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.*, 32: 673-680.
- Broadway, R. M. (1995). Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? *J. Physiol.*, 41(2): 107-116.
- Broadway, R.M. (1997) Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.*, 43: 855-874.
- Calich, V.L.G. & Vaz, C.A.C. (1988). *Imunologia Básica*. Livraria Editora Artes Médicas Ltda., 376p.
- Carlini, C.R. & Grossi-de-Sá, M. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon* 40: 1515-1539

- Carlini, C.R.; Oliveira, A.E.A.; Azambuja, P.; Xavier-Filho, J.; Wells, M.A. (1997) Biological effects of canatoxina in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. *J. Econ. Entomol.*, 90: 340-348.
- Christeller, J.T.; Laing, W.A.; Markwick, N.P.; Burgess, E.P.J. (1992). Midgut protease activities in 12 phytophagous Lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 22: 735-746.
- Christeller, J.T.; farley, P.C.; Ramsay, R.J.; Sullivan, P.A.; Laing, W.A. (1998). Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudates. *Eur. J. Biochem.*, 254: 160-167.
- Ciopraga, J.; Gozia, O.; Tudor, R.; Brezuica, L.; Doyle, R.J. (1999). *Fusarium* sp. Growth inhibition by wheat germ agglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1428: 424-432.
- Cirino, G.; Napoli, C.; Bucci, M.; Cicala, C. (2000). Inflammation-coagulation network: are serine protease receptors the knot? *TIPS*, 21: 170-172.
- Colman, R.W.; Marder, V.J.; Salzman, E.W.; Hirsh, J. (1982). Plasma coagulation factors. *In: Hemostasis and Thrombosis* (Colman, R.W.; Hirsh, J.; Marder, V.J.; Salzman, E.W. eds.). J. B. Lippincott, Philadelphia.
- Cunningham, S.M. & Volenec, J.J. (1996). Purification and characterization of vegetative storage proteins from alfafa (*Medicago sativa* L.) taproots. *J. Plant Physiol.*, 147: 625-632
- Davie, E.W. (1995). Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade. *Thromb. Haemost.*, 74: 1-6.
- DeClerck, Y.A. & Imren, S. (1994). Protease inhibitors: role and potential therapeutic use in human cancer. *Eur. J. Cancer*, 30A: 2170-2180.
- De Leo, F.; Bonadé-Bottino, M.; Ceci, L.R.; Gallerani, R.; Jouanin, L. (2001). Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 31: 593-602.
- DeSouza, I.A. & Ribeiro-da-Silva, G. (1998). Neutrophil migration induced by staphylococcal enterotoxin type A in mice: a pharmacological analysis. *Eur. J. Pharmacol.*, 363: 189-195.
- Devlin, T.M. (1992). *Textbook of biochemistry: with clinical correlations*. 3^a ed. Wiley-Liss, New York. 1185p.
- Duranti, M.; Gius, C. (1997). Legume seeds: protein content and nutritional value. *Field. Crop. Res.*, 53: 31-45.
- Falco, M.C.; Marbach, P.A.S., Pompermayer, P.; Lopes, F.C.C.; Silva-Filho, M.C. (2001). Mechanisms of sugarcane response to herbivory. *Genet. Mol. Biol.* 24: 113-122.

- Fernandes, K.V.S.; Sabelli, P.A.; Barratt, D.H.P.; Richardson, M.; Xavier-filho, J.; Shewry, P. (1993). The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. *Plant Mol. Biol.*, 23: 215-219.
- Ferry, N.; Edwards, M.G.; Gatehouse, J.A.; Gatehouse, A.M.R. (2004). Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 15:155-161.
- Follmer, C.; Barcellos, G. B.; Zingali, R. B.; Machado, O. L. T.; Alves, E. W.; Barja-Fidalgo, C.; Guimarães, J. A.; Carlini, C. R. (2001). Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*C. ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochem. J.*, 360: 217-224.
- Freire, M. G. M.; Gomes, V. M.; Corsini, R. E.; Machado, O. L.; de Simone, S. G.; Novello, J. C.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R. (2002). Isolation and partial characterization of a novel lectin from *Talisia esculenta* seeds that interferes with fungal growth. *Plant Physiol. Biochem.*, 40, 61-68.
- Garcia, V.A.; Freire, M.G.M.; Novello, J.C.; Marangoni, S.; Macedo, M.L.R. (2004). Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. *Protein J.*, 23: 343-350
- García-Olmedo, F.; Molina, A.; Segura, A.; Moreno, M.; Castagnaro, A.; Titarenko, E.; Rodríguez-Palenzuela, P.; Piñeiro, M.; Diaz, I. (1996). Engineering plants against pathogens: A general strategy. *Field Crops Res.*, 45: 79-84.
- Gatehouse, A.M.R. (1983). Antinutritional proteins in plants. *Development Food Prot.*, 3: 245-294.
- Gatehouse, J.A. (2002). Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytol.*, 156: 145-169.
- Gatehouse, A.M.R.; Shi, Y.; Powell, K.S.; Brough, C.; Hilder, V.A.; Hamilton, W.D.O.; Newell, C.A.; Merryweather, A.; Boulter, D.; Gatehouse, J.A. (1993). Approaches to insect resistance using transgenic plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 342, p. 279-286.
- Giudici, A.M.; Regente, M.C.; Canal, L. (2000). A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. *Plant Physiol. Biochem.*, 38: 881-888.
- Griffin, J.H. (1995). The thrombin paradox. *Nature*, 378: 337-338.
- Habibi, J.; Backus, E.A.; Huesing, J.E. (2000). Effects of phytohemagglutinin (PHA) on the structure of midgut epithelial cells and localization of its binding sites in western tarnished plant bug, *Lygus hesperus* Knight. *J. Insect Physiol.*, 46: 611-619.
- Haq, S.K.; Atif, S.M.; Khan, R.H. (2004). Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Arch. Biochem. Biophys.*,
- Harborne, J.B. (1997). *Biochemical Plant Ecology. In: Plant Biochemistry.* (Dey, P.M. & Harborne, J.B. eds.). Cap. 14, p503-515. Academic Press.

- Harsulkar, A.M.; Giri, A.P.; Gupta, V.S.; Patankar, A.G.; Gupta, V.S.; Sainani, M.N.; Ranjekar, P.K.; Deshpande, V.V. (1999). Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. *Plant Physiol.*, 121: 497-506.
- Hayashi, K.; Takehisa, T.; Hamato, N.; Takano, R.; Hara, S.; Miyata, T.; Kato, H. (1994). Inhibition of serine proteinases of the blood coagulation system by squash family protease inhibitors. *J. Biochem.*, 116: 1013-1018.
- Heath, R.L.; McDonald, G.; Christeller, J.T.; Lee, M.; Bateman, K.; West, J.; Heeswijck, R.V.; Anderson, M.A. (1997). Proteinase inhibitors from *Nicotiana glauca* enhance plant resistance to insect pests. *J. Insect Physiol.*, 43: 833-842.
- Hejgaard, J.; Dam, J.; Petersen, L.C.; Bjorn, S.E. (1994). Primary structure and specificity of the major serine proteinase inhibitor of amaranth (*Amaranthus caudatus* L.) seeds. *Biochim. Biophys. Acta*, 1204: 68-74.
- Hiemstra, P.S. (2002). Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochemical Society Transactions*, 30(2): 116-120.
- Hilder, V.A. & Boulter, D. (1999). Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. *Crop Protection*, 18: 177-191.
- Hojima, Y.; Pierce, J.V.; Pisano, J.J. (1980). Hageman factor fragment inhibitor in corn seeds: purification and characterization. *Thromb. Res.*, v. 20, p. 149-62.
- Hojima, Y.; Pierce, J.V.; Pisano, J.J. (1982). Pumpkin seed inhibitor of human factor XIIa (Activated Hageman factor) and bovine trypsin. *Biochemistry*, v. 21, p. 3741-6.
- Hua, X. (1986). Tachykinins and calcitonin gene-related peptide in relation to peripheral functions of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiol. Scand.* 551: 1-44
- Huesing, J.E.; Murdock, I.L.; Shade, R.E. (1991). Effect of wheat germ isolectins on development of cowpea weevil. *Phytochemistry*, 30: 785-788.
- Hurley, J.V. (1978). The sequence of early events. In: *Handbook of experimental pharmacology*. Vane, J.R. and Ferreira, S.H. (Eds), Springer-Verlag, 26-67.
- Janciauskiene, S. (2001). Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles. *Biochimica et Biophysica Acta* 1535: 221-235.
- Johnson, R.; Narvaez, J.; An, G.; Ryan, C.A. (1989). Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:9871-9875
- Jongsma, M.A.; Bakker, P.L.; Peters, J.; Bosch, D.; Stiekema, W.J. (1995). Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 8041-8045.

- Jongsma, M. & Bolter, C. (1997). The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.*, 43: 885-895.
- Jouanin, L.; Bonade-Bottino, M.; Girard, C.; Morrot, G.; Giband, M. (1998). Transgenic plants for insect resistance. *Plant Sci.* 131: 1-11.
- Kalsheker, N.; Morley, S.; Morgan, K. (2002). Gene regulation of the serine proteinase inhibitors α_1 -antitrypsin and α_1 -antichymotrypsin. *Biochem. Soc. Trans.*, 30: 93-98.
- Kennedy, A.R. (1998). Chemopreventive agents: protease inhibitors. *Pharmacol. Ther.*, 78(3): 167-209.
- Koiwa, H.; Bressan, R.A.; Hasegawa, P.M. (1997). Regulation of proteases inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science*, 2: 379-384.
- Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin inhibitor II. General Properties. *J. Gen. Physiol.*, 30: 291-310.
- Landucci, E.C.T.; Castro, R.C.; Pereira, M.F.; Cintra, A.C.O.; Giglio, J.R.; Marangoni, S.; Oliveira, B.; Cirino, G.; Antunes, E.; De Nucci, G. (1998). Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: dissociation between enzymatic and biological activities. *Eur. J. Pharmacol.*, 343:257-256
- Lawrence, P.K. & Koundal, K.R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronica Journal of Biotechnology*, 5: 93-109.
- Lehane, M.J. (1997). Peritrophic matrix structure and function. *A. Rev. Entomol.*, 42: 525-550.
- Lehle, K; Kohnert, U.; Stern, A.; Popp, F.; Jaenicke, R. (1996). Effect of disulfide bonds on the structure, function, and stability of the trypsin/tPA inhibitor from *Erythrina caffra*: site-directed mutagenesis, expression, and physiochemical characterization. *Nature Biotechnology*. 14: 476-480.
- Lomonte, B.; Tarkowski, A.; Bagge, U.; Hanson, L.A. (1994). Neutralization of the cytolytic and myotoxic activities of phospholipases A₂ from *Bothrops asper* venom by glycosaminoglycans of the heparin/heparan sulfate family. *Biochem. Pharmacol.*, 47: 1509-1518.
- Lorito, M.; Broadway, R.M.; Hayes, C.K.; Woo, S.L.; Noviello, C.; Williams, D.L.; Harman, G.E. (1994). Proteinase inhibitors from plants as a novel class of fungicides. *Mol. Plant-Microbe Inter.*, 7: 525-527.
- Macedo, M. L. R. & Xavier-Filho, J. (1993). Purification and partial characterization of trypsin inhibitors from seeds of *Clitoria ternatea*. *J. Sci. Food. Agric.*, 58: 55-58.
- Macedo, M.L.R.; Andrade; L.B.S.; Moraes, R.A.; Xavier-Filho, J. (1993) Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comp. Biochem. Pahysiol.* 105C: 89-94.
- Macedo, M.L.R.; Matos, D.G.G.; Machado, O.L.T.; Marangoni, S.; Novello, J.C. (2000). Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochem.*, 54: 553-558.

- Macedo, M.L.R.; Coelho, M.B.; Freire, M.G.M.; Machado, O.L.T.; Marangoni, S.; Novello, J.C. (2000a). Effect of a toxic protein isolated from *Zea mays* seeds on the development and survival of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. Prot. Pep. Lett., 7: 225-231.
- Macedo, M.L.R.; Freire, M.G.M.; Cabrini, E.C.; Toyama, M.H.; Novello, J.C.; Marangoni, S. (2003). A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Biochimica et Biophysica Acta 25527: 1-13.
- Machuka, J.S.; Okeola, O.G.; Chrispeels, M.J.; Jackai, L.E.N. (2000). The African yam bean seed lectin affects the development of the cowpea weevil but does not affect the development of larvae of the legume pod borer. Phytochem., 53: 667-674.
- Mazumdar-Leighton, S. & Broadway, R.M. (2001) Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. Insect Biochem. Mol. Biol., 31: 645-657.
- Medeiros, M.V. (1995). Participação do óxido nítrico na resposta inflamatória induzida pela carragenina em ratos. Tese de Mestrado. Depto. de Farmacologia, FCM, Universidade Estadual de Campinas
- Mello, G. C.; Oliva, M. L. V.; Sumikawa, J. T.; Machado, ° L. T.; Marangoni, S.; Novello, J. C.; Macedo, M. L. R. (2001). Purification and Characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. J. Protein Chem., 20: 625-632.
- Mello, M.O. & Silva-Filho, M.C. (2002). Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. Braz. J. Plant Physiol., 14: 71-81.
- Micusan, V.V. & Thibodeau, J. (1993). Superantigens of microbial origin. Semin Immunol., 5: 3-11.
- Moncada, S.; Palmer, R.M.J.; Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology pathophysiology and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43:109-142.
- Mosolov, V.V. (1995). Protein inhibitors of proteinases and α -amylases in plants (a review). Appl. Biochem. Microbiol., 31: 3-7.
- Mosolov, V.V.; Loginova, M.D.; Fedurkina, N.V.; Benken, I.I. (1976). The biological significance of proteinase inhibitors in plants. Plant Sci. Lett., 7: 77-80
- Mosolov, V.V.; Grigor'eva, L.I.; Valueva, T.A. (2001). Plant proteinase inhibitors as multifunctional proteins (review). Applied Biochemistry and Microbiology, 37 (6): 545-551.
- Oliva, M.L.V.; Sampaio, M.U.; Sampaio, C.A.M. (1989). Isolation and characterization of plant inhibitors directed against plasma kallikrein and factor XII. Adv. Exp. Med. Biol., v. 247, p. 467-71.
- Oliva, M.L.V.; Sallai, R.C.; Sampaio, C.A.M.; Fritz, H.; Auerswald, E.A.; Tanaka, A.S.; Sampaio, M.U. (1996). Bauhinia serine proteinase inhibitors: effect on factor X, factor XII and plasma kallikrein. Immunopharmacology, 32: 85-87.

- Oliva, M.L.V.; Andrade, S.; Batista, I.F.C.; Sampaio, M.U.; Juliano, M.; Fritz, H.; Auerswald, E.A.; Sampaio, C.A.M. (1999). Human plasma kallikrein and tissue kallikrein binding to a substrate based on the reactive site of a factor Xa inhibitor isolated from *Bauhinia unguolata* seeds. *Immunopharmacology*, 45: 145-149.
- Oliva, M.L.V., Souza-Pinto, J.C., Batista, I.F.C., Araujo, M.S., Silveira, V.F., Auerswald, E.A., Mentele, R., Eckerskorn, C., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A.M. (2000). *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochim. Biophys. Acta*. 1477, 64-74.
- Pacheco, I.A. & De Paula, D.C. (1995). Insetos de grãos armazenados – identificação e biologia. São Paulo: Fundação Cargill, 229p.
- Paes, N.S.; Gerhardt, I.R.; Coutinho, M.V.; Yokoyama, M.; Santana, E.; Harris, N.; Chrispeels, M.J.; Grossi-De-Sá, M.F. (2000). The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. *J. Insect Physiol.*, 46: 393-402.
- Pando, S.C.; Oliva, M.L.V.; Sampaio, C.A.M.; Di Ciero, L.; Novello, J.C.; Marangoni, S. (2001). Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. *Phytochemistry* 57: 625-631.
- Panizzi, A.R., Parra, J.R.P. (1991). Ecologia nutricional de insetos e suas aplicações no manejo de pragas. São Paulo: Editora Manole LTDA, Cap. II, p. 9-65: Consumo e utilização de alimentos por insetos.
- Patankar, A.G.; Giri, A.P.; Harsulkar, A.M.; Sainani, M.N.; Deshpande, V.V.; Ranjekar, P.K.; Gupta, V.S. (2001). Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 453-464.
- Paulillo, L.C.M.S.; Lopes, A.R.; Cristofolletti, P.T.; Parra, J.R.P.; Terra, W.R.; Silva-Filho, M.C. (2000). Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. *J. Econ. Entomol.*, 93: 892-896.
- Peters, W. (1992). Peritrophic membranes. In *Zoo Physiology*. Vol. 30, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Peumans, W.J. & Van Damme, E.J.M. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.*, 109: 347-352.
- Plunkett, G.; Senear, D.F.; Zuroske, G.; Ryan, C.A. (1982). Proteinase inhibitors I and II from leaves of wounded tomato plants: purification and properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, 213: 463-472.
- Popelka, J.C.; Terryn, N.; Higgins, T.J.V. (2004). Gene technology for grain legumes: can it contribute to the food challenge in developing countries? *Plant Science*, 167: 195-206
- Prakash, B.; Selvaraj, S.; Murthy, M.R.N.; Sreerama, Y.N.; Rao, D.R.; Gowda, L.R. (1996). Analysis of amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors. *J. Mol. Evol.*, 42: 560-569.

- Rakwal R.; Agrawal, G.K.; Jwa, N.S. (2001). Characterization of a rice (*Oriza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. *Gene*, 263: 189-198.
- Ramasarma, P.R.; Rao, A.G.A.; Rao, D.R. (1995). Role of disulfide linkages in structure and activity of proteinase inhibitor from horsegram (*Dolichos biflorus*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1248: 35-42.
- Richardson, M. (1991). Seed storage proteins: The enzyme inhibitors. **In:** *Methods in Plant Biochemistry*. (Dey, P.M. & Harborne, J.B. eds). Vol. 5 Academic Press, New York.
- Rocha, E. & Silva, M. (1978) A brief history of inflammation. **In:** *Handbook of experimental pharmacology*. Vane, J.R. and Ferreira, S.H. (Eds). Springer-Verlag, 6-25.
- Roy, I. & Gupta, M.N. (2000). Purification of a “double-headed” inhibitor of alpha-amylase/proteinase K from wheat germ by expanded bed chromatography. *Bioseparation*, 9: 239-245
- Ryan, C.A. (1981). Plant proteinases. **In:** *The Biochemistry of Plants*. (Marcus, E. ed.). Academic Press, New York.
- Ryan, C.A. (1990). Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 28: 425-449.
- Ryan, C. A. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochem. Biophys. Acta – Protein Structure et Molecular Enzymologica*, 1477: 112-121.
- Sales, M.P.; Macedo, M.L.R.; Xavier-Filho, J. (1992). Digestibility of cowpea (*Vigna unguiculata*) vicilins by pepsin, papain and bruchid (insect) midgut proteinases. *Comp. Biochem. Physiol.*, 103
- Sallai, R.C. (1993). Caracterização de inibidores seletivos de serinoproteínases no gênero *Bauhinia* (Leguminosae-Caesalpinioideae). Tese de Mestrado. Escola Paulista de Medicina. São Paulo.
- Sampaio, C.A.M.; Oliva, M.L.V.; Sampaio, M.U.; Batista, I.F.C.; Bueno, N.R.; Tanaka, A.S.; Auerswald, A.; Fritz, H. (1996). Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes. *Immunopharmacology*, 32: 62-66.
- Sasmal, D.; Guhathakurta, B.; Ghosh, A.N.; Pal, C.R.; Datta, A. (1992). N-acetyl-D-glucosamine-specific lectin purified from *Vibrio cholerae*. *FEMS Microb. Lett.* v. 98, p. 217.
- Schmaier, A.H. (1997). Contact activation: a revision. *Thromb. Haemost.*, 78: 101-107.
- Schroeder, H.E.; Gollasch, S.; Moore, A.; Tabe, L.M.; Craig, S.; Hardie, D.C.; Chrispeels, M.J.; Spencer, D.; Higgins, T.J.V. (1995) Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiol.*, 107: 1233-1239.
- Sedgwick, A.D. & Willoughby, D.A. (1985). Initiation of the inflammatory response and its prevention. **In:** *Handbook of inflammation*. Bonta, I.L.; Bray, M.A. and Parnham, M.J. (Eds). Elsevier, 27-47.

- Shewry, P.R. & Lucas, J.A. (1997). Plant proteins that confer resistance to pest and pathogens. In: *Advances in Botanical Research*, 26: 135-192.
- Schuler, T.H.; Poppy, G.M.; Kerry, B.R.; Denholm, I. (1998). Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotechnol.*, 16:168-175.
- Silva, C.P.; Terra, W.R.; Xavier-Filho, J.; Grossi-de-Sá, M.F.; Lopes, A.R.; Pontes, E.G. (1999). Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 29: 355-366.
- Singh, S.R. & Rachie K.O. (1985). Cowpea, Research, production and Utilization. John Wiley & Sons, Chichester.
- Singh, B.B.; Singh, S.R.; Adjadi, O. (1985). Bruchid resistance in cowpea. *Crop Sci.*, 25: 736-739.
- Souza, E.M.T.; Mizuta, K.; Sampaio, M.U.; Sampaio, C.A.M. (1995). Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. *Phytochemistry*, 39: 521-525.
- Souza, E. M. T.; Teles R. C. L.; Siqueira, E. M. A.; Freitas, S. M. (2000). Effects of denaturing and stabilizing agents on the inhibitory activity and conformational stability of *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitory. *Journal of Protein Chemistry* 19: 507-513.
- Tanaka, A.S.; Sampaio, M.U; Sampaio, C.A.M.; Oliva, M.L.V. (1989). Purification and characterization of *Torresea cearensis* trypsin inhibitor. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 22: 1069-71.
- Terada, S.; Fujimura, S.; Katayama, H.; Nagasawa, M.; Kimoto, E. (1994). Purification and characterization of two Kunitz family subtilisin inhibitors from seeds of *Canavalia lineata*. *J. Biochem.*, 115: 392-396.
- Terra, W.R. & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 109B: 1-62.
- Terra, W.R. (2001). The origin and functions of the insect peritrophic membrane and peritrophic gel. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 47: 47-61.
- Valueva, T.A. & Mosolov, V.V. (1999a). Protein inhibitors of proteinases in seeds: 1. Classification, distribution, structure and properties. *Russ. J. Plant Physiol.* 46:307-321.
- Valueva, T.A. & Mosolov, V.V. (1999b). Protein inhibitors of proteinases in seeds: 2. Physiological Functions. *Russ. J. Plant Physiol.*, 46: 322-329.
- Valueva, T.A.; Revina, T.A.; Mosolov, V.V. (1997). Potato tuber protein proteinase inhibitors belonging to the Kunitz soybean inhibitor family. *Biochemistry*, 62: 1367-1374. Translated from Biokhimiya.
- Volpicella, M.; Ceci, L.R.; Cordewener, J.; America, T.; Gallerani, R.; Wolfram, B.; Jonsgma, M.A.; Beekwilder, J. (2003). Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. *Eur. J. Biochem.*, 270: 10-19

- Walton, J.D. (1997). Biochemical plant pathology. **In:** Plant Biochemistry (Dey, P.M. & Harborne, J.B. eds.). Cap. 13, p 487-502. Academic Press.
- Wang, G.; Cao, Z.; Zhou, H.; Zhao, Y. (2000). Comparison of inactivation and unfolding of methanol dehydrogenase during denaturation in guanidine hydrochloride and urea. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 32: 873-878.
- Weder, J. K. P. (1981). Protease Inhibitors in the Leguminosae. **In:** Advances in Legume Systematics (Pholhill, R.M. & Raven, P.H. eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9 3AE, England.
- Williams, T.J. (1985). Vascular responses and their suppression in vasodilatation and edema. **In:** Handbook of inflammation. Bonta, I.L.; Bray and M.A.; Parnhan, M.J. (Eds). Elsevier, 49-59.
- Xavier-Filho, J.; Campos, F.A.P.; Ary, M.B.; Silva, C.P.; Carvalho, M.M.M.; Macedo, M.L.R.; Lemos, F.J.; Grant, G. (1989). Poor correlation between the levels of proteinases inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance/susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*. *J. Agric. Food Chem.* 37, 1139-1143.
- Xavier-Filho, J. (1992). The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 4: 1-6.
- Yang, S.Q.; Wang, C.; Gillmor, S.A.; Fletterick, R.J.; Craik, C. (1998). Ecotin: A serine protease inhibitor with two distinct and interacting binding sites. *J. Mol. Biol.*, 279: 945-957.
- Yeh, K.M.; Lin, M.-I.; Tuan, S.-J.; Chen, Y.-M.; Lin, C.-Y.; Kao, S.-S. (1997). Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. *Plant Cell Reports*, 16: 696-699.
- Zavodszky, M.; Chen, C.; Huang, J.; Zolkiewski, M.; Wen, L.; Krishnamoorthi, R. (2001). Disulfide bond effects on protein stability: Designed variants of *Cucurbita maxima* trypsin inhibitor-V. *Protein Science*. 10: 149-160.

APÊNDICE 1

Purification and Characterization of a New Trypsin Inhibitor from *Dimorphandra mollis* Seeds

Gláucia C. Mello,¹ Maria Luiza V. Oliva,² Joana T. Sumikawa,² Olga L. T. Machado,³ Sérgio Marangoni,¹ José C. Novello,¹ and Maria Lígia R. Macedo^{1,4,5}

Received September 11, 2001

A second trypsin inhibitor (DMTI-II) was purified from the seed of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae-Mimosoideae) by ammonium sulfate precipitation (30–60%), gel filtration, and ion-exchange and affinity chromatography. A molecular weight of 23 kDa was estimated by gel filtration on a Superdex 75 column SDS-PAGE under reduced conditions showed that DMTI-II consisted of a single polypeptide chain, although isoelectric focusing revealed the presence of three isoforms. The dissociation constant of 1.7×10^{-5} M with bovine trypsin indicated a high affinity between the inhibitor and this enzyme. The inhibitory activity was stable over a wide pH range and in the presence of DTT. The N-terminal sequence of DMTI-II showed a high degree of homology with other Kunitz-type inhibitors.

KEY WORDS: *Dimorphandra mollis*; Mimosoideae; trypsin inhibitor; N-terminal sequence; Kunitz family.

1. INTRODUCTION

Proteinase inhibitors are widely distributed in animals, microorganisms, and plants (Richardson, 1991; Birk, 1994). Among these, serine proteinase inhibitors are the most studied and have been isolated from various Leguminosae seeds (Richardson, 1991; Xavier-Filho, 1992; Souza *et al.*, 1995; Batista *et al.*, 1996; Macedo *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2001). In plants, proteinase inhibitors may represent a form of storage protein (Mosolov, 1995; Valueva and Mosolov, 1999) or may be involved in plant defense mechanisms against pest and diseases (Heath

et al., 1997; Jongsma and Boulter, 1997; Shewry and Lucas, 1997; Schuler *et al.*, 1998; Valueva and Mosolov, 1999). In addition to their natural biological functions, proteinase inhibitors may also have a role in the treatment of human pathologies such as inflammation, hemorrhage (Oliva *et al.*, 2000), and cancer (DeClerck and Imren, 1994; Kennedy, 1998).

Legume seeds contain various proteinase inhibitors classified into several families, including Kunitz-type, Bowman-Birk-type, potato I and potato II, squash, cereal superfamily, and thaumatin-like inhibitors (Richardson, 1991). Kunitz-type inhibitors are proteins (M_r 18,000–24,000) with one or two polypeptide chains and a low cysteine content, usually with four Cys residues arranged in

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil.

²Departamento de Bioquímica, Escola Paulista de Medicina (UNIFESP), São Paulo, SP, Brazil.

³Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campo dos Goytacazes, RJ, Brazil.

⁴Departamento de Ciências Naturais, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUL/UFMS), CP. 549, 79603-011, Três Lagoas, MS, Brazil.

⁵To whom correspondence should be addressed at Departamento de Ciências Naturais—Três Lagoas/CEUL, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), CP. 549, 79603-011, Três Lagoas, MS, Brazil; e-mail: bioplant@terra.com.br

⁶Abbreviations: APNE, acetyl-L-phenylalanyl-L-arginine-p-nitroanilide; APTT, activated partial thromboplastin time; BAPNA, N-benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide; BSA, bovine serum albumin; BTPNA, N-benzoyl-L-tyrosyl-p-nitroanilide; DMTI, trypsin inhibitor from *D. mollis*; DMTI-II, trypsin inhibitor-II from *D. mollis*; DTT, dithiothreitol; HuPK, human plasma kallikrein; PPE porcine pancreatic elastase; PoPK, porcine pancreatic kallikrein; K_d , dissociation constant; KTI, Kunitz trypsin inhibitor precursor—soybean; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; STI, trypsin inhibitor from *G. max*.

two disulfide bridges. These inhibitors are found in all Leguminosae subfamilies (Mimosoideae, Caesalpinoideae, Papilionoideae) (Norioka *et al.*, 1988; Ryan, 1990; Richardson, 1991; Sampaio *et al.*, 1996; Di Ciero *et al.*, 1998; Macedo *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2000) and also in the Solanaceae (Walsh and Twitchell, 1991; Valueva *et al.*, 1997).

Dimorphandra mollis (subfamily Mimosoideae) is a common tree in the cerrado (savannah-like) ecosystem of central Brazil. Macedo *et al.*, (2000) isolated and characterized a trypsin inhibitor (DMTI) from this species and also detected the presence of a second protein with antitryptic activity. In this report, we describe the purification and characterization of this second trypsin inhibitor from *D. mollis* seeds.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Materials

D. mollis seeds were obtained locally and were also provided by Chamflora (Três Lagoas, MS, Brazil). Acetyl-L-phenylalanyl-L-arginine-*p*-nitroanilide (APNE), α -amylase, bovine pancreatic papain, bovine pancreatic trypsin, bovine serum albumin (BSA), α -chymotrypsin, *N*-benzoyl-DL-arginyl-*p*-nitroanilide (BAPNA) and *N*-benzoyl-L-tyrosyl-*p*-nitroanilide (BTPNA) were from Sigma, as were the SDS-PAGE molecular weight markers, acrylamide, bis-acrylamide, and other electrophoresis reagents. Ampholines and chromatography supports were from Pharmacia. All other chemicals and reagents used were of analytical grade.

2.2. Purification of DMTI-II

D. mollis seeds free of tegument and defatted with hexane were ground in a coffee mill. A crude inhibitor preparation was obtained by extraction of this meal with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.6 (1:10, w/v), for 2 hr at 25°C with subsequent centrifugation at $7500 \times g$ for 30 min. The supernatant was fractionated by ammonium sulfate precipitation into three fractions, corresponding to 30%, 60%, and 80% saturation. The three fractions were dialyzed against distilled water for 24 hr at 4°C and lyophilized. The fraction corresponding to 30–60% ammonium sulfate saturation (precipitate II or PII) was selected for further purification.

Lyophilized PII was dissolved in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.6, containing 0.1 M NaCl, and applied to a Sephadex G-75 column (2.7 cm $\times$ 100 cm) equilibrated

with the same buffer. The fraction with inhibitory activity was further fractionated by ion-exchange chromatography on a DEAE-Sepharose column (2.0 cm $\times$ 20 cm) equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, and eluted with the same buffer containing NaCl in a gradient of 0–1.0 M. The fraction eluting before the saline gradient contained inhibitory activity and was applied to a trypsin-Sepharose column (2.0 cm $\times$ 10 cm) equilibrated with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.6, and 0.1 M NaCl (Macedo and Xavier-Filho, 1992). The elution profiles were monitored at 280 nm.

2.3. Protein Quantification

Protein concentrations were determined by the dye-binding method of Bradford (1976), with bovine serum albumin as the standard.

2.4. Assay of Inhibitory Activity

The inhibition of trypsin was determined by measuring the residual enzymatic activity towards the substrate BAPNA at pH 8.0 after pre-incubation with inhibitor (Erlanger *et al.*, 1961). The ability to inhibit other proteinases such as chymotrypsin and papain was assayed as described by Xavier-Filho *et al.* (1989). The inhibition of porcine pancreatic α -amylase was measured according to the method of Bernfeld (1955).

The proteolytic activity of other serine proteinases was measured using synthetic peptide derivatives of *p*-nitroanilide (1 mM each) in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, 37°C, in a final volume of 1.0 ml. The reaction was interrupted by adding 500 μ l of 30% acetic acid (v/v). The substrate hydrolysis was followed by measuring the absorbance of released *p*-nitroaniline at 405 nm (Oliva *et al.*, 1996). Human plasma kallikrein kinin-releasing activity was measured in incubations with human high-molecular-weight kininogen or human plasma (Oliva *et al.*, 1982).

2.5. K_i Determination

The dissociation constant (K_i) and the inhibitor concentration were determined for each protease by pre-incubating the enzyme with increasing concentrations of purified inhibitor in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 37°C, followed by measurement of the residual activity using appropriate substrates. Apparent values of K_i were determined by adjusting the experimental points to the equation for slow-tight binding (Knight, 1986), using a nonlinear regression with the help of the Enzfitter program.

2.6. Coagulation Tests (Activated Partial Thromboplastin Time, APTT)

Coagulation times were recorded with a Organon Teknika Coagulator Compact automate apparatus. Pool plasma was collected from anonymous and healthy donors, centrifuged at 3000 g for 10 min at 48°C, and frozen at -10°C before use. Coagulation time tests were conducted according to the conventional procedure after mixing 100 µl plasma at 37°C with an equivalent volume of cephalin-kaolin mixture and 100 µl Tris-HCl 0.1 M pH 8.0 buffer (Lorenço *et al.*, 1989). Time measurements began upon addition of 100 µl CaCl₂ 0.025 M following 180 s of incubation. To assess the influence of the inhibitor in the APTT test, DMTI-II in the range of 3–40 µg (*A*₂₈₀) was added to human plasma prior to cephalin and kaolin addition. The clotting time (in seconds) was determined in the presence and in the absence of inhibitor.

2.7. Formation of DMTI-II-Trypsin Complex

The DMTI-II-trypsin complex was gel filtered (0.3 ml/min) on a Superdex 75 column equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, containing 0.1 M NaCl. Trypsin and inhibitor (1:1 molar ratio), trypsin/inhibitor complex, and trypsin in a molar excess of the enzyme were pre-incubated for 10 min at 30°C in 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 8.0, with 0.02% CaCl₂. As a control, isolated proteins were gel filtered as described above. The elution profiles were monitored based on the absorbance at 280 nm, and the inhibitory activity was followed using BAPNA as substrate. The column was calibrated with albumin (67 kDa), ovalbumin (45 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsinogen (24 kDa), and cytochrome c (12 kDa).

2.8. SDS-PAGE and Isoelectric Focusing

SDS polyacrylamide gel (12.5%) electrophoresis (SDS-PAGE) in the absence and presence of dithiothreitol (0.1 M) was done as described by Laemmli (1970). The proteins used as molecular weight standards were phosphorylase (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), soybean trypsin inhibitor (20 kDa), and α-lactalbumin (14 kDa). The proteins were detected by staining with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250.

Isoelectric focusing was done on a flatbed apparatus (LKB). Ampholine solutions (40%, v/v) in the pH range 3.5–9.5 were used with subsequent Coomassie brilliant blue G-250 staining according to Westermeier (1993).

The inhibitors were detected using the negative staining technique of Uriel and Berges (1968).

2.9. Stability of Inhibitory Activity against Bovine Trypsin

Effect of Temperature

The inhibitor solution (1 mg/ml of 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0), was heated for 20 min in a water bath at various temperatures (37°–100°C) and then cooled to 0°C before testing for residual inhibitory activity.

Effect of pH

To measure the pH stability, a solution of inhibitor (500 µg/ml) was diluted with an equal volume of various buffers (0.1 M): sodium citrate (pH 2–4), sodium acetate (pH 4.5–5.5), sodium phosphate (pH 6–7), Tris-HCl (pH 7.5–8.5), and sodium bicarbonate (pH 9–10). After incubation in each buffer for 30 min at 37°C, the pH was adjusted to pH 8.0 and the inhibitory activity on trypsin was assayed as described below.

Effect of DTT

The inhibitor (500 µg/ml) was incubated with the reducing agent dithiothreitol (DTT) at final concentrations of 1, 10, and 100 mM for 15–120 min at 37°C. The reaction was terminated by adding iodo-acetamide at twice the amount of each DTT concentration and the residual inhibitory activity on trypsin was then determined.

After the treatments above, the residual inhibitory activity on trypsin was measured using BAPNA as substrate. Aliquots (50 µl) of trypsin inhibitor solution were mixed with bovine trypsin stock solution (50 µl, 0.33 mg/ml in 2.5 mM HCl) in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8. The mixture was incubated at 37°C for 10 min followed by the addition of 1 ml of BAPNA (0.1 M) to give a final volume of 1.5 ml. After a 20-min incubation, the reaction was stopped by adding 200 µl of 30% (v/v) acetic acid. Substrate hydrolysis was followed by the increase in absorbance at 405 nm. All experiments were done in triplicate and data are the mean of three assays.

2.10. Protein Sequencing

The N-terminal sequence was determined on a Shimadzu PPSQ-10 automated protein sequencer using Edman degradation. Phenylthiohydantoin amino acids (PTH-AA) were detected at 269 nm after separation on a reverse-phase C₁₈ Wakopak Wakosil HPLC column (4.6 mm × 25 cm) from Shimadzu, under isocratic conditions, using 40% acetonitrile, 20 mM acetic acid and 0.014% sodium dodecyl sulfate as the mobile phase at a flow rate of 1.0 ml/min at 40°C. The sequence was aligned automatically, using the NCBI-Blast search system.

3. RESULTS

3.1. Purification and Properties of DMTI-II

D. mollis trypsin inhibitor (DMTI-II) was purified by extraction in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6), ammonium sulfate precipitation (30–60% saturation), gel filtration on Sephadex G-75, ion-exchange chromatography on DEAE-Sepharose, and affinity chromatography on trypsin-Sepharose. Only one peak from gel filtration (Fig. 1a) showed antitryptic activity, whereas DEAE-Sepharose chromatography provided two active peaks (Fig. 1b). The peak eluting before the saline gradient was rechromatographed on an affinity column (Fig. 1c) of enzymatically inactive trypsin-Sepharose (Xavier-Filho and Campos, 1983) and yielded only one peak (DMTI-II) with antitryptic activity. Affinity chromatography proved to be a very convenient step for isolating this inhibitor, although the possibility of limited digestion of the inhibitor

by the immobilized trypsin during purification cannot be excluded. However, the yield of inhibitory activity after trypsin-Sepharose and the presence of only one protein band following SDS-PAGE suggested that DMTI-II did not undergo hydrolysis. The inhibitor was purified 12.2-fold with a yield of 0.46% (Table I), which was lower than for DMTI (Macedo *et al.*, 2000).

SDS-PAGE in the absence (Fig. 1d, insert) and presence (data not shown) of DTT (0.1 M) showed that DMTI-II consisted of a single polypeptide chain with a molecular mass of approximately 22 kDa, which was also confirmed by gel filtration chromatography on Superdex 75. Staining for protein and inhibitory activity after isoelectric focusing of DMTI-II showed the presence of three bands with pI values of 6.4, 6.5, and 6.7 (data not shown), indicating the existence of isoforms of the inhibitor.

The K_i of 1.7×10^{-9} M obtained for the inhibitor with bovine trypsin (Fig. 2) was calculated using the

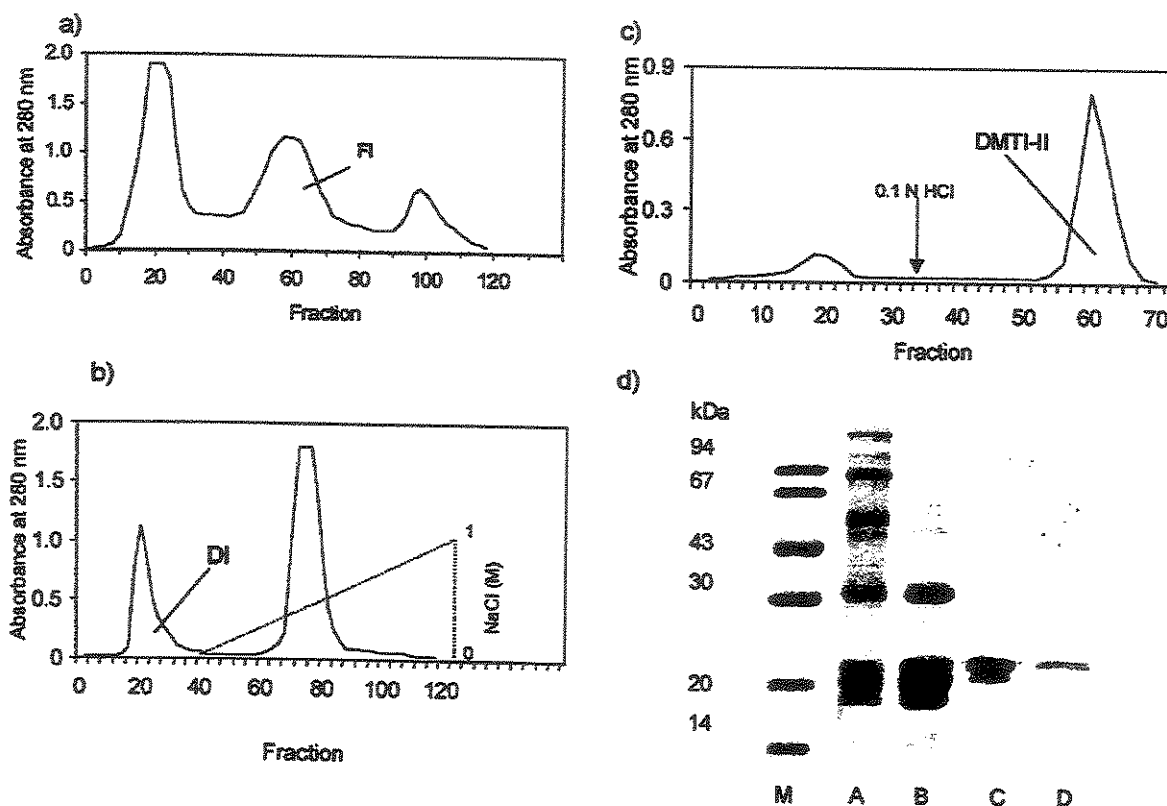


Fig. 1. (a) Gel filtration (Sephadex G-75) of PII obtained by ammonium sulfate precipitation. FI contained the trypsin-inhibiting activity and was subjected to ion-exchange chromatography (b) on a DEAE-Sepharose column (2.0 cm $\times$ 20 cm) equilibrated with 0.05 M Tris-HCl buffer, pH 8.0. The fraction eluting before the saline gradient (DI) was applied to a trypsin-Sepharose affinity column (2.0 cm $\times$ 10 cm) (c) equilibrated with 0.1 M phosphate buffer, pH 7.6, containing 0.1 M NaCl. (d) SDS-PAGE showing all fractions obtained during purification: (A) PII fraction, (B) fraction FI, (C) fraction DI, and (D) the purified trypsin inhibitor DMTI-II. Molecular mass markers (M) are shown on the left.

Table I. Yields and Activities of DMTI-II during Purification from *D. mollis* Seeds

Steps	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (IU/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude Extract	1361.75	64,800	47.6	1	100
Fraction 30–60%	64.84	4,640	71.6	1.5	7.2
Sephadex G-75	5.9	1050.6	178.1	3.74	1.6
DEAE-Sephadex	2.41	509.93	211.6	4.45	0.78
Trypsin-Sephadex	0.514	297.13	578.1	12.15	0.46

equation for slow-tight binding inhibition (Knight, 1986) and nonlinear regression with the help of the Enzfitter program. Stoichiometric studies showed that DMTI-II incubated with trypsin in a 1:1 molar ratio produced a complex with an M_r of approximately 46,000, based on gel filtration on Superdex G-75 (Fig. 3). This first peak showed neither inhibitory nor enzymatic activity and the value of M_r , 46,000, corresponded to the combined masses of the two proteins. The second peak of M_r , 24,000, coincided with the elution volume of trypsin in the free form and showed only trypsin activity.

The database search using the N-terminal sequence of DMTI-II revealed a homology with Kunitz-type trypsin inhibitors (Table II).

3.2. Stability of Inhibitory Activity

The inhibitor retained more than 80% of its activity at up to 50°C for 20 min, but there was a 40% and 80% loss of activity at 60°C and 80°C, respectively (Fig. 4a).

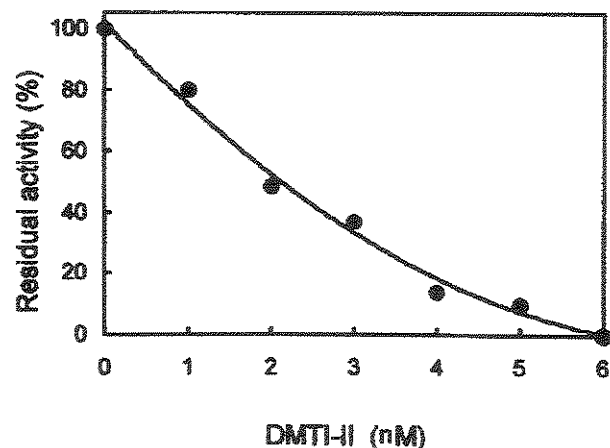


Fig. 2. Titration curve of trypsin inhibition by DMTI-II. Increasing concentrations of inhibitor were added to a fixed concentration of enzyme (4.2 nM). Residual enzyme activity was determined using BAPNA as substrate. Each point is the mean of three assays.

Pre-incubation of the inhibitor in the pH range 2.0–10.0 for 20 min did not affect trypsin inhibition (Fig. 4b). Figure 5 shows that the inhibitory activity was unaffected by DTT (1–100 mM) after up to 2 hr.

3.3. Specificity

The specificity of the inhibitory activity of DMTI-II was assessed using the different proteinases chymotrypsin, human plasma kallikrein (HuPK), porcine pancreatic elastase (PPE), porcine pancreatic kallikrein (PoPK), plasmin, papain, and amylase. The inhibition curves for these enzymes followed the same model as for trypsin. The dissociation constants of the enzyme-inhibitor complexes calculated for each enzyme are shown in Table III. Chymotrypsin, α -amylase, papain, PPE, and PoPK were not inhibited by DMTI-II, whereas human plasma kallikrein (K_i 0.31 μ M), plasmin (K_i 0.13 nM), and trypsin (K_i 1.7 nM) were. DMTI-II did not affect activated partial thromboplastin time (APTT).

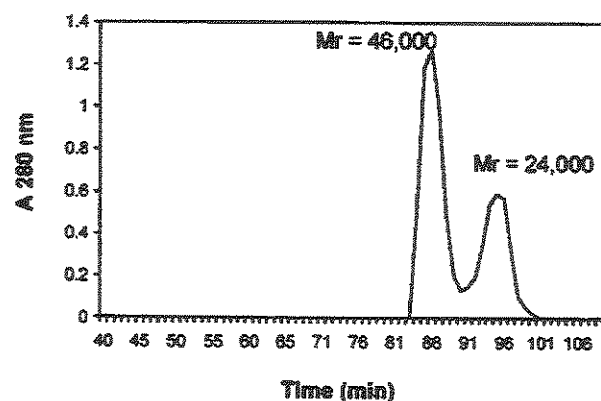


Fig. 3. Gel filtration of the trypsin-DMTI-II complex on Superdex 75. DMTI-II (4 mg) and trypsin (6 mg) were incubated in 1 ml of 0.05 M Tris-HCl buffer, 0.1 M NaCl, pH 8.0, for 10 min at 37°C and the mixture was then applied to a calibrated Superdex 75 column (50 cm $\times$ 1.5 cm). The column was equilibrated and eluted with the same buffer (flow rate, 0.3 ml/min).

Table II. Partial Sequence of (DMTI-II Aligned with Different Regions of Known Kunitz Trypsin Inhibitors. (DMTI: trypsin inhibitor (Kunitz) from *D. mollis* (Macedo *et al.*, 2000); STI, trypsin inhibitor from *Glycine max*—pdb | 1BA7| 1BA7-A: KTI, Kunitz trypsin inhibitor precursor-soybean—sptmb11 | Q39869 | Q39869: PKIX, Kunitz trypsin inhibitor precursor—swiss | Q00652 | PKIX_SOL.)

Inhibitor	Initial position	Sequence/homology
DMTI-II	1	L V Y D S D G F P L R N G G
DMTI	2	Q V F D T E G N G I R N G G
STI	3	V L D N E G N P L E N G G
KTI	27	I V F D T E G N P I R N G G
PKIX	48	V Y D Q D G H P L R I G

4. DISCUSSION

Macedo *et al.* (2000) purified and characterized the first Kunitz-type trypsin inhibitor (DMTI) from *Dimorphandra mollis* seeds. The present study describes the purification, biochemical properties, and inhibitory activity of a second serine proteinase inhibitor (DMTI-II) from these same seeds.

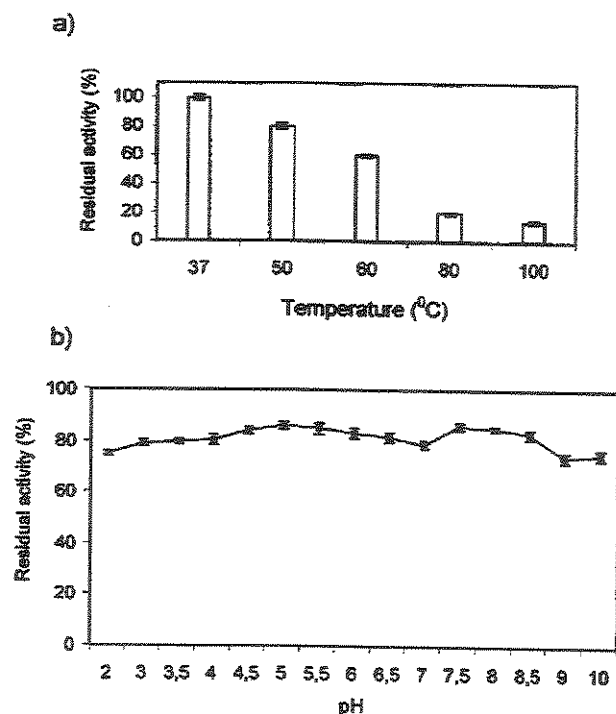


Fig. 4. Stability of DMTI-II. (a) Temperature stability of the inhibitory activity of DMTI-II after incubation for 20 min at the indicated temperature. (b) pH stability of DMTI-II. The activity was assayed using BAPNA in 0.05 M Tris-HCl, pH 8.0, after incubation at the indicated pH for 30 min at 37°C. The columns and points are the mean of three assays.

The purification procedure used to obtain the protein was satisfactory since the purified protein exhibited a single band in SDS-PAGE under reducing conditions, indicating no dimerization of the native inhibitor. DMTI-II had a Mr of 22,000, similar to proteinase inhibitors of the Kunitz family, which generally have molecular masses of 18–24 kDa and one or two polypeptide chains (Richardson, 1991; Birk, 1994; Sampaio *et al.*, 1996). Our results agree with those described for DMTI isolated from these same seeds (Macedo *et al.*, 2000) and for Kunitz-type inhibitors isolated from potato tuber (Valueva *et al.*, 1997).

Many enzyme inhibitors in seeds are present in multiple molecular forms, which may differ considerably in their pI values (Richardson, 1991), with most inhibitors in the Kunitz family being acidic (Kalume *et al.*, 1995). The pI values of 6.4, 6.5, and 6.7 found for DMTI-II

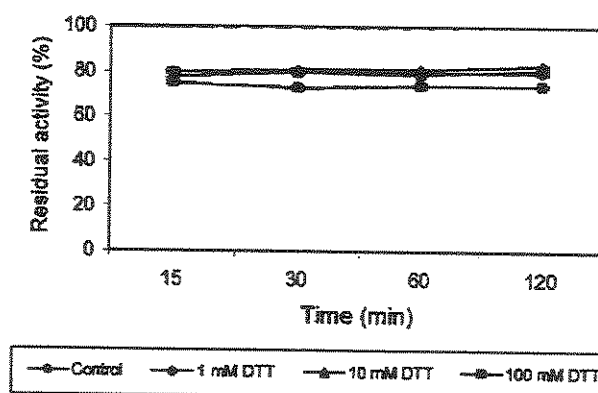


Fig. 5. Effect of DTT on the stability of DMTI-II. The inhibitor was treated with different final concentration (1, 10, and 100 mM) of DTT for 15–120 min. at 37°C. The reaction was interrupted with iodoacetamide (two-fold molar excess relative to DTT), and the residual trypsin inhibitory activity was measured using BAPNA as substrate. Each point is the mean of three assays.

Table III. Dissociation Constants for Proteinase-DMTI-II Complexes. (Inhibitory activities were determined using synthetic substrates: BAPNA (Bovine trypsin); BTPNA (chymotrypsin), Ac-Phe-Arg-pNan (human plasma kallikrein), H-Pro-Phe-Arg-AMC (porcine pancreatic kallikrein), H-D-Val-Leu-Lys-pNan (plasmin) n.i., no inhibition)

Enzyme	K_i
Bovine trypsin	1.7 nM
Chymotrypsin	n.i.
HuPK	0.31 μ M
PPE	n.i.
PoPK	n.i.
Plasmin	0.13 nM
Papain	n.i.
Amylase	n.i.

(data not shown) indicate the presence of isoforms and show that this inhibitor is less acid than DMTI, which has pI values of 5.6, 5.8, and 5.9 (Macedo *et al.*, 2000).

A 1:1 relationship existed between DMTI-II and trypsin in a binary complex with a Mr of 46,000, determined by gel filtration on Superdex 75. This result was confirmed when incubation of the isolated complex (trypsin-DMTI-II) with excess trypsin yielded no complex with a Mr of 70,000. This experiment showed that a ternary complex was not formed and confirmed the presence of a single reactive site for trypsin; no hydrolysis products were detected. The stoichiometric ratio of 1:1 and the molecular mass agree with those for other Kunitz inhibitors (Richardson, 1991; Birk, 1994; Souza *et al.*, 1995; Sampaio *et al.*, 1996; Batista *et al.*, 1996; Oliva *et al.*, 1999; Macedo *et al.*, 2000).

The inhibitory activity of Kunitz-type proteinase inhibitors varies. A few inhibitors of this family are specific for chymotrypsin and do not inhibit trypsin (Joulbert *et al.*, 1981). Some Kunitz-type inhibitors are potent inhibitors of trypsin but also inhibit chymotrypsin to varying degrees (Odani *et al.*, 1979). DMTI-II inhibited trypsin (K_i 1.7 nM) but not chymotrypsin. This K_i value indicates a high affinity between the enzyme and inhibitor, as is also shown for other plant trypsin inhibitors (Macedo *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2001). DMTI-II showed no activity against α -amylase and papain.

Proteinase inhibitors are useful tools in biochemical and physiological studies of proteinase functions (Oliva *et al.*, 1999), as well as for the purification of proteolytic enzymes by affinity chromatography and for understanding the role of proteolytic enzymes in blood clotting (Hayashi *et al.*, 1994; Oliva *et al.*, 2000). For this reason, the specificity of the inhibitory activity was investigated. The K_i values were determined for complexes with plasmin and human plasma kallikrein (HuPK) (0.13 nM and

0.31 μ M, respectively). The affinity between plasmin and DMTI-II was higher than for HuPK, and plasma kallikrein inhibition was not effective compared to inhibitors described for this enzyme (Oliva *et al.*, 2000; Oliva *et al.*, 2001). The lack of HuPK inhibition was confirmed by the absence of interference in the APTT. DMTI-II showed no activity against porcine pancreatic elastase and porcine pancreatic kallikrein. Thus, DMTI-II can block some enzymes involved in blood clotting, as also shown for plant Kunitz inhibitors (Oliva *et al.*, 2000).

The intramolecular disulfide bridges are presumably responsible for the functional stability of Kunitz-type inhibitors in the presence of various physical and chemical denaturants (Broze *et al.*, 1990) such as temperature, pH, and reducing agents. DMTI-II lost 20% of its activity when incubated at 50°C for 20 min. When heated to 60°, 80°, and 100°C, a greater decrease in activity was observed. However, the inhibitory activity was not sensitive to pH over the range 2.0–10.0; a similar result was reported for ECTI (Batista *et al.*, 1996). DTT had no effect on the activity or stability of DMTI-II, in contrast to the findings of Ramasarma *et al.* (1995) who studied a Bowman-Birk inhibitor from *Dolichos biflorus*. Lehle *et al.* (1996) observed that ETI, a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Erythrina caffra*, retained its inhibitory activity after reduction with DTT. The stability of DMTI-II is apparently unrelated to the presence of disulfide bridges. Recent reports have described inhibitors isolated from *Bauhinia* sp. seeds, which are devoid of disulfide bridges and cysteine residues (Oliva *et al.*, 2001).

The partial N-terminal sequence of DMTI-II confirmed the high degree of homology with other Kunitz family inhibitors, as well as with the inhibitor isolated by Macedo *et al.* (2000) from this same species.

ACKNOWLEDGMENT

Part of this work was supported by CNPq and CAPES (Brazil).

REFERENCES

- Batista, I. F. C., Oliva, M. L. V., Araujo, M. S., Sampaio, M. U., Richardson, M., Fritz, H., and Sampaio, C. A. M. (1996). *Phytochemistry* 41, 1017–1022.
- Bernfeld, P. (1955). In *Methods in Enzymology*, (Colowick, S. P. and Kaplan, N. O., eds.) Vol. I. Academic Press, New York. 149 pp.
- Birk, Y. (1994). *Arch. Latinoam. Nutricion* 44, 26S–30S.
- Bradford, M. M. (1970). *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Broze, G. J., Girard, T. J., and Novotny, W. F. (1990). *Biochemistry* 29, 7539–7546.
- DeClerck, Y. A. and Imren, S. (1994). *Eur. J. Cancer* 30A, 2170–2180.

- Di Ciero, L., Oliva, M. L. V., Torquato, R., Köhler, P., Weder, J. K. P., Novello, J. C., Sampaio, C. A. M., Oliveira, B., and Marangoni, S. (1998). *J. Protein. Chem.* 17, 827-834.
- Erlanger, B. F., Kolowsky, N., and Cohen, N. (1961). *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-278.
- Heath, R. L., McDonald, G., Christeller, J. T., Lee, M., Bateman, K., West, J., Heeswijck, R. V., and Anderson, M. A. (1997). *J. Insect Physiol.* 43, 833-842.
- Jongsma, M. and Bolter, C. (1997). *J. Insect Physiol.* 43, 885-895.
- Joulbirt, F. J., Carlsson, F. H., and Haylett, T. (1981). *Hoppe-Seyler's Zeitsch. Physiol. Chem.* 362, 531-538.
- Kalume, D. E., Sousa, M. V., and Morhy, L. (1995). *J. Protein Chem.* 14, 685-693.
- Kennedy, A. R. (1998). *Pharmacol. Ther.* 78, 167-209.
- Knight, C. G. (1986). In *Proteinase Inhibitors* (Barret, A. J. and Salvesen, G., eds.), Elsevier, Amsterdam, pp. 23-51.
- Kunitz, M. (1945). *J. Gen. Physiol.* 30, 291-310.
- Laemmli, U. K. (1970). *Nature* 227, 680-685.
- Lehle, K., Kohnert, U., Stern, A., Popp, F., and Jaenicke, R. (1996). *Nature Biotech.* 14, 476-480.
- Lourenço, D. M., Sampaio, M. U., and Sampaio, C. A. M. (1989). *Adv. Med. Exp. Biol.* 247B, 553-557.
- Macedo, M. L. R., Matos, D. G. G., Machado, O. L. T., Marangoni, S., and Novello, J. C. (2000). *Phytochemistry* 54, 553-558.
- Macedo, M. L. R. and Xavier-Filho, J. (1992). *J. Sci. Food. Agric.* 58, 55-58.
- Mosolov, V. V. (1995). *Appl. Biochem. Microbiol.* 31, 3-7.
- Norioka, N., Hara, S., Ikenaka, T., and Abe, J. (1988). *Agric. Biol. Chem.* 52, 1245-1252.
- Odani, S., Ono, T., and Ikenaka, T. (1979). *J. Biochem.* 86, 1795-1805.
- Oliva, M. L. V., Grisolia, D., Sampaio, M. U., and Sampaio, C. A. M. (1982). *Agents Actions* 9, 52-57.
- Oliva, M. L. V., Mendes, C. R., Juliano, M. A., Chagas, J. R., Rosa, J. C., Greene, L. J., Sampaio, M. U., and Sampaio, C. A. M. (1999). *Immunopharmacology* 45, 163-169.
- Oliva, M. L. V., Sallai, R. C., Sampaio, C. A. M., Fritz, H., Auerswald, E. A., Tanaka, A. S., and Sampaio, M. U. (1996). *Immunopharmacology* 32, 85-87.
- Oliva, M. L. V., Santomauro-Vaz, E. M., Andrade, S. A., Juliano, M. A., Pott, V. J., Sampaio, M. U., and Sampaio, C. A. M. (2001). *Biol. Chem.* 382, 109-113.
- Oliva, M. L. V., Souza-Pinto, J. C., Batista, I. F. C., Araujo, M. S., Silveira, V. F., Auerswald, E. A., Mentele, R., Eckerskorn, C., Sampaio, M. U., and Sampaio, C. A. M. (2000). *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 64-74.
- Ramasarma, P. R., Rao, A. G. A., and Rao, D. R. (1995). *Biochim. Biophys. Acta* 1248, 35-42.
- Richardson, M. (1991). In *Methods in Plant Biochemistry* (Dey, P. M. and Harborne, J. B., eds.), Vol. 5, Academic Press, New York.
- Ryan, C. A. (1990). *Annu. Rev. Phytopathol.* 28, 425-449.
- Sampaio, C. A. M., Oliva, M. L. V., Sampaio, M. U., Batista, I. F. C., Bueno, N. R., Tanaka, A. S., Auerswald, A., and Fritz, H. (1996). *Immunopharmacology* 32, 62-66.
- Schuler, T. H., Poppy, G. M., Kerry, B. R., and Denholm, I. (1998). *Trends Biotechnol.* 16, 168-175.
- Shewry, P. R. and Lucas, J. A. (1997). *Adv. Bot. Res.* 26, 135-192.
- Souza, E. M. T., Mizuta, K., Sampaio, M. U., and Sampaio, C. A. M. (1995). *Phytochemistry* 39, 521-525.
- Uriel, J. and Berges, J. (1968). *Nature* 218, 578-580.
- Valueva, T. A. and Mosolov, V. V. (1999). *J. Plant Physiol.* 46, 322-329.
- Valueva, T. A., Revina, T. A., and Mosolov, V. V. (1997). *Biochemistry* 62, 1367-1374. (Translated from *Biokhimiya*)
- Walsh, T. A. and Twitchell, W. P. (1991). *Plant Phys.* 97, 15-18.
- Westemeir, R. (1993). In *Electrophoresis in Practice—A guide to theory and practice*. VCH Publishers, New York pp. 210-212.
- Xavier-Filho, J. (1992). *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 4, 1-6.
- Xavier-Filho, J. and Campos, F. A. P. (1983). *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 16, 11-15.
- Xavier-Filho, J., Campos, F. A. P., Ary, M. B., Silva, C. P., Carvalho, M. M. M., Macedo, M. L. R., Lemos, F. J. A., and Grant, G. (1989). *J. Agric. Food Chem.* 37, 1139-1143.

APÊNDICE 2

Original article

Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*

Maria Ligia Rodrigues Macedo ^{a,b,*}, Gláucia C. Mello ^a, Maria das Graças M. Freire ^a, José C. Novello ^a, Sérgio Marangoni ^a, Daniela G.G. de Matos ^b

^aDepartamento de Bioquímica, Instituto de Biologia (IB), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

^bLaboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas, Departamento de Ciências Naturais, CEUL, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Avenida Capitão Orlino Mancini, 1662, Colinas C.P. 210, 79603-011, Três Lagoas, MS, Brazil

Received 7 December 2001; accepted 18 April 2002

Abstract

Bruchid larvae cause major losses in grain legume crops throughout the world. Some bruchid species, such as the cowpea weevil, are pests that damage stored seeds. Plants synthesize a variety of molecules, including proteinaceous proteinase inhibitors, to defend themselves against attack by insects. In this work, a trypsin inhibitor (DMTI-II) isolated from *Dimorphandra mollis* seeds was tested for anti-insect activity against *Callosobruchus maculatus* larvae. The inhibitor produced ca. 67% mortality to this bruchid when incorporated into an artificial diet at a level of 1%. The doses necessary to cause 50% mortality (LD₅₀) and to reduce weight by 50% (ED₅₀) for DMTI-II were ca. 0.50% and 0.60%, respectively. The action of DMTI-II on *C. maculatus* larvae may involve the inhibition of trypsin-like activity of larval midgut extracts, the absence of digestion by midgut preparations or with a mixture of pepsin and papain, and its association with a chitin column and chitinous structure in the midgut of this insect. © 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: *Callosobruchus maculatus*; *Dimorphandra mollis*; Resistance; Trypsin inhibitor

1. Introduction

The grains of legumes such as beans, cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) and lentils are major sources of dietary proteins in many countries, but seed harvests are often diminished by infestation of the crops with seed weevils. The cowpea plant has a low level of resistance to insects and microorganisms, and consequently produces very low crop yields [20]. A grain potential of over 1500 kg ha⁻¹ is never obtained without the use of synthetic insecticides [30]. One of the most important insect pests of the cowpea is the bruchid weevil *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera), which attacks the seeds during storage to severely

affect the quality and storability of the produce. In severe periods of infestation, post-harvest seed losses due to *C. maculatus* can reach 100% within a period of 6 months [14].

Many proteins that bind to chitin are related to plant defense mechanisms against organisms that contain this polysaccharide as a constituent of their membranes. This group includes wheat germ agglutinin (WGA) and other lectins and proteins that are toxic to insects and affect the development of fungi. The mode of action of these proteins is unknown but may interfere with the uptake of nutrients by binding to chitin in larval midgut membranes. This membrane exists in most phytophagous insects and is composed primarily of chitin (containing *N*-acetylglucosamine residues) and proteins [31]. The peritrophic membrane forms a barrier to protect the midgut epithelium from abrasive food particles.

Plants synthesize a variety of molecules to defend themselves against insect attack [1]. Proteinaceous proteinase inhibitors (PI) represent one class of such molecules [9,38]. The resulting inactivation of gut proteolysis leads to poor nutrient use, retarded development, and eventually

Abbreviations: BAPNA, *N*-benzoyl-DL-arginyl-*p*-nitroanilide; BSA, bovine serum albumin; DMSO, dimethyl sulfoxide; DMTI-II, trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis*; ED₅₀, dose necessary to reduce weight by 50%; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; K_i, inhibition constant; LD₅₀, dose necessary to cause 50% mortality; PI, proteinase inhibitor; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

* Corresponding author.

E-mail address: bioplan@terra.com.br (M.L.R. Macedo).

© 2002 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS. All rights reserved.
PII: S0981-9428(02)01441-9

death by starvation [10]. Serine PIs are effective against Lepidoptera [7,16,36,42], whereas cysteine PIs are effective against some coleopterans [14,21,24,39].

Non-serine digestive proteinases resembling cathepsin were initially considered to be restricted to hemipterans, but have now been described in other insects, mainly in phytophagous insects of the Coleoptera order [35]. Digestive cysteine and aspartic proteinases resembling cathepsins were first identified outside the hemipterans in bruchids [5,34,40]. Recently, the existence of a minor serine proteinase in the midgut of *Zabrotes subfasciatus* larvae was suggested [17]. Silva et al. [33] observed an activity against *N*-benzoyl-DL-arginyl-*p*-nitroanilide (BAPNA) in *C. maculatus* larvae.

The search for possible targets in bruchid physiology that could be used in control strategies made an important advance in the late 1970s, when Gatchouse and co-workers reported that trypsin inhibitors were involved in the resistance of a cultivar of *V. unguiculata* to the cowpea weevil [12].

Feedings trials with artificial diets containing PIs have been reported for a number of important insect pests, although this approach is limited by the inability to rear some insects on artificial diets and by the limited availability of purified PIs. Most work has been done with insects belonging to the orders Lepidoptera, Coleoptera, and Orthoptera [15,18]. Only a small range of PIs has been used in these studies, the most common being cowpea trypsin inhibitor (CpTI), soybean trypsin inhibitor (SBTI), soybean Bowman-Birk inhibitor (SBI), and potato inhibitor II (Pot PI II). Most of the PIs tested reduced the growth of the target insect, and in some cases, an insect growth regulatory effect was observed, as well as increased mortality.

Mello and co-workers [29] recently isolated from *Dimorphandra mollis* a trypsin inhibitor (DMTI-II) from seeds that showed a high degree of homology with various members of the Kunitz family of inhibitors and had a high specificity for trypsin. In this work, larvae *C. maculatus* were fed with DMTI-II at four different concentration levels (1.0–0.125%) in a fresh diet in order to determine the effects on larval development, mortality, and digestive proteinase activity. Immunoblot analyses were performed to investigate the binding of DMTI-II to membranous structures of the larval midgut.

2. Results

2.1. Effects of trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* (DMTI-II) on endogenous trypsin-like activity

Digestive proteolytic activity in larval midgut extracts was measured using 1 mM BAPNA as substrate. The specific activity for the hydrolysis of BAPNA by midgut enzymes was 2×10^{-4} kat mg^{-1} . Increasing concentrations of the inhibitor progressively decreased the trypsin-like

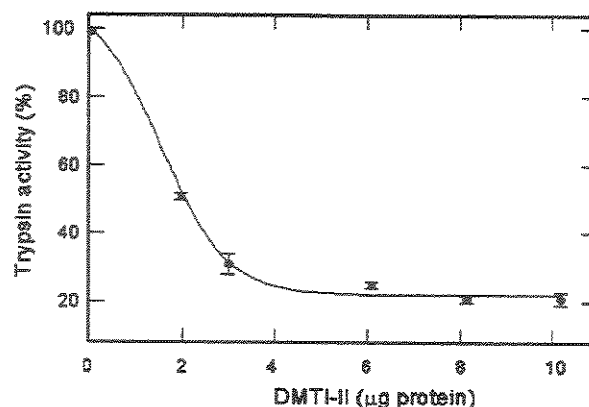


Fig. 1. Effect of increasing DMTI-II concentration on the hydrolysis of BAPNA by extract made from whole *Callosobruchus maculatus* larvae. Data points represent the mean of three incubations, and the error bar represents the range between the incubations. The Student *t*-test was used to identify the means that differed if ANOVA indicated significance.

activity, with maximal inhibition (80%) occurring with 8 µg of DMTI-II (Fig. 1).

2.2. Effect of DMTI-II on larval development

The effect of DMTI-II on larval development was monitored by feeding the larvae DMTI-II in artificial seeds (final inhibitor concentrations ranged from 0.125% to 1% of total dietary protein) and then determining the number and mass of surviving larvae 20 d after oviposition. The dose-response effect of DMTI-II on the survival and growth of weevil larvae is shown in Figs. 2 and 3, respectively. The mortality and weight of cowpea weevil larvae feeding on control seeds (represented by the *y*-intercept value) were ca. 13.5% and 2.4 mg, respectively, while a seed containing 0.53% and 0.60% DMTI-II produced an estimated 50% mortality (LD_{50}) and a decrease of 50% weight (ED_{50}), respectively. Regression analysis showed that for every 0.1% increase in DMTI-II dose, there was a 5.5% increase in mortality with an R^2 value of 0.97. For each increase in dose of 0.1% DMTI-II, there was a 0.2 mg decrease in weight: the R^2 value was 0.98. The inhibition of survivors and weight of the larvae were significantly different for all doses of DMTI-II ($P < 0.05$).

2.3. Digestion of DMTI-II

The susceptibility of DMTI-II to the action of pepsin and pepsin and to acidic proteolytic enzymes from weevil midgut homogenates was assayed by incubating these enzymes with the inhibitor followed by SDS-PAGE. Incubation of DMTI-II with a mixture of pepsin and papain (1/1) for up to 16 h at 37 °C and pH 6.0 showed that DMTI-II was resistant to hydrolysis (Fig. 4). Incubation with whole midgut extracts of *C. maculatus* for up to 72 h at 37 °C also had no effect on DMTI-II (Fig. 5).

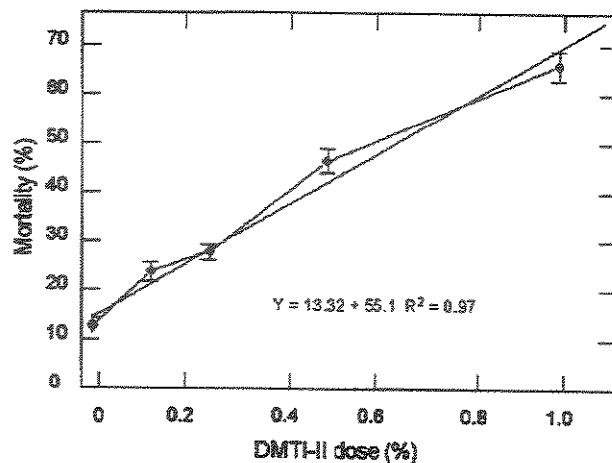


Fig. 2. Effect of DMTI-II on *Callosobruchus maculatus* larval mortality, using an artificial seed bioassay. The y-intercept is the mortality of larvae in control seeds. Each point has an n higher than or equal to 60. Error bars indicate the standard error of the mean.

2.4. Resistance of DMTI-II to larval proteases

Larval proteases were unable to digest DMTI-II (Fig. 5). To determine whether incubation with midgut enzymes of *C. maculatus* was able to inactivate DMTI-II, we assayed the residual inhibitory activity after each period of incubation. In this case, DMTI-II maintained ca. 80% of its activity, even after a 72-h incubation with midgut digestive enzymes (Fig. 6).

2.5. Chitin-column chromatography

When DMTI-II was chromatographed on a chitin column, two peaks were obtained, one on eluting in the equilibrium buffer (50 mM phosphate buffer, pH 7.6) and the other with 100 mM HCl. Approximately 50% of

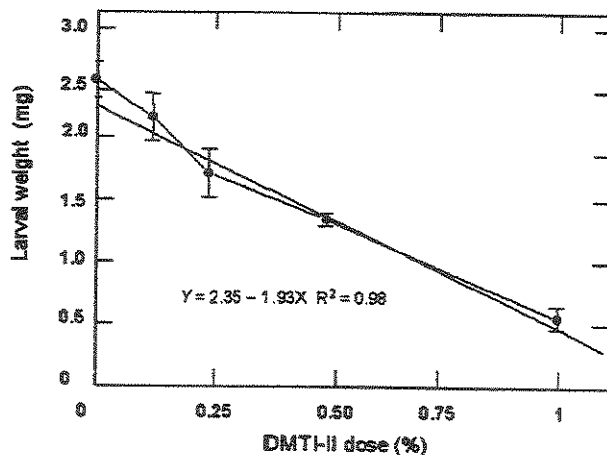


Fig. 3. Effect of DMTI-II on *Callosobruchus maculatus* larval weight mean, using an artificial seed bioassay. The y-intercept is the mortality of larvae in control seeds. Each point has an $n \geq 60$. Error bars indicate the standard error of the mean.

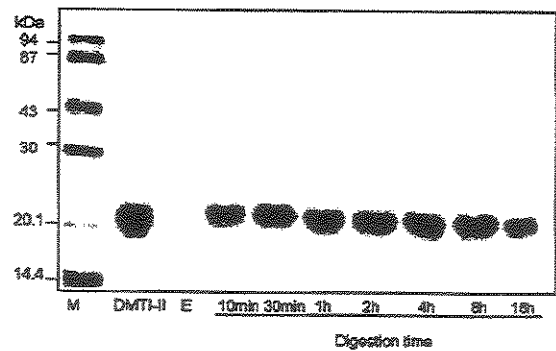


Fig. 4. SDS-PAGE pattern of DMTI-II digestion by a mixture of pepsin and papain. The susceptibility of DMTI-II to the action of papain and pepsin was assayed by incubating these enzymes with the inhibitor for up to 16 h at 37 °C. M, molecular mass markers; E, pepsin + papain.

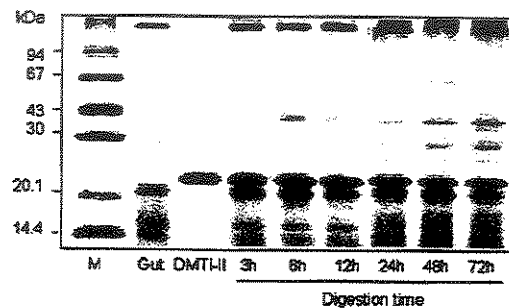


Fig. 5. SDS-PAGE pattern of DMTI-II digestion by a midgut preparation of *C. maculatus* (GUT). The digestion of DMTI-II by the proteolytic enzyme preparations from *C. maculatus* was done for up to 72 h at 37 °C. M, molecular mass markers; DMTI-II, time 0.

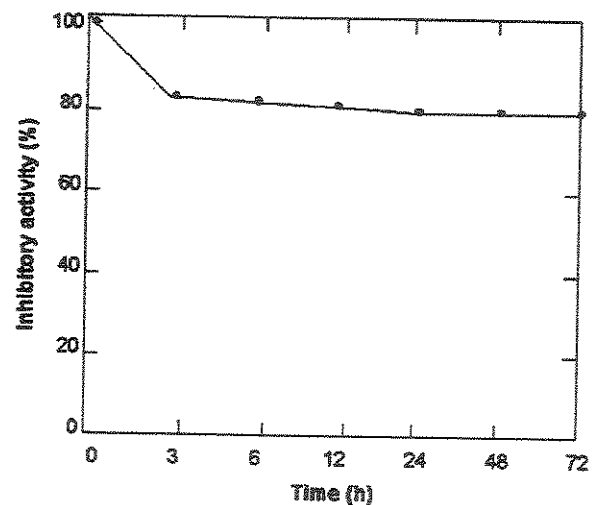


Fig. 6. Effect of the *Callosobruchus maculatus* larval proteases on the inhibitory activity (assayed with BAPNA) of DMTI-II.

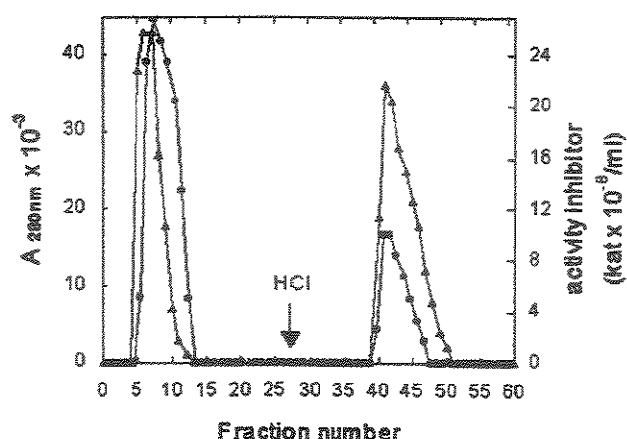


Fig. 7. Chromatography of DMTI-II on a chitin column. The column (2 cm $\times$ 6 cm) was equilibrated with 50 mM phosphate buffer (pH 7.6) and eluted with 100 mM HCl. ($\bullet$) $A_{280\text{ nm}}$; ($\blacktriangle$) inhibitor activity.

DMTI-II bound to the matrix (Fig. 7). The inhibitory activity was detected equally in the peak and in the non-retained fraction.

2.6. DMTI-II binding to midgut membranes

Immunoblots showed that DMTI-II bound to membranes from *C. maculatus* larvae and can be dissociated by chitosan and 100 mM HCl (Fig. 8). DMTI-II showed a stronger binding signal in the eluate with soluble chitosan than with HCl. These results indicate that DMTI-II can bind to *C. maculatus*, possibly through interaction with chitin present in these membranes and/or with other structures, occurring as glycoproteins, glycoconjugates, and trypsin and/or trypsin-like proteins.

3. Discussion

Several trypsin inhibitors with detrimental effects on the growth of insects have been isolated from plants [6,23,42].

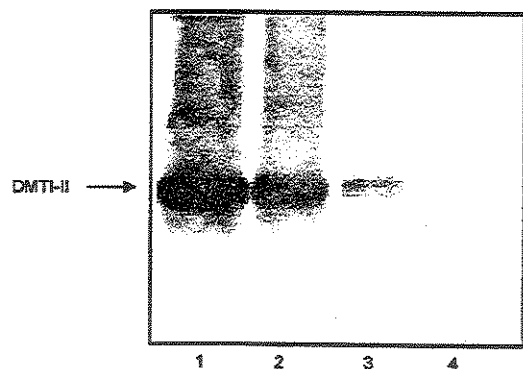


Fig. 8. Representative western blotting analysis of the binding of DMTI-II to isolated membranous structures of larval *Callosobruchus maculatus* midgut. Lane 1, DMTI-II (control); lane 2, DMTI-II eluted with 50 mM phosphate buffer; lane 3, DMTI-II eluted with chitosan; lane 4, DMTI-II eluted with 100 mM HCl.

The present study examined the action of a *Dimorphandra mollis* trypsin inhibitor (DMTI-II) with chitin-binding properties on the growth of *Callosobruchus maculatus* larvae, and assessed the susceptibility of DMTI-II to digestion by papain, pepsin, and acidic proteolytic enzymes of the weevil midgut, as well as the ability to bind to isolated membranes from *C. maculatus* larvae. DMTI-II consisted of a single polypeptide chain with a molecular mass of approximately 22 kDa. The dissociation constant of 1.7×10^{-9} M obtained with bovine trypsin indicated a high affinity between the inhibitor and this enzyme [29].

Recently, Ishimoto and Chrispeels [17] suggested the existence of a minor serine proteinase in the midgut of larval *Zabrotes subfasciatus*. The detection of this protein was based mainly on the degradation of the α -amylase inhibitor by a crude midgut homogenate followed by electrophoresis, and also by the effect of serine proteinase inhibitors. Silva et al. [33] reinvestigated the specificity of intestinal proteinases of larval *C. maculatus* and *Z. subfasciatus* using synthetic substrates. These authors observed that intestinal homogenates of larvae from *C. maculatus* and *Z. subfasciatus* presented serine proteinase activities, although *Z. subfasciatus* were twice more active towards *p*-nitroanilide derivatives, which are substrates for serine proteinases, than *C. maculatus* homogenates.

The assay of trypsin-like activity using BAPNA as a substrate confirmed the results presented by Silva et al. [33] regarding the existence of serine proteinases in the midgut of *C. maculatus*.

The occurrence of serine proteinases in the gut of this insect indicated that DMTI-II would inhibit gut protease activity effectively. Indeed, DMTI-II inhibited the gut protease activity of *C. maculatus* by 80% (Fig. 1). DMTI-II has a K_i of 1.7 nM for trypsin but does not inhibit chymotrypsin, α -amylase, elastase, and papain [29]. The high specificity of DMTI-II for trypsin suggests that the serine proteinase present in the midgut of *C. maculatus* is of the trypsin type. The presence of a minor serine proteinase in *C. maculatus* could play a similar role to that found in *Z. subfasciatus*, as suggested by Ishimoto and Chrispeels [17]. The authors supposed that trypsin could be involved in the hydrolysis of *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor 1 (α -A11), to detoxify the protein. Based on this information, we can suggest that DMTI-II was avoiding the hydrolysis of α -amylase inhibitor by trypsin, causing a possible toxicant effect to the insect.

Several studies have stressed the importance of bioassays for assessing the ability of plant compounds to impart resistance [3,11,15]. The substantial inhibition of gut proteases of several species in the assay in vitro suggested that DMTI-II may affect the growth and/or survival of these insect pests when incorporated into their diet. The effect of DMTI-II on the development of *C. maculatus* was assessed by determining the number and mass of surviving larvae 20 d after oviposition in artificial seeds containing increasing amounts of DMTI-II. DMTI-II produced 67% mortality

at the 1.0% level, with an LD₅₀ of ca. 0.5%. DMTI-II had a strong negative effect on the weight of *C. maculatus*, with an ED₅₀ of 0.6%. Several other serine proteinase inhibitors also showed insecticidal activity at low concentrations. Thus, jackfruit seed trypsin inhibitor, when incorporated in the diet at levels of 1.3% and 0.3%, was toxic to *Cnaphalocrosis medinalis* and *Scirpophaga incertulas*, respectively [2]. Similarly, *Nicotiana glauca* inhibitor, when incorporated at a level of 0.26% and 0.33%, was toxic to *Helicoverpa punctigera* and *Teleogryllus commodus*, respectively [15].

The midgut proteases of larval bruchid beetles are mainly cysteine and aspartic proteinases [5,22,34,40]. The proteolysis of proteinase inhibitors and proteins in general by larval enzymes has been used by various authors to determine the possible appearance of a smaller, toxic polypeptide [17,24,32,39]. The susceptibility and stability of DMTI-II to the action of papain and pepsin and to acidic proteolytic enzymes from weevil midgut homogenates were examined. The digestion of DMTI-II by pepsin (aspartic proteinase) and papain (cysteine proteinase) at pH 6.0 was studied as a model for the action of midgut aspartic and cysteine proteinases in *C. maculatus* reared on the seeds of *V. unguiculata* [22].

DMTI-II was resistant to hydrolysis by a mixture of pepsin and papain for up to 16 h at 37 °C. *C. maculatus* larval enzymes also did not cleave DMTI-II, after up to 72 h at 37 °C (Fig. 5). These results show that DMTI-II is more resistant to digestion by the pepsin–papain mixture and midgut proteinases of *C. maculatus* than are vicilins of resistant cultivars. Vicilin is a storage protein that has been implicated in the detrimental effect of *C. maculatus* against certain cowpea (*V. unguiculata*) cultivars [26].

The presence of chitin in midgut structures of *C. maculatus* larvae was shown by Sales et al. [32] based on chemical and immunocytochemical methods. These authors showed that chitin is located in the apical part of microvilli in the midgut epithelium. They also used the von Wisseling test [32] to demonstrate the presence of chitin in the luminal fluid content and membranes of the larval midgut.

As shown here, DMTI-II bound to a chitin column, although not completely (Fig. 7), and is still active toward trypsin. Immunoblotting showed that DMTI-II also bound to the midgut membrane of *C. maculatus* (Fig. 8), however, not strongly. Part of this binding probably represents interactions with chitinous structures present in these membranes. The fact of DMTI-II binding weakly to chitin could be related to the fact that serine inhibitors usually do not present a specific domain to chitin, like some insecticide proteins such as vicilins [26,27,32] and zeatoxin, a toxic protein isolated from *Zea mays* seeds that is detrimental to *C. maculatus* [25]. The association of DMTI-II to the midgut of *C. maculatus*, although moderately, may hinder the transport of enzymes and their hydrolysis products, which, in combination with a low proteolysis rate, may reduce the availability of amino acids for larval growth, leading to their observed poor development and high

mortality [31]. Another explanation for the detrimental effect, which does not exclude the one presented above, is related to the fact that chitin also lines the foregut of insects [31], and consequently, this part of the gut in bruchids could be associated to DMTI-II from the beginning of the feeding process.

Summarizing, the action of DMTI-II on *C. maculatus* larvae may involve: (a) inhibition of endogenous trypsin-like activity, (b) binding to chitin components of the peritrophic membrane (or equivalent structures) in the weevil midgut, and (c) a strong resistance of DMTI-II to digestion by midgut aspartic and cysteine proteinases in *C. maculatus*.

Additional studies of DMTI-II in other insects are required to confirm the biotechnological potential of DMTI-II as an agent against phytophagous insects.

4. Methods

4.1. Materials

Dimorphandra mollis seeds were collected locally in the city of Três Lagoas, State Mato Grosso do Sul (Brazil). Bovine serum albumin, chitin, bovine pancreatic trypsin, BAPNA, and acetic acid were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), as were the SDS-PAGE molecular mass markers, nitrocellulose membrane, acrylamide, and other electrophoresis reagents. Chromatography supports were from Pharmacia (Uppsala, Sweden). All other chemicals were of reagent grade obtained from local suppliers.

4.2. Insects

The colonies of *Callosobruchus maculatus* used were originally supplied by Dr. J.H.R. Santos (Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil). The insects were housed at 28 ± 1 °C and a relative humidity of 65–75% and were fed the seeds of a susceptible cowpea cultivar (Epace-10).

4.3. DMTI-II purification

DMTI-II was prepared according to Mello et al. [29]. *D. mollis* seeds free of integument and defatted with hexane were ground in a coffee mill. A crude inhibitor preparation was obtained by extraction of this meal with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6) (10% w/v) for 2 h at 25 °C, with subsequent centrifugation at 7500 × g for 30 min. The supernatant was fractionated by ammonium sulfate precipitation. The fraction corresponding to 30–60% ammonium sulfate saturation (precipitate II or PII) was selected for further purification. After dialysis against water, centrifugation, and lyophilization, PII was dissolved in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6) containing 0.1 M NaCl, and applied to

a Sephadex G-75 column (2.7 cm × 100 cm) equilibrated with the same buffer. The fraction with inhibitory activity was further purified by ion exchange chromatography on a DEAE–Sephadex column (2.0 cm × 20 cm) equilibrated with 0.05 M Tris–HCl buffer (pH 8.0) and eluted with the same buffer containing NaCl in a linear gradient of 0–1.0 M. The peak eluting before the saline gradient contained inhibitory activity and was applied to a trypsin–Sephadex column (2.0 cm × 10 cm) equilibrated with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.6) and 0.1 M NaCl [28]. The elution profiles were monitored at 280 nm.

4.4. Insect bioassays

To examine the effects of DMTI-II on *C. maculatus* development, the artificial seed system previously developed by Macedo et al. [26] was used. Artificial seeds (ca. 400 mg each) were made from cowpea seeds (cultivar Epace-10) ground finely using a cylindrical brass mal and a hand press. Artificial seeds containing DMTI-II at concentrations of 0.125%, 0.25%, 0.5%, and 1% total protein were obtained by thoroughly mixing the inhibitor with cowpea seed meal and pressing as described above. Twelve artificial seeds were prepared for each of the above concentrations and were replicated three times on different dates. After a 48-h period for adjustment in the growth chamber, the seeds were offered to nine 2- to 3-d-old fertilized females. After allowing 24 h for oviposition, the number of eggs per seed was reduced to 5 ($n = 60 \times 3$). Following incubation for 20 d at 28 °C and 70–75% relative humidity, the seeds were opened and the weight and number of larvae were determined. Control artificial seeds were made with Epace-10 cultivar meal containing no added DMTI-II. Linear regression analysis was used to describe the response of *C. maculatus* to a series of doses of DMTI-II. Effective doses for 50% response (ED_{50}) are the concentration fractions that decrease the mass of the larvae to 50% of the mass of the control. Lethal doses (LD_{50}) are the concentrations of the fractions that decrease the number of larvae to 50% of the number found in control seeds. X = dose, and Y = weight or percentage mortality. Because of the range in mortality percentages (14.5–67.2% for *C. maculatus*) for the DMTI-II regression analysis, percentages were not transformed.

4.5. Protein quantification

Protein concentrations were determined by the dye-binding method of Bradford [4], with bovine serum albumin as the standard.

4.6. Protease and inhibitory activity assays

Trypsin-like enzymes were assayed using BAPNA as substrate. For routine assays, BAPNA was used at a final concentration of 1 mM at 1% (v/v) dimethyl sulfoxide (DMSO) in a final volume of 1.5 ml. The pH used in the

reaction was 8 [8]. Buffer and enzyme were thermoequilibrated at 37 °C for 10 min before adding substrate to start the reaction. The reaction was allowed to proceed for 20 min and then stopped with 30% (v/v) acetic acid. The absorbance was read at 410 nm. Trypsin inhibitory activity was determined by measuring the remaining activity of trypsin towards the substrate BAPNA at pH 8.0 after pre-incubation with inhibitor [8]. One inhibitory unit was calculated as described by Xavier-Filho and Coelho [41].

4.7. Midgut preparation

Twenty-day-old larvae were cold-immobilized and dissected, and the midgut was removed in cold 250 mM NaCl. The whole gut was then cleaned of unwanted adhering tissues, the midgut walls were pulled apart, and the luminal contents were collected into a known volume of 250 mM NaCl and used immediately or stored at –20 °C until required. Protein concentration in the extracts was determined according to Bradford [4].

4.8. Total proteinase activity assay

The total proteolytic activity was determined using BAPNA as substrate [8]. Midgut larval extracts (200 µg of protein) were incubated in 100 mM Tris–HCl buffer (pH 8.0) in a final volume of 0.1 ml for 10 min before the addition of 1 ml 1 mM substrate. The reaction was allowed to proceed at 37 °C for 20 min and then stopped by adding 0.2 ml of 30% (v/v) acetic acid. The resulting absorbance was read at 410 nm. Incubations were done for at least three different periods, unless stated otherwise, and the initial rates of hydrolysis were calculated. The assays were done under conditions in which enzyme activity was proportional to protein concentration and the time of incubation. One enzyme unit was defined as the amount of protein that catalyzed the cleavage of 16.6 nkat.

4.9. Effects of DMTI-II on endogenous proteolytic activity

The effect of DMTI-II on the proteolytic activity of whole midgut extracts was measured using BAPNA (1 mM) as a substrate. The assays were run at pH 8.0 in 100 mM Tris–HCl. DMTI-II (2–10 µg) was incubated with the midgut extract (200 µg of protein) at 37 °C for 15 min before adding the substrate. The reaction was stopped by immersion in boiling water for 2 min. All incubations were done in triplicate, and appropriate controls were included. The resulting absorbance was read at 410 nm.

4.10. Digestion of DMTI-II and gel electrophoresis

Larval gut homogenates of *C. maculatus* were prepared as described by Macedo et al. [25]. For this, 200 larval midguts (fourth instar) were dissected and extracted in 1 ml of 0.1 M acetate buffer (pH 5.6) containing 1 mM cysteine

and 3 mM EDTA. The digestion of DMTI-II by the proteolytic enzyme preparations from *C. maculatus* was done in solutions of proteins (2 mg ml⁻¹) in the acetate buffer indicated above. Digestion was done for 3, 6, 12, 24, 48, and 72 h at 37 °C and stopped by immersing the tubes in boiling water for 2 min. After digestion of DMTI-II by larval gut homogenates, aliquots were assayed for inhibitory activity as described above. DMTI-II was also digested with a mixture of pepsin and papain (1/1) at a substrate/proteinase ratio of 20:1 for 10 min, and 0.5, 1, 2, 4, 8, and 16 h at 37 °C in 0.01 M phosphate buffer (pH 6) containing 1 mM cysteine and 3 mM EDTA. The digestion was stopped as described above [25]. The relative molecular masses of the digestion products were estimated by polyacrylamide gel electrophoresis [19]. The proteins used as molecular mass standards for SDS-PAGE were phosphorylase b (94 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (43 kDa), carbonic anhydrase (30 kDa), trypsin inhibitor (20.1 kDa), and α -lactoglobulin (14.2 kDa).

4.11. Determination of inhibitory activity of DMTI-II after digestion

After the digestion of DMTI-II by the enzyme preparations from *C. maculatus*, aliquots (50 μ l) from each incubation time were assayed as described in Section 4.6.

4.12. Chitin-column chromatography

A chitin column (2 cm $\times$ 6 cm; 20 ml bed volume), prepared as described by Hackman and Goldberg [13], was equilibrated with 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.6). After adsorption of the proteins (2 mg of DMTI-II in 1 ml of phosphate buffer), the column was washed with the same buffer until the absorbance at 280 nm returned to 0, after which the adsorbed DMTI-II was eluted with 100 mM HCl. Fractions (2 ml) were collected, and proteins were estimated based on the absorbance at 280 nm after which inhibitory activity was assayed.

4.13. Antiserum preparation and western blotting

Antiserum against DMTI-II was prepared by immunizing New Zealand white rabbits using established methods [27]. IgG was obtained by affinity chromatography of crude immune serum on a protein A-Sepharose column. Pre-immune serum was collected before immunization and used as a control. DMTI-II was separated by SDS-PAGE in 12.5% gels [19] and transferred to nitrocellulose membranes using the method of Towbin et al. [37]. The immunoblots were developed with polyclonal antibodies against purified DMTI-II as described above. The immunoreactive bands were visualized with a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

4.14. DMTI-II binding to midgut membranes

One hundred larvae reared in Epac-10 were dissected under magnification in cold 0.15 M NaCl with the help of tweezers. After exposure, midguts were homogenized with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.6) and centrifuged at 10 000 $\times$ g. The pellet was washed with 0.1 N HCl solution to remove dietary proteins possibly retained by membranous structures [32]. Washed pellets were equilibrated with 50 mM phosphate buffer (pH 7.6) before being used to study DMTI-II binding. Pellets containing 100 midguts were immersed in solutions (2 mg ml⁻¹ in 50 mM phosphate buffer (pH 7.6)) of DMTI-II and incubated for 30 min with gentle shaking. The material was then centrifuged, and the pellets were washed with 50 mM phosphate buffer (pH 7.6), to remove unbound DMTI-II. The inhibitor was eluted with soluble chitosan and 100 mM HCl and analyzed by western blotting as described before.

4.15. Statistical analysis

All data were examined using one-way analysis of variance (ANOVA) (general linear models in a GLM procedure). The Student *t*-test was used to identify the means that differed if ANOVA indicated significance. A *p* value lower than 0.05 was considered to be significant.

Acknowledgements

This work was financed by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), FUNDECT (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul), and PROPP/UFMS (Pró-reitoria de Pesquisa e Pós graduação da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul).

References

- [1] N.J. Bate, S.J. Rothstein, C₆-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *Plant J.* 16 (1998) 561–569.
- [2] J.S. Bentur, N.P. Sarma, R. Bhatnagar, C.V. Sudha, D. Sivaprasad, Evaluation of insecticidal proteins of microbial and plant origin against insect pests of rice, *Insect Sci. Applic.* 19 (1999) 223–228.
- [3] R.A. Boegegrain, M. Pugnère, P. Paroutaud, B. Castro, M. Brehélin, Low molecular weight serine protease inhibitors from insects are proteins with highly conserved sequences, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30 (2000) 145–152.
- [4] M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1970) 248–254.
- [5] F.A.P. Campos, J. Xavier-Filho, C.P. Silva, M.B. Ary, Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.), *Comp. Biochem. Physiol.* 92B (1989) 51–57.

- [6] F. Cecilian, A. Tava, R. Iori, M. Mortarino, M. Odoardi, S. Ronchi. A trypsin inhibitor from snail medic seeds active against pest proteases. *Phytochemistry* 44 (1997) 393–398.
- [7] X. Duan, X. Li, Q. Xue, M. Abo-El-Saad, R. Xu. Transgenic rice plants harboring an introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. *Nat. Biotechnol.* 14 (1996) 494–498.
- [8] F. Erlanger, N. Kokowsky, W. Cohen. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95 (1961) 271–278.
- [9] A.M.R. Gatehouse, J.A. Gatehouse. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect resistant transgenic crops. *Pestic. Sci.* 52 (1998) 165–175.
- [10] A.M.R. Gatehouse, J.A. Gatehouse, P. Dobie, A.M. Kilminster, D. Boulter. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. *J. Sci. Food Agric.* 30 (1979) 948–958.
- [11] A.M.R. Gatehouse, E. Norton, G.M. Davison, S.M. Babbé, C.A. Newell, J.A. Gatehouse. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*: effects of plant inhibitors in vitro and in vivo. *J. Insect Physiol.* 45 (1999) 545–558.
- [12] L.N. Gatehouse, A.L. Shannon, E.P.J. Burgess. Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27 (1997) 929–944.
- [13] R.H. Hackman, M. Goldberg. New substrates for use with chitinases. *Anal. Biochem.* 8 (1964) 397–401.
- [14] A.E. Hall, B.B. Singh, J.D. Ehlers. Cowpea breeding. *Plant Breed. Rev.* 15 (1997) 217–274.
- [15] R.L. Heath, G. McDonald, J.T. Chrispeels, M. Lee, K. Bateman, J. West, R.V. Heeswijck, M.A. Andelson. Proteinase inhibitors from *Nicotiana glauca* enhance plant resistance to insect pests. *J. Insect Physiol.* 43 (1997) 833–842.
- [16] V.A. Hilder, A.M.R. Gatehouse, S.E. Sheerman, R.F. Barker, D. Boulter. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330 (1987) 16–163.
- [17] M. Ishimoto, M.J. Chrispeels. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of α -amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiol.* 111 (1996) 393–401.
- [18] M.A. Jongsma, C. Bolter. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.* 43 (1997) 885–895.
- [19] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [20] A.O. Latunde-Dada. Genetic manipulation of the cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) for enhanced resistance to fungal pathogens and insect pests. *Adv. Agron.* 44 (1990) 133–154.
- [21] A. Lecardonnell, L. Chauvin, L. Juanin, A. Beaujean, G. Prevoust, B. Saugwan-Norreel. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado beetle larvae. *Plant Sci.* 140 (1999) 71–79.
- [22] F.J.A. Lemos, F.A.P. Campos, C.P. Silva, J. Xavier-Filho. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Entomol. Exp. Appl.* 56 (1990) 219–227.
- [23] F. Leo, M. Bonadé-Botino, L. Ruggiero, L.R. Ceci, R. Gallerani, L. Jouanin. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31 (2001) 593–602.
- [24] J.C. Leplé, M. Bonadé-Botino, S. Augustin, G. Pilate, V. Dumandis-Le Tan, A. Delplanque, D. Cornu, L. Jouanin. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Mol. Breed.* 1 (1995) 319–328.
- [25] M.L.R. Macedo, M.B. Coelho, M.G.M. Freire, O.L.T. Machado, S. Marangoni, J.C. Novello. Effect of a toxic protein isolated from *Zea mays* seeds on the development and survival of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. *Protein Peptide Lett.* 17 (2000) 25–31.
- [26] M.L.R. Macedo, K.V.S. Fernandes, M.P. Sales, J. Xavier-Filho. Vicilins variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comp. Biochem. Physiol.* 105C (1993) 89–94.
- [27] M.L.R. Macedo, K.V.S. Fernandes, M.P. Sales, J. Xavier-Filho. Purification and properties of storage proteins (vicilins) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which are susceptible or resistant to the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 26 (1995) 183–190.
- [28] M.L.R. Macedo, J. Xavier-Filho. Purification and partial characterization of trypsin inhibitors from seeds of *Clitoria ternatea*. *J. Sci. Food Agric.* 58 (1992) 55–58.
- [29] G.C. Mello, M.L.V. Oliva, J.T. Sumikawa, O.L.T. Machado, S. Marangoni, J.C. Novello, M.L.R. Macedo. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. *J. Protein Chem.* (2001) 625–632.
- [30] O.G. Omitogun, L.E.N. Jackai, G. Thottappilly. Isolation of insecticidal lectin-enriched extracts from African yam bean (*Sphenostylis stenocarpa*) and other legume species. *Entomol. Exp. Appl.* 90 (1999) 301–311.
- [31] A.G. Richards, P.A. Richards. The peritrophic membranes of insects. *Annu. Rev. Entomol.* 22 (1977) 219–240.
- [32] M.P. Sales, P.P. Pimenta, N.S. Paes, M.F. Grossi-de-Sa, J. Xavier-Filho. Vicilins (7S storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structures of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 34 (2001) 27–34.
- [33] C.P. Silva, W.R. Terra, R.M. Lima. Differences in midgut serine proteinases from larvae of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 47 (2001) 18–28.
- [34] C.P. Silva, J. Xavier-Filho. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). *Comp. Biochem. Physiol.* 99B (1991) 529–533.
- [35] W.R. Terra, C. Ferreira, B.P. Jordão, R.J. Dillon. Digestive enzymes. in: M.J. Lehane, P.F. Billingsley (Eds.). *Biology of the Insect Midgut*. Chapman and Hall, London, 1996, pp. 153–194.
- [36] J.C. Thomas, D.G. Adams, V.D. Keppenne, C.C. Wasmann, J.K. Brown, M.R. Kanost, H.J. Bohnert. *Manduca sexta* encoded protease inhibitors expressed in *Nicotiana tabacum* provide protection against insects. *Plant Physiol. Biochem.* 33 (1995) 611–614.
- [37] H. Towbin, N.T. Staehelin, J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 (1979) 4350–4354.
- [38] T.A. Valueva, V.V. Mosolov. Protein inhibitors of proteinases in seeds: 2. Physiological functions. *Russian J. Plant Physiol.* 46 (1999) 322–329.
- [39] S. Visal, M.A.J. Taylor, D. Michaud. The proregion of papaya proteinase IV inhibits Colorado potato beetle digestive cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 434 (1998) 401–405.
- [40] J. Xavier-Filho. Trypsin inhibitors in sorghum grain. *J. Food Sci.* 39 (1974) 422–443.
- [41] J. Xavier-Filho, A.N. Coelho. Acid proteinases of *Callosobruchus maculatus* and proteinase inhibitors of *Vigna unguiculata*. *Plant Physiol.* 65 (1980) 138.
- [42] K.W. Yeh, M.L. Lin, S.J. Tuan, Y.M. Chen, C.Y. Lin, S.S. Kao. Sweet potato (*Ipomea batata*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. *Plant Cell Rep.* 16 (1997) 696–699.