

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

LAYS CORDEIRO GUIMARÃES

**“PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE
INSETICIDA DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE
SEMENTES DE *Poincianella pyramidallis* (FABACEAE:
CAESALPINIOIDEAE)”**

CAMPINAS

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

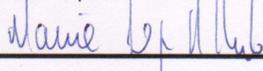
LAYS CORDEIRO GUIMARÃES

**PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE INSETICIDA
DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE *Poincianella
pyramidallis* (FABACEAE: CAESALPINIOIDEAE)**

Este exemplar corresponde à redação final da
DISSERTAÇÃO defendida pela candidata

LAYS CORDEIRO GUIMARÃES

e aprovada pela Comissão Examinadora.



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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

CAMPINAS

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

G947p Guimarães, Lays Cordeiro, 1987-
Purificação, caracterização e atividade inseticida de um inibidor de tripsina de semente de *Poincianella pyramidallis* (Fabaceae:Caesalpinioideae) / Lays Cordeiro Guimarães. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Maria Ligia Rodrigues Macedo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Inibidores da tripsina. 2. Leguminosa. 3. Inseticidas. I. Macedo, Maria Ligia Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Purification, characterization and activity insecticide of a trypsin inhibitor for *Poncianella pyramidallis*(Fabaceae:Caesalpinioideae) seeds

Palavras-chave em inglês:

Trypsin inhibitors

Leguminous

Insecticides

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestra em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Maria Ligia Rodrigues Macedo [Orientador]

Maria das Graças Machado Freire

Thaís Regiani Cataldi

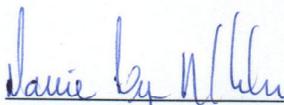
Data de defesa: 23-08-2013

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 23 de agosto de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo (orientadora)


Assinatura

Profa. Dra. Maria das Graças Machado Freire


Assinatura

Dra. Gláucia Coelho de Mello

Assinatura

Prof. Dr. Sergio Marangoni

Assinatura

Dra. Thaís Regiani Cataldi


Assinatura

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora Maria Ligia Rodrigues Macedo, pelos ensinamentos que me foram transmitidos.

Aos pais, Eurípedes Batista Guimarães e Gilvana Cordeiro de Sousa Guimarães, por estarem sempre ao meu lado, me orientado em qualquer desafio, e por sempre me oferecerem o melhor possível para que eu pudesse me dedicar aos meus estudos.

Aos meus irmãos, Gustavo e Thiago, por estarem sempre ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Sérgio Marangoni que me acolheu em seu laboratório, dando todo o suporte necessário para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao Paulinho Baldasso, um técnico e amigo que tornou o desenvolvimento desse trabalho mais fácil.

Aos queridos colegas do LPPFB e LAQUIP pelo companheirismo. Especialmente ao Caio pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

As meninas da republica CasAmarela, pela paciência, companheirismo e amizade nesses dois anos de convivência.

Aos meus amigos de longe, que independente da distância proporcionaram dias de alegria e me apoiaram nos dias de tristeza, em especial a Mayara, a que sempre esteve presente mesmo a 100km de distância.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

ABREVIACÕES	X
ABREVIACÕES PARA AMINOÁCIDOS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
I - INTRODUÇÃO	1
1- CENÁRIO ATUAL	1
2 - PROTEASE	2
3 - INIBIDORES DE PROTEASE	5
3.1 - FAMILIA BOWMAN-BIRK	6
3.2 - FAMÍLIA KUNITZ	7
4 - INSETO PRAGA	7
4.1 - ORDEM LEPIDOPTERA	8
5 - PROTEASES DO INTESTINO DE INSETOS LEPIDÓPTEROS	8
6 - ADAPTAÇÃO DOS INSETOS AOS INIBIDORES DE PROTEINASES	9
7 - ANAGASTHA KUEHNIELLA	10
8 - FAMILIA FABACEAE	11
8.1 - POINCANELLA PYRAMIDALIS	11
II - OBJETIVOS	13
1 - OBJETIVO GERAL	13
1.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
III - MATERIAL E MÉTODOS	14
1- ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR DE <i>P. PYRAMIDALIS</i>	14

1.1 MATERIAL VEGETAL	14
1.2 OBTENÇÃO DA FARINHA DE SEMENTES DE <i>P. PYRAMIDALIS</i>	14
1.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO	14
1.4 CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM COLUNA SEPHADEX G-75	15
1.5 CROMATOGRAFIA DE HIDROFOBICIDADE PHENYL-SEPHAROSE	15
1.6 - CROMATOGRAFIA EM COLUNA C-18	17
2 - QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS	17
3- ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS	18
4- DETERMINAÇÃO DA SEQUENCIA N-TERMINAL	18
4.1 - ESTUDO DE HOMOLOGIA SEQUENCIAL	19
5 - CARACTERIZAÇÃO DO INIBIDOR DE <i>P.PYRAMIDALIS</i>	20
5.1- ATIVIDADE INIBITÓRIA FRENTE À TRIPSINA BOVINA	20
5.2- ESTEQUIOMETRIA DE INIBIÇÃO	20
5.3 -DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE INIBIÇÃO (K _i)	21
5.4 - ESTABILIDADE DO PPyTI	21
6 - ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PPyTI EM LARVAS DE 4ºINSTAR DE <i>A. KUEHNIELLA</i>.	22
7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	23
8 - ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PPyTI FRENTE AS PROTEASES DE DIFERENTES INSETOS-PRAGAS	23
<u>IV – RESULTADOS</u>	<u>25</u>
1 - PURIFICAÇÃO PPyTI	25
1.1 - CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE EXCLUSÃO MOLECULAR SEPHADEX G-75	25
1.2 - CROMATOGRAFIA EM COLUNA DE HIDROFOBICIDADE PHENYL-SEPHAROSE	26
1.3 - CROMATOGRAFIA EM C-18	27
1.4 - ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS	28
2 - DETERMINAÇÃO DA MASSA ACURADA POR ESPECTOMOTRIA MALDI-TOF	29
3 - DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA N-TERMINAL	29

4 - CARACTERIZAÇÃO DO INIBIDOR PpyTI	30
4.1 - ESTEQUIOMETRIA DE INIBIÇÃO	30
4.2 - DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE INIBIÇÃO (KI)	31
4.3 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE PpyTI	32
5 - ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PpyTI EM LARVAS DE <i>A. KUEHNIELLA</i>	35
5.1 - PESO LARVAL	35
5.2 - SOBREVIVÊNCIA LARVAL	36
5.3 - ÍNDICES NUTRICIONAIS	37
6 - ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PpyTI EM LARVAS DE <i>A. KUEHNIELLA</i>	37
6.1 - ATIVIDADE TRIPTICA DE LARVAS DE <i>A. KUEHNIELLA</i>	37
7 - DESENVOLVIMENTO PUPAL DE <i>A. KUEHNIELLA</i> EM DIETA CONTENDO PpyTI	40
8 - ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PpyTI SOBRE AS PROTEASES DE DIFERENTES INSETOS-PRAGA	41
<u>V - DISCUSSÃO</u>	<u>42</u>
<u>VI - CONCLUSÕES</u>	<u>49</u>
<u>VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>50</u>

ABREVIATÓES

FAO – Organizaçãõ da agricultura de alimentos das Nações Unidas

ID5A-ADEPA - Inibidor de tripsina de *Adenantha pavonia*

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

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

BvTI - Inibidor de tripsina de *Bauhinia variegata*

DTT – Ditiotreitõl

PpyTI – Inibidor de tripsina de *Poincionella pyramidalis*

INTRY-ACACO – Inibidor de *Enterolobium contortisiliguum*

SAPNA - N-succinyl-AlaAla-Pro-Phe-pNa

CbTI – Inibidor de tripsina de *Caesalpinia bonduc*

ACKI - Inibidor de tripsina de *Acacia polyphylla*

IP – Inibidor de protease

SDS-PAGE - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS

ABREVIÇÕES PARA AMINOÁCIDOS

Aminoácido	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
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

RESUMO

As perdas anuais resultantes dos ataques de insetos às plantações chegam à cifra de 30%. Estudos na área de interação inseto-planta têm revelado que as plantas defendem-se dos insetos produzindo substâncias químicas que os repelem ou intoxicam. Neste trabalho, um inibidor de tripsina isolado de sementes de *Poincianella pyramidalls* (Caesalpinioideae) – (PpyTI) foi purificado e caracterizado sob o ponto de vista funcional e estrutural. O inibidor mostrou-se estável a pH em uma faixa de 2 a 8, porém perdeu parcialmente a atividade em altas temperaturas e na presença de DTT 100mM. PpyTI foi purificado através de três passos de purificação e apresentou uma massa acurada de 19.042 Daltons, determinada através de espectrometria de massa MALDI-TOF. Outras características como a estequiometria de inibição, a constante de inibição (K_i) e o sequenciamento N-terminal permitiram classificar PpyTI indicando que possivelmente se trata de um inibidor de serinoprotease membro da família Kunitz. O inibidor *In vitro* foi capaz de inibir enzimas intestinais de diversos insetos-praga. E teste *In vivo* com *Anagatha kuehniella*, mostram atividade inseticida, reduzido a sobrevivência e comprometendo o desenvolvimento larval ao ponto de interferir no empupamento desses inseto, além desse impacto, as larvas que ingeriram PpyTI incorporada à dieta artificial não mostraram sinais de adaptação, e continuaram sensíveis ao inibidor. De acordo com estes resultados, PpyTI se mostra como uma ferramenta promissora no combate a pragas agrícolas.

ABSTRACT

Annual losses resulting from the attacks of insects to crops reach the figure of 30%. Studies on insect-plant interactions have revealed that plants defend themselves from insects producing chemicals that repel or intoxicate. In this work a trypsin inhibitor isolated from seeds of *Poincianella pyramidalls* (Ceasalpinioideae) - (PpyTI) was purified and characterized from the point of view of functional and structural. The inhibitor was stable and pH, however partially lost activity at higher temperatures and in the presence of 100 mM DTT. PpyTI was purified by three purification steps and had a mass of 19,042 Daltons accurate, as revealed by mass spectrometry MALDI-TOF. Other characteristics such as stoichiometry of inhibition, the inhibition constant (K_i) and N-terminal sequencing can be classified PpyTI possibly indicate that it is a member of the serine protease inhibitor of the Kunitz family. The *in vitro* inhibitor was able to inhibit intestinal enzymes of various insect pests. E *In vivo* testing with *Anagastha kuehniella* show insecticidal activity, reduced survival and compromising larval development to the point of the interfeerer become a pupa these insects, besides this impact, the larvae that ingested PpyTI incorporated into artificial diet showed no signs of adaption, and continued sensitive to the inhibitor. According to these results, PpyTI shown as a promising tool in the fight against agricultural pests.

I - Introdução

1- Cenário Atual

Atualmente a população mundial ultrapassou 7 bilhões de habitantes, mais que o dobro da década de 60, quando não ultrapassavam 3,3 bilhões de habitantes. Estimativas da FAO - Food and Agriculture Organization (Organização da Agricultura de Alimentos das Nações Unidas) apontam que nas próximas décadas a população mundial poderá alcançar a marca de 9 bilhões de habitantes (FAO, 2011). Junto com a explosão demográfica, a demanda agrícola deve ser otimizada em escala global. Entretanto, estimativas dão conta que perdas nas principais lavouras devido ao ataque de insetos esteja entre 10 e 20%, o que é um fator limitante na produção de alimentos (FERRY *et al.*, 2004).

Hoje o controle de insetos-praga é feito principalmente com o uso de agroquímicos, que, apesar de eficientes apresentam sérios riscos ambientais e à saúde humana, além de ser um método que alto custo, com gastos anuais superiores a U\$ 8 bilhões (LAWRENCE *et al.*, 2002). Além disso, o uso indiscriminado de inseticidas tem provocado o surgimento de populações de insetos resistentes, exigindo a aplicação de agrotóxicos em superdosagens ou a utilização de novos princípios ativos com os efeitos sobre o agroecossistema ainda pouco avaliados (JUNIOR, 2011). Sendo assim, estratégias alternativas a utilização de inseticidas convencionais necessitam ser desenvolvidas. O controle biológico é uma técnica aplicada à redução da população de uma espécie-alvo que tem potencial de provocar danos econômico, além de ser recomendado para

reduzir as populações de insetos-praga, combater plantas daninhas, patógenos de plantas, nematoides entre outros (ROMEIRO, 2007).

Para limitar os efeitos nocivos dos agroquímicos sobre o ambiente e a saúde humana, a engenharia genética de plantas tem sido proposta como uma alternativa para criar plantas resistentes a insetos. Sabe-se que plantas expressam proteínas de defesa em resposta ao ataque de insetos e patógenos, sendo que a transferência destes genes na maioria das vezes conferem resistência ao ataque dos patógenos avaliados (RAMOS *et al.*, 2012; RANJEKAR *et al.*, 2003). Dentre as diversas proteínas vegetais estudadas, podemos destacar a família dos inibidores de proteases. Diversas plantas transgênicas expressando inibidores de protease apresentaram resultados satisfatórios (DE LEO *et al.*, 2002; HILDER *et al.*, 1999; RAMOS *et al.*, 2012).

2 – Protease

Proteases são enzimas responsáveis por catalisar a clivagem das ligações peptídicas das proteínas, sendo que os produtos de sua atividade são peptídeos ou aminoácidos e são subdivididas em endopeptidases (proteinases) e exopeptidases (proteases), as quais diferem quanto ao local de clivagem na molécula de proteína. As endopeptidases atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica, enquanto as exopeptidases hidrolisam aminoácidos na extremidade C ou N terminal da cadeia (JONGSMA *et al.*, 1997). Nos animais elas representam 2% dos genes expressos (SAJID *et al.*, 2002) e estão envolvidas em inúmeros processos fisiológicos: metabolismo de proteínas, ativação de proteínas traduzidas como zimogênio, reaproveitamento de aminoácidos, digestão,

respostas imunes, apoptose e coagulação sanguínea (GONZÁLEZ-RÁBADE *et al.*, 2011).

De acordo com a sua função, similaridade da estrutura primária e da natureza química do sitio catalítico, as proteases são organizadas em classes (tabela 1), sendo que as mais estudadas são: serinoproteases, cisteinoproteases, asparticoproteases e metaloproteases (LECAILLE *et al.*, 2002).

Tabela 1.: Tabela descritiva das classes de proteases Fonte: (NEURATH, 1986)

Classe	Proteases representativas	Aminoácidos do sítio ativo
Serinoprotease	Quimotripsina	
	Tripsina	Asp,Ser,His
	Elastase	
	Calicreína pancreática	
Cisteinoprotease	Papaína	
	Actinidina	Cis,His,Asp
	Catepsina	
Asparticoprotease	Penicilopepsina	
	Renina	Asp

Metaloprotease

Carboxipeptidase A

Zn,Glu,Tyr

Serinoproteases é a classe bem estudadas. Caracterizada por uma tríade catalítica de aspartato (Asp), histidina (His) e serina (Ser). A conformação global das serinoproteases é praticamente a mesma: dois domínios compactos, simetricamente dispostos ao redor de dois eixos de simetria. Diferenças na especificidade do substrato podem estar relacionadas à substituição de aminoácidos no sítio primário do substrato, comumente denominado de P1, e a diferenças menores, no sítio secundário. Os genes que codificam tripsina, quimotripsina e elastase diferem em número e distribuição de íntrons (CRAIK *et al.*, 1982). A catálise ocorre via um estágio de transição intermediário durante os estágios de acilação e desacilação (KRAUT, 1977). Cisteinoproteases apresentam resíduos cisteína e histidina na tríade catalítica, podendo ainda apresentarem outros resíduos de aminoácidos. A catálise ocorre via um éster thiol intermediário e é facilitada por cadeias adjacentes de histidina e ácido aspártico. Asparticoproteases ou proteases ácidas são endopeptidases que possuem um resíduo de ácido aspártico em seu sítio catalítico. A principal característica das metaloproteases é a dependência de um íon metálico divalente. O sítio ativo inclui o íon metálico, o qual é ligado a dois ácidos glutâmicos e a uma histidina.

Estudos acerca da distribuição de enzimas digestivas em insetos revelaram a presença de todas as classes de protease na maioria das famílias de insetos. A predominância de uma determinada família varia de acordo com a ordem de inseto estudada. Por exemplo, é característico dentre insetos lepidópteros a presença de serinoproteases e em coleópteros a presença de cisteinoprotases

(TERRA *et al.*, 1994). Outra característica comum a lepidópteros é a presença de um trato digestivo alcalino, possivelmente resultado adaptações evolucionárias que permitiram a esta ordem consumir alimentos ricos em celulose (CHRISTELLER *et al.*, 1992). Nesta linha de raciocínio, coleópteros apresentam um trato digestivo ácido, e tem como principal constituinte de sua dieta sementes de leguminosas.

3 - Inibidores de protease

As proteases são enzimas de extrema importância para o funcionamento adequado do metabolismo de proteínas, porém quando desreguladas essas enzimas são extremamente nocivas para o organismo. Para limitar esse dano, essas moléculas são controladas de diferentes formas: por biossíntese de proteases na forma de zimogênio, por regulação na expressão/secreção ou pelo bloqueio da atividade catalítica (LOPES *et al.*, 2009). Inibidores são encontrados em todos os seres vivos, principalmente em fungos e plantas. O estudo da sua importância na defesa de plantas teve início em 1947 por Desikachar onde estes autores observaram que larvas de alguns insetos não se desenvolviam em sementes de soja. Essa atividade inseticida despertou grande interesse dos pesquisadores que viram um potencial para controle de pragas (MACEDO *et al.*, 2011; STEVENS *et al.*, 2013). Em outras áreas de pesquisas, o uso de inibidores como potenciais fármacos tem sido estudadas, com em pesquisas relacionadas ao estudo do retrovírus da AIDS, malária e câncer (BHATTACHARYYA *et al.*, 2009a; FAYARD *et al.*, 2009; JARDINE *et al.*, 2000).

Os inibidores de proteases vegetais são peptídeos ou proteínas encontrados principalmente em plantas das famílias Fabaceae, Poaceae e

Solanaceae. São consideradas moléculas extremamente estáveis, resistentes a variações de pH, ao calor e à proteólise por proteases, sendo que esta estabilidade pode ser atribuída à presença de pontes dissulfeto e a outras interações não covalentes (BIRK, 2003). Além disso, em um único tecido vegetal, pode-se encontrar vários tipos de inibidores, sendo estes específicos ou para um amplo espectro de proteases de origem microbiana e animal (INANAGA *et al.*, 2001). São classificados de acordo com sua especificidade de interação, podendo afetar a atividade de serinoproteases, cisteínoproteases, proteases aspárticas e metaloproteases, as quais compreendem os grandes grupos de enzimas proteolíticas (TREMACOLDI *et al.*, 2004). Grande parte dos inibidores descritos na literatura são isolados e caracterizados a partir de sementes de leguminosas (GARCÍA OLMEDO *et al.*, 1987; LINGARAJU *et al.*, 2008; MACEDO *et al.*, 2000a; MACEDO *et al.*, 2007a; MACHADO *et al.*, 2013c; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Os inibidores mais estudados em plantas pertencem a famílias conhecidas como Bowman-Birk e Kunitz.

Os inibidores apresentam uma variação de massa molecular. A massa molecular desses inibidores variam de 10 a 90 kDa, e são capazes de interagir especificamente e reversivelmente com diferentes enzimas proteolíticas promovendo a inibição competitiva e de estequiometria 1:1 na formação do complexo do enzima-inibidor altamente estáveis com valores entre 10^8 e 10^{13} M^{-1} (Bode and Huber 2000).

3.1 - Família Bowman-Birk

Inibidores dessa família são moléculas pequenas com aproximadamente 8kDa e possuem a capacidade de formar complexos em sítios reativos

independes de estequiometria 1:1 com tripsina, quimotripsina e mais raramente elastase (BIRK, 1985).

3.2 - Família Kunitz

Inibidores da família Kunitz possuem uma massa molecular que a maioria dos representantes desta família apresentam uma massa próxima a 22kDa. podem ser dímeros e geralmente possuem quatro resíduos de cisteína que formam duas pontas dissulfeto (OLIVA et al., 2000).

4 - Inseto Praga

Os insetos podem interagir de maneira benéfica ou maléfica, atuando direta ou indiretamente sobre o homem e outros organismos (FUJIHARA, 2008). Os considerados maléficos atuam como vetores de patógenos e como pragas de plantas cultivadas (GILLOTT, 2005). Os insetos que se alimentam de plantas podem ser classificados como fitófagos à partir do momento em que atingem populações capazes de provocar danos de importância econômica. O ataque pode ocorrer nas diferentes partes dos vegetais ocasionando queda de valor comercial, de produção e até morte das plantas. Em relação aos hábitos alimentares, os insetos podem ser divididos em insetos generalistas ou especialistas (BERNAYS *et al.*, 1994; NAKANO, 1981).

Os insetos generalistas alimentam-se de uma ampla variedade de espécies de plantas e seus mecanismos adaptativos são mais complexos, pois tendem responder a uma série de diferentes substâncias químicas e proteínas de plantas. Por outro lado, insetos especialistas alimentam-se de poucas espécies de plantas relacionadas e envolvem a produção de grandes quantidades de enzimas para

desintoxicação de seus alimentos ou ainda mecanismos de reservas de toxinas da planta hospedeira (PATANKAR et al., 2001).

4.1 - Ordem Lepidoptera

Insetos pertencentes à ordens Lepidoptera representam os principais responsáveis pelos danos causados no campo e no armazenamento de culturas de importância econômica.

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 aparelho mastigador. As larvas das espécies do gênero *Helicoverpa* (Lepidoptera: Noctuidae) são consideradas pragas 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). Outra praga generalista que causa danos significantes no Brasil é *Spodoptera frugiperda*, a sua larva causa danos em diversas culturas como milho, arroz, trigo, algodão e amendoim.(MONNERAT et al., 2006).

5 - Proteases do Intestino de Insetos Lepidópteros

Os Lepidopteros são conhecidos por terem uma faixa de pH intestinal variando de 8 a 11 e é comumente relatada a presença majoritária de enzimas do tipo serinoproteases para os processos digestivos nesta ordem de inseto (GATEHOUSE et al., 1997; TERRA et al., 1994).Em larvas de lepidópteros, existe um complexo grupo de enzimas digestivas, que incluem tripsinas, quimotripsinas, elastases, catepsinas B, aminopeptidases e carboxipeptidases.

Além de apresentar um amplo espectro de proteases digestivas, muitos insetos ainda apresentam isoformas de proteases. Em *Helicoverpa armigera* é possível encontrar cerca de 20 tipos de isoformas de serinoproteínases ativas no intestino (BOWN *et al.*, 1997; PATANKAR *et al.*, 2001). *Spodopera frugiperda* também apresenta diversos genes que codificam diferentes tripsinas e quimotripsinas (OLIVEIRA *et al.*, 2013). A presença de um grande número de genes traduzindo uma mesma protease possivelmente tenha um papel importante no contexto evolutivo dos insetos, possivelmente estes genes participam de processos adaptativos, explicados a seguir.

6 - Adaptação dos insetos aos Inibidores de Proteínases

Como as plantas tentam garantir a continuidade da espécie através de mecanismos de defesa contra a predação, os insetos por sua vez têm buscado maneiras de sobrepujar os mecanismos de defesa vegetal, desenvolvendo elaborados mecanismos de resposta ao longo da co-evolução inseto-planta. Em relação a adaptação aos inibidores de proteases de plantas, diferentes insetos expressam isoenzimas insensíveis a estas moléculas. Essas isoenzimas à primeira vista podem parecer desnecessárias, já que apenas algumas contribuem de forma significativa para a digestão. Entretanto, acredita-se que são elas que promovam vantagens evolutivas, garantindo a sobrevivência da espécie ao proporcionar ao inseto a capacidade de lidar com a ampla gama de proteínas de diversas plantas, incluindo as tóxicas.

Além dessa diversidade de enzimas, que têm um papel fundamental na adaptação, outra estratégia utilizada pelos insetos em resposta a inibidores de proteínases é superprodução das proteínases que estão sendo inibidas

(BROADWAY, 1997; JOHNSTON *et al.*, 1995) ou pela inativação proteolítica da proteína tóxica através das proteinases presentes no intestino médio dos insetos (GIRI *et al.*, 1998; MAZUMDAR-LEIGHTON *et al.*, 2001). O mecanismo molecular da resposta adaptativa de insetos a inibidores de proteinases de plantas ainda deixa muitas dúvidas e entender melhor as vias de respostas do inseto é fundamental para que se possa utilizar os inibidores de proteinases na engenharia de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga

7 - *Anagasta kuehniella*

Entre as diversas famílias pertencentes à ordem Lepidoptera que causam danos à agricultura uma delas é a Pyralidae, muito numerosa e de distribuição mundial. Seus integrantes são bastantes pequenos e se comportam de maneira muito diversa, com grande capacidade adaptativa a diferentes ambientes (GALLO, 2002). *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) é predominante em zona de clima temperado, sendo nativa da Europa. 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 rosada 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 mais de 500 ovos. O ciclo de vida total dura em torno de 2 meses. As larvas movem-se rapidamente, alimentando-se e lançando fios de seda, formando teias (GALLO, 2002).

Essa praga 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, 1995).

Antes de se desenvolver pesquisas aplicadas com o intuito de conferir resistência a cultivares contra o ataque de insetos, precisamos buscar novas proteínas com potencial biotecnológico e estudar a fundo seu mecanismo de ação contra insetos modelo.

8 - Família Fabaceae

A família Fabaceae, a terceira maior família de angiospermas, compreende cerca de 727 gêneros e 19.325 espécies (LEWIS, 1998). A família é subdivida em subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae.

8.1 - *Poincianella pyramidalis*

A *P. pyramidalis* (Tull., L. P. Queiroz), pertencente a subfamília Caesalpinioideae e é conhecida popularmente por catingueira (LORENZI, 1992). Possui o porte arbóreo médio, entre 4 e 6m, de copa aberta e irregular (MAIA, 2004). A frutificação ocorre no início da estação chuvosa, do tipo legume deiscente (6-10 cm de comprimento por 1,7-2,3 cm de largura), de coloração marrom esverdeada cuja semente estenospérmica apresenta-se com 1,0-1,6 cm de comprimento por 0,7-1,2 cm de largura com coloração castanho-escura ou verde-escura (SILVA *et al.*, 1998).

Estudos preliminares realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que as sementes de *P. pyramidalis* possuem inibidores de serinoprotases, abrindo assim uma excelente oportunidade para se aprofundar os conhecimentos sobre a estrutura e o potencial dessa proteína. Neste trabalho, realizamos a purificação e caracterização de um novo inibidor enzimático de sementes de uma espécie vegetal disseminada em todo o Brasil. Uma segunda parte deste trabalho foi dedicada a entender os efeitos inseticidas desta proteína sobre a fisiologia de um inseto praga modelo, *A. kuehniella*, sob os aspectos bioquímicos e fisiológicos, tentando desta maneira contribuir com novas informações acerca do papel biológico deste grupo de proteínas.

II - Objetivos

1 - Objetivo Geral

O presente estudo teve como objetivo isolar um inibidor de tripsina de sementes de *P. pyramidalis* (PpyTI) e analisar seu potencial inseticida mediante a realização de ensaios *in vitro* e *in vivo* com *A. kuehniella*, elucidando os mecanismos de toxicidade desta proteína.

1.2 - Objetivos Específicos

- Isolar e purificar um inibidor de tripsina de sementes de *P. pyramidalis*;
- Realizar a caracterização físico-química do PpyTI;
- Avaliar o potencial inseticida do PpyTI através de ensaios *in vivo* e *in vitro* contra *A. kuehniella*.

III - Material e Métodos

1- Isolamento e Purificação do Inibidor de *P. pyramidalis*

1.1 Material Vegetal

Sementes de *P. pyramidalis* foram obtidas do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB), da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS).

1.2 Obtenção da farinha de sementes de *P. pyramidalis*

As sementes foram descascadas e moídas em moinho elétrico a 27.000 rpm, formando uma farinha fina a qual foi submetida a delipidação com hexano. O material delipidado foi seco para a volatilização do hexano.

1.3 Obtenção do extrato bruto

A farinha delipidada foi homogeneizada em solução de fosfato de sódio 0,1M, pH 7,6 na proporção 1:10 (m/v), durante duas horas à temperatura ambiente. A suspensão foi clarificada em centrifuga a 5.000 rpm a 4°C durante 30 minutos e, o sobrenadante dialisado contra água destilada durante 48 horas e em seguida submetido ao processo de liofilização. O material proveniente da liofilização foi denominado Extrato Bruto (EB).

1.4 Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75

Uma alíquota de 300 mg de EB foi dissolvida em 3 ml de tampão fosfato de sódio 0,1M, pH7,6 contendo 0,1M de NaCl. O material foi incubado em banho de ultra som durante 3 minutos e em seguida centrifugado por 5 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante foi aplicado em coluna Sephadex G-75 (3 x 80cm) equilibrada previamente com o mesmo tampão. Foram coletadas frações de 3ml em um fluxo de 12ml/h. A detecção de proteínas foi feita por espectrofotômetro a 280nm. Após a cromatografia, as frações coletadas foram submetidas a um ensaio para detectar atividade inibitória contra tripsina bovina.

1.5 Cromatografia de hidrofobicidade Phenyl-Sepharose

A fração que apresentou atividade anti-triptica proveniente da cromatografia em coluna Sephadex G-75 foi dialisada, liofilizada e alíquotas de 10 mg dissolvida em 500µl de Tampão A (fosfato de sódio 20mM com sulfato de amônio 0,4M, pH 7,2). Esta amostra foi então aplicada em coluna Phenyl-Sepharose em um sistema de cromatografia de baixa pressão (FPLC). A coluna foi previamente equilibrada em tampão A com um fluxo de 1,2ml/min. Nesta etapa utilizamos um gradiente descontínuo (“stepwise”) de tampões A, B (fosfato de sódio 20mM pH7,2) e C (isopropanol 30%). O gradiente empregado nesta etapa está descrito na tabela 2. A detecção de proteínas foi feita em absorbância de 280nm. Os picos obtidos tiveram a atividade inibitória avaliada e o pico que apresentou atividade inibitória foi dialisado e liofilizado, obtendo-se PpyTI.

Tabela 2. Programação utilizada na cromatografia Phenyl-Sepharose

Tempo (min)	Tampão A(%)	Tampão B(%)	Tampão C(%)	Água(%)
0	100			
15	100			
16	50	50		
45	50	50		
46		100		
66		100		
67		30	70	
92		30	70	
93			100	
108			100	
109				100
119				100
120	100			0

1.6 - Cromatografia em coluna C-18

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

2 - Quantificação de Proteínas

A concentração relativa de proteínas de cada etapa foi estimada pelo método descrito por BRADFORD (1976), utilizando a BSA (albumina sérica bovina) como padrão. A leitura das absorbâncias será obtida por meio de um espectrofotômetro a 595nm.

3- Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

Um gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE 12,5%) foi feito de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). As placas de poliacrilamida são feitas de modo descontínuo: apresentam um gel de concentração de 5 % e um gel de corrida de 12,5 %. As placas são preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque. O gel de concentração 5 % é preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e o gel de corrida é feito com tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. Em ambos os géis são acrescentados 0,1 % (v/v) de SDS 20 %. A PAGE-SDS é realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de massa molecular são dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075 M, pH 6,8; 10 % de glicerol; 4 % de SDS; 0,001 % de azul de bromofenol). As proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular foram: fosforilase (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e α -lactoalbumina (14 kDa). A corrida eletroforética foi realizada com corrente constante (20 mA) e 200 volts. Após a corrida, o gel foi corado com solução de Comassie Blue 0,05% e o excesso retirado com solução de ácido acético 7%.

4- Determinação da sequencia N-terminal

O método de degradação automático desenvolvido por Edman (1950) foi utilizado para determinar a sequência da porção N-terminal do inibidor PpyTI. A degradação Edman é um procedimento cíclico, onde os aminoácidos constituintes de uma proteína ou peptídeo são clivados um a um (um por ciclo) a partir da extremidade N-terminal, sendo identificados como derivados de feniltioidantoínas.

Cada ciclo é composto de 3 etapas: acoplamento de fenilisotiocianato (PITC) ao resíduo N-terminal, clivagem do resíduo N-terminal por ciclização em meio ácido, conversão do derivativo tiazolinona (ATZ) formado, para um derivado mais estável, a tioantoina (PTH), que pode ser identificado por cromatografia. A amostra foi submetida à sequenciamento automático em sequenciador de proteínas de fase gasosa Shimadzu PPSQ-10. Os aminoácidos processados foram identificados a 269 nm depois da separação em coluna C-18 (4,6 mm x 2,5 mm) sobre condições isocráticas.

4.1 - Estudo de homologia sequencial

A partir dos resultados da composição de aminoácidos obtida um estudo de homologia foi realizado com auxílio do servidor ExPASy (WILKINS *et al.* 1998), onde é possível efetuar buscas a partir da composição de aminoácidos de uma proteína por proteínas homólogas. A porcentagem de identidade N-terminal com inibidores de tripsina foi pesquisada utilizando o sistema NCBI-BLAST (ALTSCHUL *et al.*, 1990). O alinhamento múltiplo das sequências N-terminal dos inibidores com as maiores similaridades encontradas foi realizado utilizando o programa CLUSTAL W 2.0.12 (HIGGINS *et al.*, 1996).

5 - Caracterização do inibidor de *P.pyramidalis*

5.1- Atividade inibitória frente à tripsina bovina

Seguindo a metodologia de ERLAGER et al (1961), atividade da tripsina foi medida através da quantificação do corante p-nitroanilida, produto da hidrólise do substrato cromogênico N-benzoyl-L-arginina-p-nitroanilida (BAPNA).

O ensaio foi realizado em microplaca com um volume final de 270µl, sendo 4µl de tripsina (0,125 mg/ml), um volume variável de inibidor dissolvido em tampão Tris-HCl 0,05M pH 8,0. Essa solução foi incubada a 37°C por 10 min e logo após foi adicionado 200µl de BAPNA 1mM. O tempo total de ensaio foi de 30 min e a determinação da hidrólise do substrato foi medida a 410nm no leitor de microplacas VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices). Em todos os ensaios foram preparados os respectivos controles negativos (brancos), onde o volume de enzima foi substituído por tampão.

5.2- Estequiometria de inibição

Para determinar a relação estequiométrica entre PpyTI e tripsina bovina, uma concentração fixa de tripsina (0,021 mM) foi incubada a 37°C por 10 min com concentrações crescentes de inibidor (0; 0,00525; 0,0105; 0,01575; 0,021; 0,02625; e 0,042 mM). Desta maneira, estabelecemos as relações molares (inibidor/enzima) de 0; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25 e 2. Após a incubação a reação ocorreu como descrito acima.

5.3 -Determinação da constante de inibição (Ki)

A determinação da constante de inibição (Ki) de PpyTI foi realizada com o auxílio do programa SigmaPlot. O ensaio foi realizado utilizando BAPNA em diferentes concentrações (0,03 - 1,1M). A concentração de inibidor foi fixa (0,03M). Um ensaio similar foi feito sem a adição de PpyTI. O ensaio foi realizado em 6 replicatas. A partir da cinética da tripsina nas 2 situações, ausência ou presença de PpyTI, o programa calculou a constante de inibição de PpyTI para tripsina bovina.

5.4 - Estabilidade do PpyTI

5.4.1 - Estabilidade Térmica

Para avaliar a estabilidade do inibidor frente a variações térmicas, alíquotas de PpyTI foram incubadas em diferentes temperaturas (37°C a 100°C) por 30min. Logo após, as alíquotas foram resfriadas rapidamente e a atividade inibitória avaliada através de ensaios como anteriormente descrito.

5.4.2 - Estabilidade a variações de pH

Para avaliar a estabilidade do inibidor a variação de pH, alíquotas de PpyTI foram incubadas em tampões os quais variavam de pH2 a pH10. Para a faixa de pH 2 a 5 foi usado o tampão citrato de sódio 0,1M, para os pHs de 6 a 8 foi usado o tampão fosfato de sódio monobásico 0,1M e para os pHs 9 e 10 foi utilizado o tampão bicarbonato de sódio 0,1M. Todos os tampões tiveram o seu pH ajustados por acréscimo de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. As amostras foram incubadas por 30 min. Logo após, foi avaliado a capacidade inibitória do PpyTI através de ensaio tríptico como anteriormente descrito.

5.4.3 - Estabilidade ao DTT

O PpyTI foi incubado a 37°C com diferentes concentrações de DTT (1mM, 10mM e 100mM) e alíquotas de cada concentração retiradas em diferentes tempos de incubação (15, 30, 60 120 min). A reação foi interrompida pela adição de Iodoacetamida em uma concentração duas vezes maior que a de DTT. Logo após, a capacidade inibitória do PpyTI foi analisada através de ensaio tríptico como anteriormente descrito.

6 - Atividade biológica de PpyTI em larvas de 4º instar de *A. kuehniella*.

Ensaio *in vivo* foram feitos para avaliar o potencial inseticida do PpyTI sobre o desenvolvimento larval de *A. kuehniella*. Para isso, PpyTI liofilizado foi adicionado na dieta artificial em uma proporção de 0,25; 0,5 e 1,0% do peso total da dieta. Uma dieta sem adição de inibidor foi feita como controle do experimento.

Cada grupo continha 40 larva neonatas que estavam divididas em 10 tubos contendo 250mg de dieta homogeneizada. Após 21 dias as larvas foram retiradas da dieta, contadas e pesadas para avaliar o efeito sobre o peso e mortalidade de PpyTI.

A dieta não consumida e as fezes produzidas foram separadas e usadas para a elaboração dos Índices nutricionais. Os índices foram feitos apenas na concentração de 0,25%, por ser a concentração que mais se aproximou da redução de 50% no peso médio larval. Os índices avaliados foram a eficiência da conversão em massa do alimento digerido (ECI), eficiência da conversão em massa do alimento digerido (ECD), digestibilidade aproximada (AD) e o custo

metabólico (CM). Para o cálculo desses índices foram determinados pela seguinte fórmula:

$$ECI(\%): \frac{B}{I} \times 100$$

$$ECD(\%): \frac{B}{I-F} \times 100$$

$$AD(\%): \frac{I-F}{I} \times 100$$

$$CM(\%): 100 - ECD$$

Onde o ganho de peso da larva até o quarto instar é “B”, o alimento ingerido é “I”, o peso das fezes ingeridas é “F” e o alimento assimilado é “I-F”.

7. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas (ANOVA) com o teste de Tukey, sendo que o valor de $P < 0.05$ foi considerado significativo. Para o ensaio de estabilidade ao DDT, cada intervalo de tempo foi analisado separadamente, apresentando seus respectivos controles

8 - Atividade biológica de PpyTI frente as proteases de diferentes insetos-pragas

A atividade inibitória do PpyTI foi testada contra proteases intestinais de 4 espécies de insetos-pragas (*Spodoptera cosmioides*, *S. eridana*, *S. frugiperda* e *Anticarsia gemmatilis*) alimentadas apenas com dieta artificial até o 4º instar. Para a extração das proteases foi feita a dissecação e retirada do intestino médio,

estes foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido, macerados, homogeneizados com tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,6 e centrifugado a 14.000 rpm por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado, e a quantidade de proteína foi quantificada pelo método de Bradford (1976) e armazenado a -20°C.

Um volume variável de PpyTI (0-1.16µg) e um volume fixo de extrato intestinais foram incubados por 10min a 37°C e logo após foi adicionado 200µl de BAPNA. Os ensaios aconteceram como descritos anteriormente. Do valor de todos os tratamentos foi descontado a leitura da solução branco (sem inibidor).

IV – Resultados

1 - Purificação PpyTI

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

O perfil cromatográfico do Extrato Bruto de *P. Pyramidalis* aplicado em coluna Sephadex G-75 apresentou 3 picos definidos. As frações correspondentes a cada um dos picos foram coletadas e tiveram sua atividade inibitória contra tripsina determinada. Desta forma observamos que apenas o pico 2 (S-II) apresentou atividade inibitória (Fig. 1).

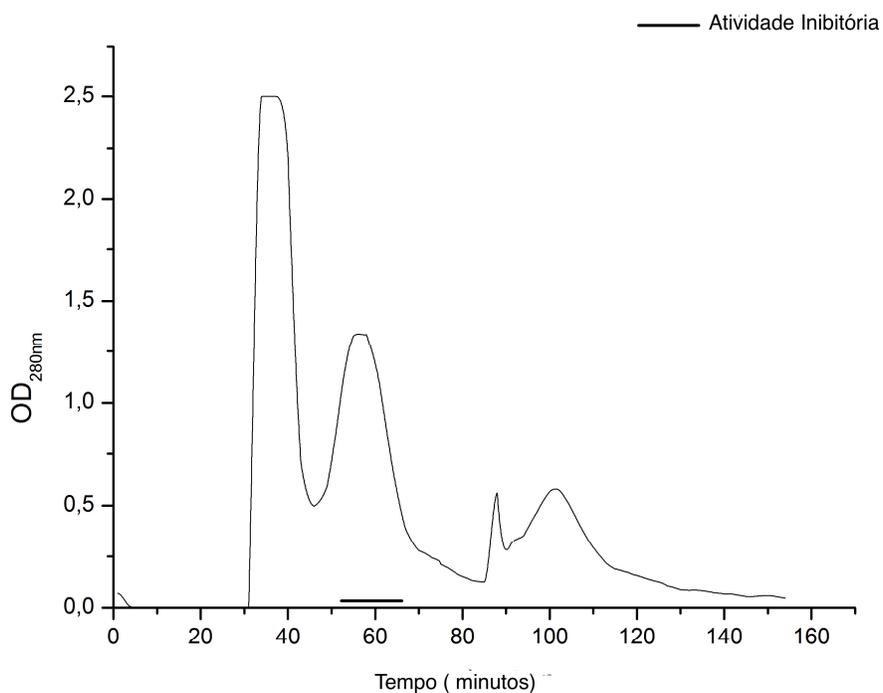


Figura 1: Perfil Cromatográfico da coluna de exclusão molecular Sephadex G75, quando aplicada 300mg de EB equilibrada e eluída tampão fosfato de sódio 0,1M, pH7,6 contendo 0,1M de NaCl fluxo de 0,2 ml/min. A barra(-) indica o pico que possui atividade inibitória.

1.2 - Cromatografia em coluna de hidrofobicidade Phenyl-Sepharose

Após a diálise e liofilização do S-II, uma alíquota foi submetida à cromatografia de hidrofobicidade Phenyl-Sepharose (Figura 2). Os picos 1 e 2 (P-I e P-II) foram eluídos em tampão A, os picos 3 (P-III) e 4 (P-IV) eluídos em 50% e 100% de tampão B, respectivamente; os picos 5 (P-V) e 6 (P-VI) eluídos em 70% do tampão C, sendo que o pico 7 (P-VII) foi eluído com 100% de tampão C. Ensaio *in vitro* revelaram atividade inibitória no pico 4 (P-IV). Este foi então dialisado, liofilizado e armazenado a -20°C.

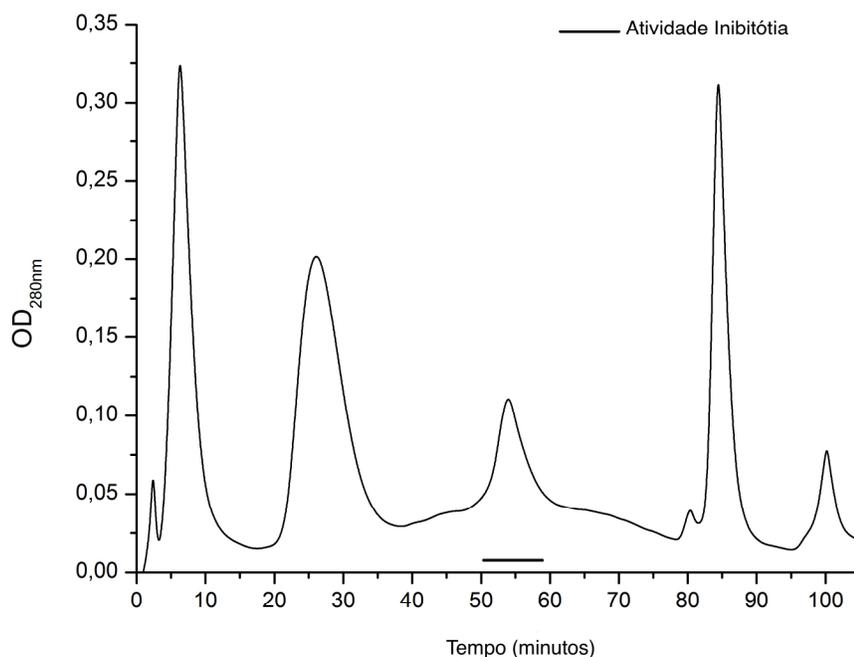


Figura 2: Perfil cromatográfico de PpyTI aplicado em coluna de hidrofobicidade Phenyl Sepharose. A eluição das proteínas aderidas a resina foi feita com gradiente "stepwise" com fluxo de 1,2ml/min. A barra (-) indica a fração que apresentou atividade inibitória.

1.3 - Cromatografia em C-18

O P-IV foi submetido à cromatografia em coluna C-18. O cromatograma revelou a presença de um pico homogêneo eluído com aproximadamente 60% de tampão B.

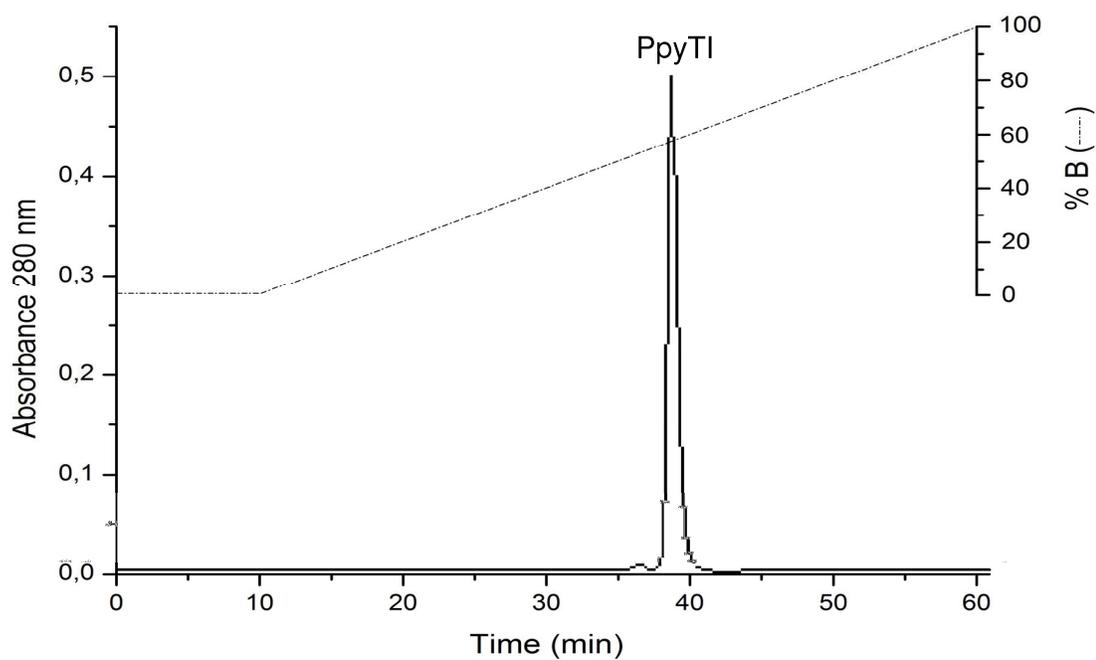


Figura 3: perfil cromatográfico de PpyTI aplicado em coluna C-18 equilibrada com tampão TFA 0,1%.

Fluxo de 1 ml/min.

1.4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

O processo de purificação do inibidor foi acompanhado através de eletroforese SDS-PAGE, como apresentado na figura 5A. O inibidor purificado (linha 3) apresentou uma massa molecular aparente de 20 kDa. Na presença do agente redutor DTT PpyTI também apresentou uma única banda com massa molecular ligeiramente maior (Figura 5A linha 4, Figura 5B).

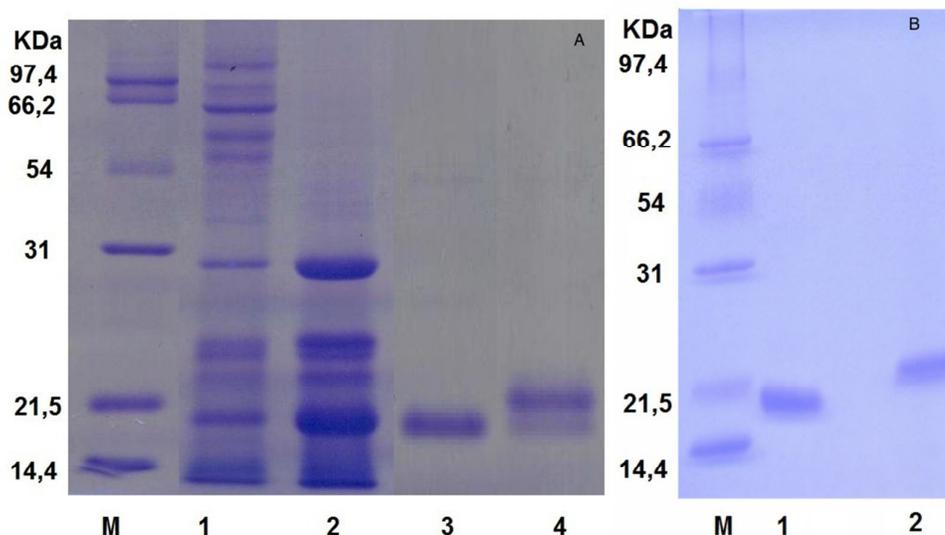


Figura 4: SDS-PAGE 12,5% das frações oriundas da purificação. 4A: (M) marcador de peso molecular; (1) extrato bruto; (2) PII da Sephadex G-75; (3) P-IV da Phenyl Sepharose; (4) P-IV da Phenyl Sepharose com 1% de DTT 0,1M. 4B: (M) marcador de peso molecular; (1) PpyTI da C1-8; (2) PpyTI da C-18 com 1% de DTT 0,1M

2 - Determinação da massa acurada por espectrometria MALDI-TOF

Uma alíquota purificada do inibidor foi submetida a uma análise por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF. O padrão isotópico foi obtido, sendo assim foi possível determinar a massa intacta do inibidor. A massa intacta de PpyTI obtida foi de 19.042 Da.

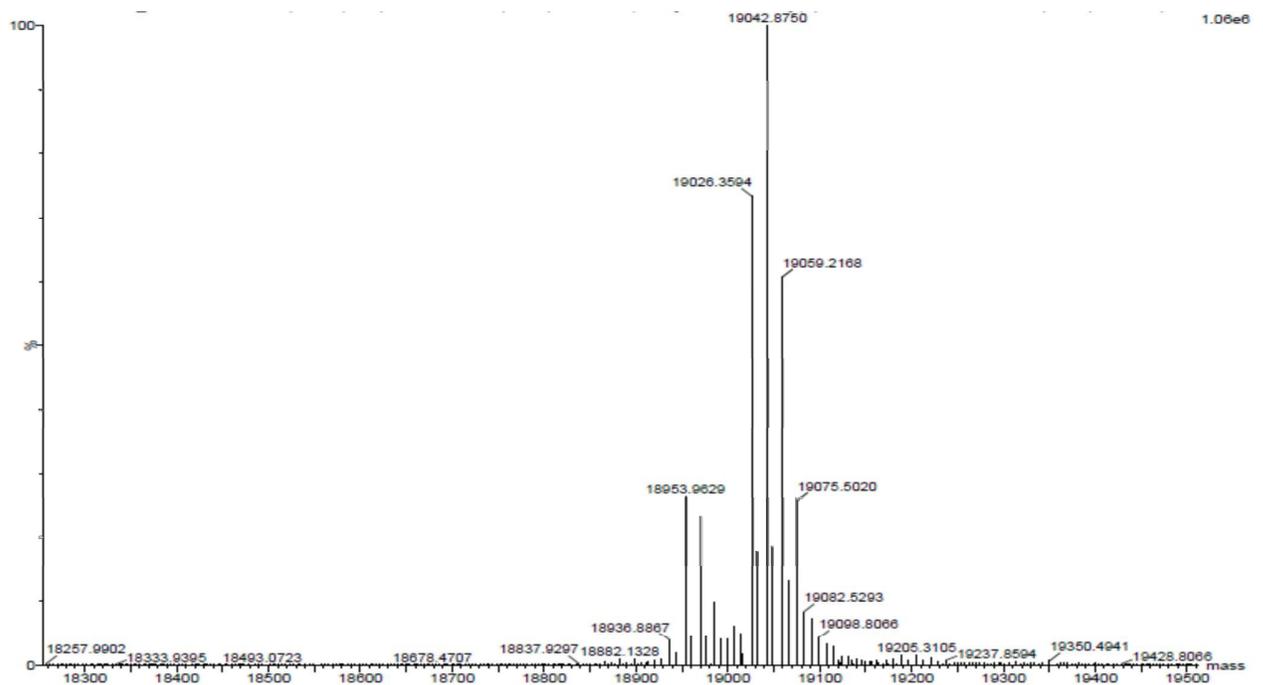
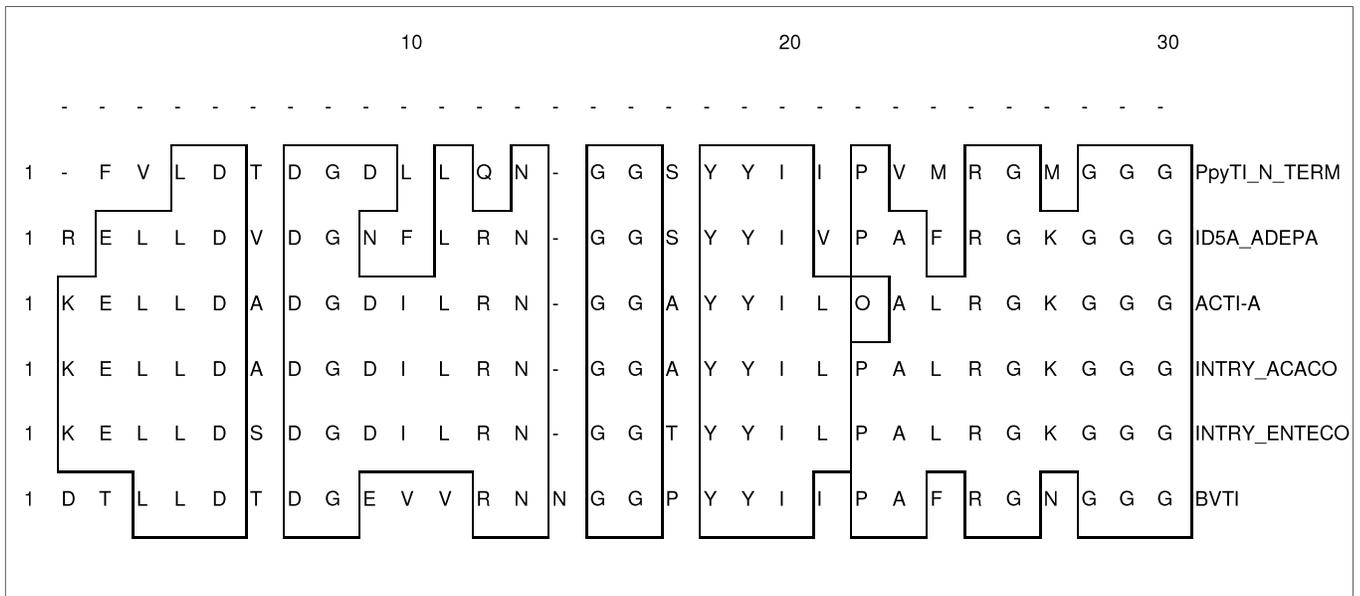


Figura 5: Perfil do padrão isotópico de PpyTI obtido por espectrometria de massa MALDI-TOF

3 - Determinação da sequência N-terminal

A tabela 3 ilustra o alinhamento da sequência N-terminal de PpyTI. Obtivemos a sequência dos primeiros 30 resíduos de aminoácidos, que foram utilizados no estudo de homologia. A pesquisa foi realizada no banco de dados NCBI-BLAST e revelou homologia entre PpyTI e outros inibidores da família Kunitz.

Tabela 3: Alinhamento da sequência N-terminal com alta identidade com PpyTI. Inibidores do tipo Kunitz de *Adenantha pavonia* L.(ID5A_ADEPA), *Acacia confusa* banda A(ACTI-A), *A. confusa* (INTRY_ACACO), *Enterolobium contortisiliquum* (INTRY_ENTCO) e *Bauhinia variegata* (BVTI). O alinhamento múltiplo foi realizado utilizando o programa CLUSTAL W 2.0.12.



4 - Caracterização do inibidor PpyTI

4.1 - Estequiometria de inibição

A estequiometria de inibição do PpyTI sobre a tripsina bovina foi determinada através de ensaios bioquímicos. A inibição da tripsina seguiu uma tendência linear em baixas concentrações de inibidor. A partir da relação 0,5:1 houve uma mudança no comportamento da inibição, sendo que a inibição completa foi obtida na relação entre inibidor: enzima de 1:1 (Figura 6). A partir daí a inibição da tripsina por PpyTI foi total.

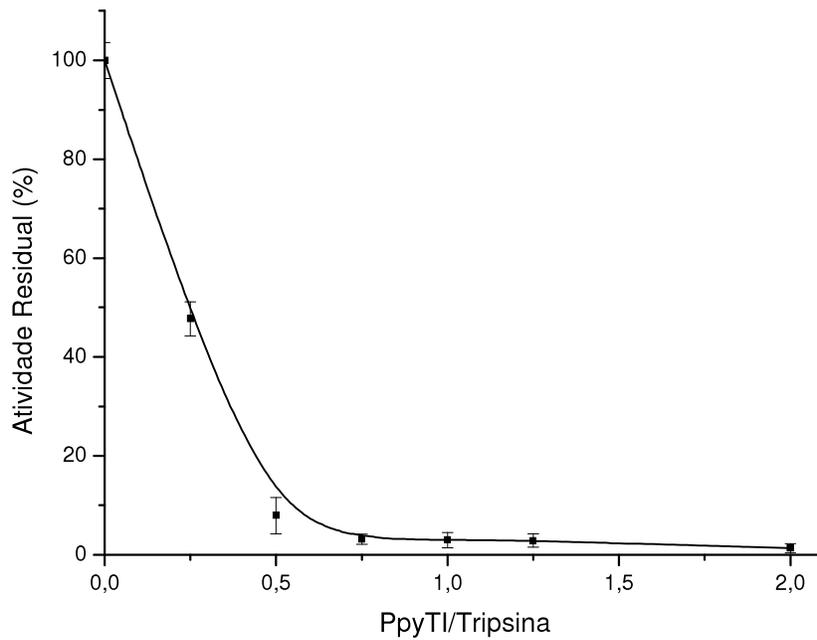


Figura 6: Curva de inibição da tripsina bovina por PpyTI. Tripsina foi pré-incubada (10 min, 37 °C, Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0) com concentrações crescentes de inibidor. A atividade residual da tripsina foi determinada com BAPNA 1 mM.

4.2 - Determinação da constante de inibição (K_i)

Constante de inibição (K_i) de PpyTI para tripsina bovina foi determinada com o auxílio do software Sigma plot. A análise dos dados realizada pelo software determinou que a constante de inibição de PpyTI para tripsina bovina é de 1,2 nM (Figura 7).

Michaelis-Menten

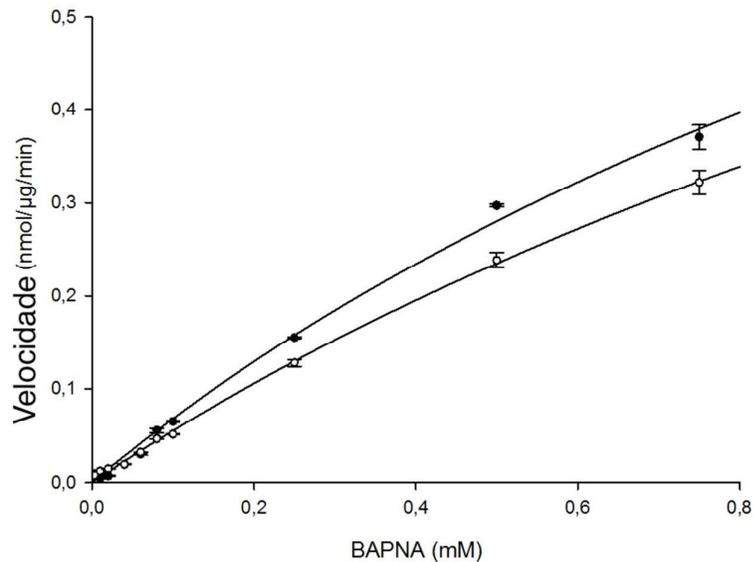


Figura 7: Análise cinética da atividade inibitória de PpyTI pelo programa SigmaPlot para a determinação da constante de inibição (K_i) frente a 2 diferentes concentrações de BAPNA. As concentrações finais de substrato foram de 1 mM (O) e 3 mM (●). O inverso da velocidade foi plotado contra diferentes concentrações de inibidor.

4.3 – Caracterização físico-química de PpyTI

4.3.1 - Estabilidade ao DTT

A incubação do PpyTI com o agente redutor DTT afetou sua atividade inibitória. Após 30 minutos de incubação com 1mM de DTT, uma redução de 20% na atividade inibitória foi observada. Entretanto, notamos que a atividade inibitória se manteve constante com o aumento do tempo (Figura 8).

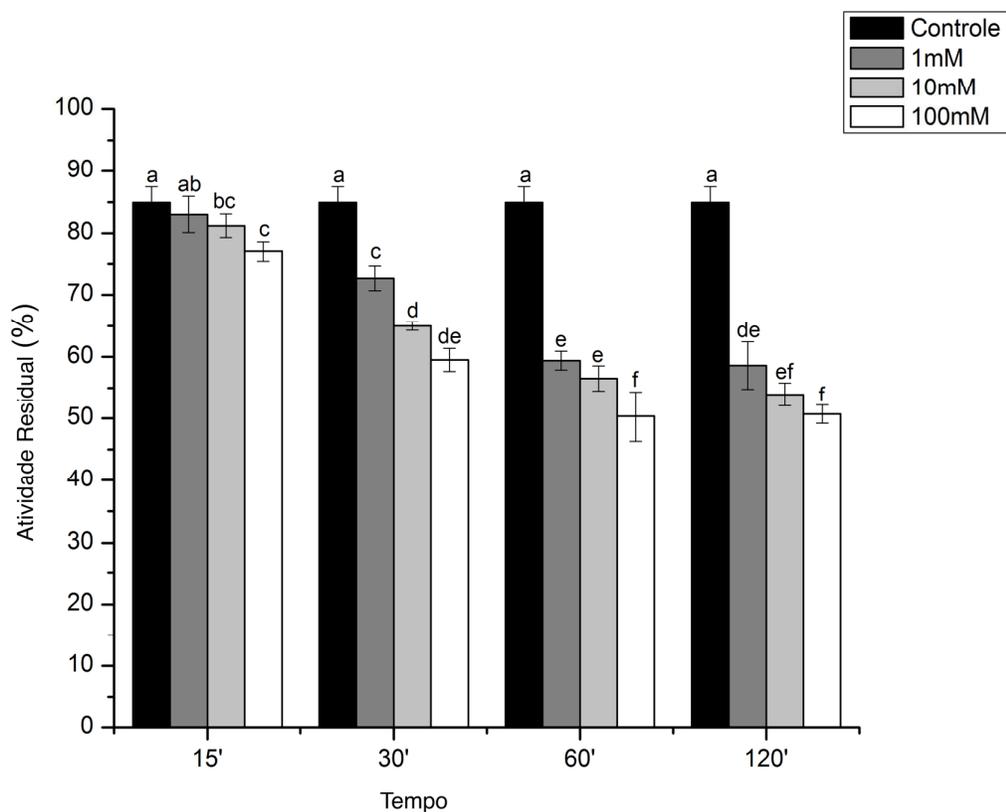


Figura 8: Efeito do DTT sobre a estabilidade de PpyTI. Diferentes concentrações foram incubadas com Ppytl em diferentes intervalos de tempo.

4.3.2 - Estabilidade Térmica

O PpyTI mostrou uma considerável termoestabilidade. A partir de 80°C uma diminuição de 20% na atividade inibitória foi observada. Em temperaturas superiores, atividade inibitória decaiu bruscamente, com uma atividade residual de 30% a 90 °C e de apenas 2% a 100 °C (Figura 9).

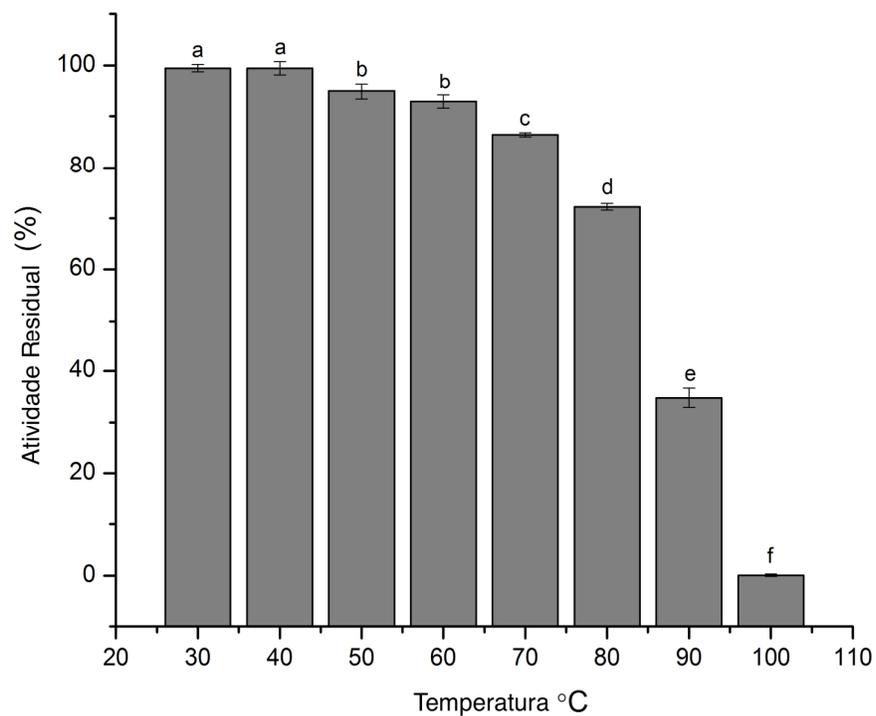


Figura 9: Efeito da temperatura sobre a estabilidade do PpyTI. O inibidor foi incubado por 30 minutos em cada temperatura.

4.3.3 - Estabilidade a variação de pH

A variação do pH não influenciou a atividade inibitória do PpyTI, com exceção do pH 2, onde uma redução significativa foi observada (Figura 10).

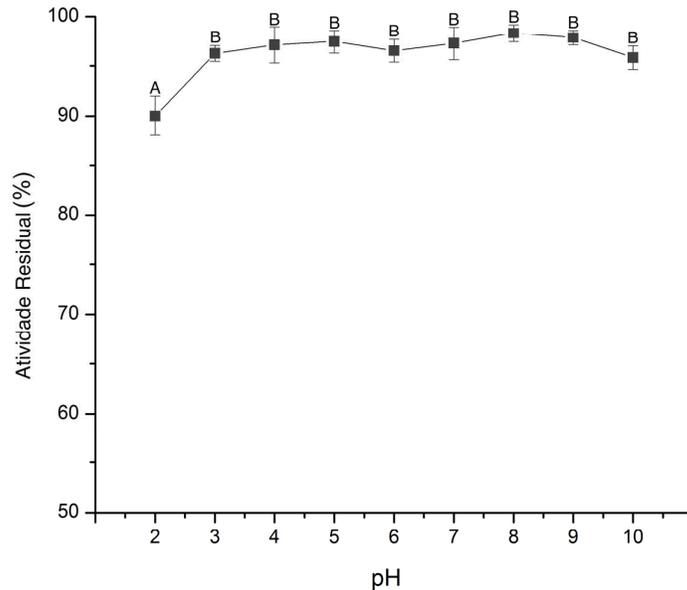


Figura 10: Efeito do pH sobre a estabilidade do PpyTI incubado em diferentes pHs por 30 minutos.

5 - Atividade biológica de PpyTI em larvas de *A. kuehniella*

5.1 – Peso larval

O PpyTI apresentou uma redução dose-dependente sobre o ganho de peso larval de *A. kuehniella*. A menor concentração de inibidor adicionado em dieta (0,25% p/p) provocou uma redução superior a 50% no peso médio larval (Figura 11). Como a menor concentração de inibidor utilizada (0,25%) provocou uma redução de peso superior a 50%, utilizamos as larvas provenientes deste tratamento para a determinação dos parâmetros nutricionais e bioquímicos.

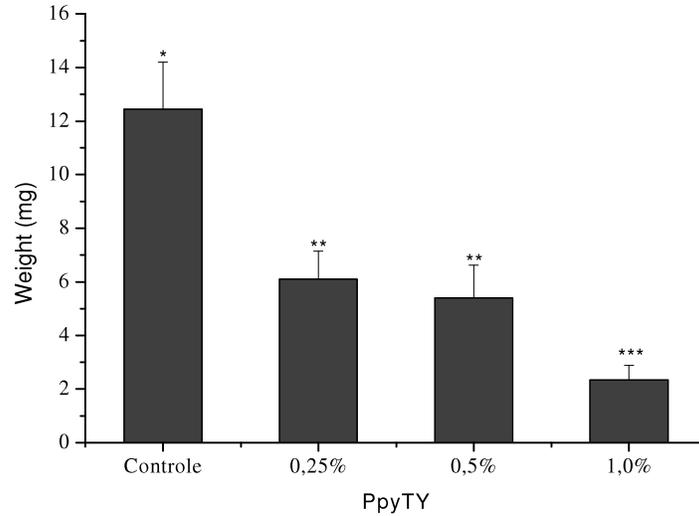


Figura 11: Média do peso das larvas de 4º instar quando incorporadas em dietas contendo PpyTI.

5.2 – Sobrevivência larval

O inibidor apresentou uma redução significativa da sobrevivência larval quando incorporado a 1%(Figura 12).

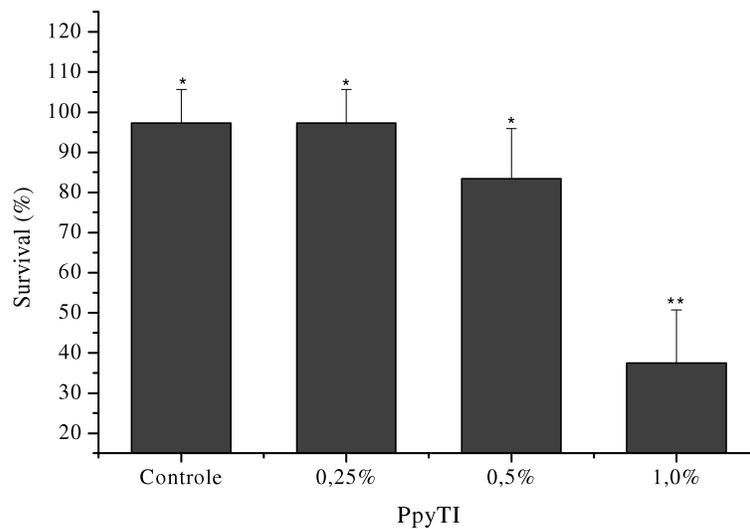


Figura 12: Média do sobrevivência por tubo das larvas de 4º instar quando incorporadas em dietas contendo PpyTI.

5.3 – Índices nutricionais

Uma diminuição de 74% na produção das fezes e de 54% no consumo do alimento foi observado para o grupo alimentado com 0,25% de PpyTI (tabela 4). A análise dos índices nutricionais mostrou que PpyTI afetou negativamente 3 dos 4 parâmetros analisados. Pode-se observar um aumento na digestibilidade aparente (AD) porém a eficiência de conversão do alimento digerido (ECD) diminuiu aproximadamente 50% o que levou a um aumento do custo metabólico(CM).

Tabela 4: Tabela de índice nutricional de *A. kuehniella*

	ECl(%)	ECD(%)	AD(%)	CM
Controle	32,44± 2,7 a	38,02 ±3,1 a	85,37±3,4 a	61,98 ±3,1 a
0,25%	27,79± 5,0 a	19,06± 2,1 b	95,12±1,6 b	70,94± 1,8 b

6 - Atividade biológica de PpyTI em larvas de *A.kuehniella*

6.1 – Atividade triptica de larvas de *A.kuehniella*

Larvas de 4° ínstar de *A. kuehniella* alimentadas com PpyTI 0,25% apresentaram uma diminuição da atividade das enzimas tripsinas de 50% quando comparadas com o grupo controle (figura 13). A atividade enzimática diminuiu

proporcionalmente com a adição de PpyTI (fig. 14) quando realizamos uma curva de inibição.

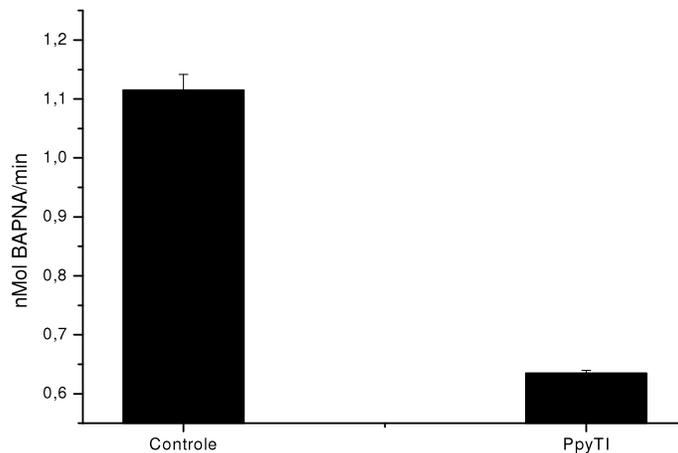


Figura 13: Atividade trípica das enzimas extraídas de intestinos das larvas de *A. kuehniella* incorporadas em dieta controle ou contendo 0,25% de PpyTI.

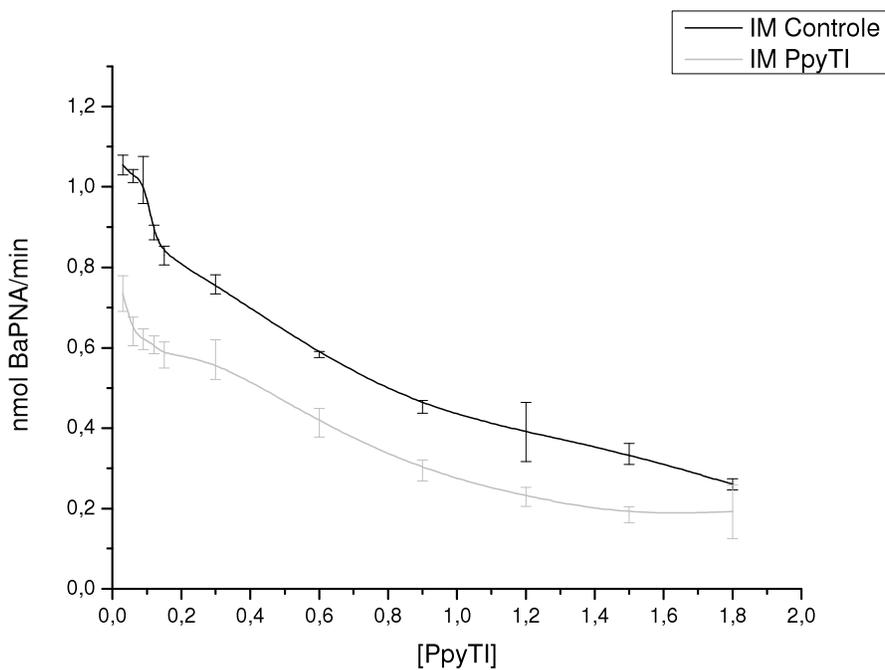


Figura 14: Atividade Anti-trípica das enzimas extraídas de intestinos das larvas de *A. kuehniella* incorporadas em dieta controle ou contendo 0,25% de PpyTI.

6.3 – Atividade quimotríptica de larvas de *A. kuehniella*

A atividade das quimotripsinas do grupo alimentado com PpyTI reduziu em 10% (Figura 15). Em relação a sensibilidade a inibição das quimotripsinas, as enzimas de ambos os grupos apresentaram redução na atividade enzimática na mesma proporção.

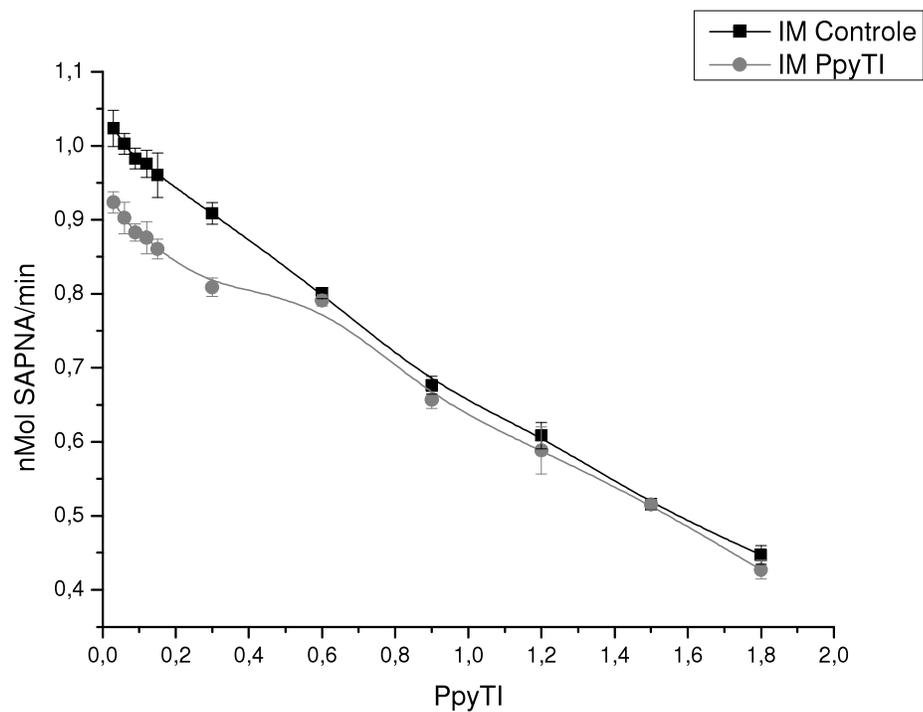


Figura 15: Atividade Anti-quimotríptica das enzimas extraídas de intestinos das larvas de *A. kuehniella* incorporadas em dieta controle ou contendo 0,25% de PpyTI.

7 - Desenvolvimento pupal de *A. kuehniella* em dieta contendo PpyTI

Larvas alimentadas com PpyTI 0,25% apresentaram um comprometimento do desenvolvimento larval. No grupo controle, 95,5% das larvas completaram o estágio larval com 30 dias, sendo que no mesmo intervalo de tempo apenas 28,5% das larvas alimentadas com PpyTI tornaram-se pupas. Mesmo com o prolongamento do estágio larval, uma fração das larvas alimentadas com o inibidor não empuparam (Tabela 5). No entanto, as pupas provenientes de ambos os tratamentos não apresentaram diferença de peso significativa (Tabela 6).

Tabela 5: Tabela do efeito de PpyTI no empupamento de *A. kuehniella*

Pupas	30 dias	35 dias	55 dias
Controle (n=45)	95,5% ^a	95,5% ^a	95,5% ^a
PpyTI 0,25% (n=45)	28,5% ^b	71,5% ^b	71,5% ^b

Tabela 6: Tabela do peso pupa de *A. kuehniella*

	Peso médio pupal (mg)
Controle	25,26 ± 3,5 ^a
PpyTI 0,25%	24,3 ± 4,7 ^a

8 - Estudo da atividade biológica de PpyTI sobre as proteases de diferentes insetos-praga

Um screening foi realizado para avaliar o efeito de PpyTI sobre a inibição das enzimas digestivas de diferentes insetos-praga. Diferentes curvas de inibição foram obtidas e agrupadas na Figura 12. Uma inibição máxima de 50% foi observada para a tripsinas de *Spodoptera eridana* e de 30% em *S. frugiperda*. *Anticarcia gemmatilis* e *S. cosmioides* também tiveram as suas proteases inibidas em aproximadamente 40% (Figura 16).

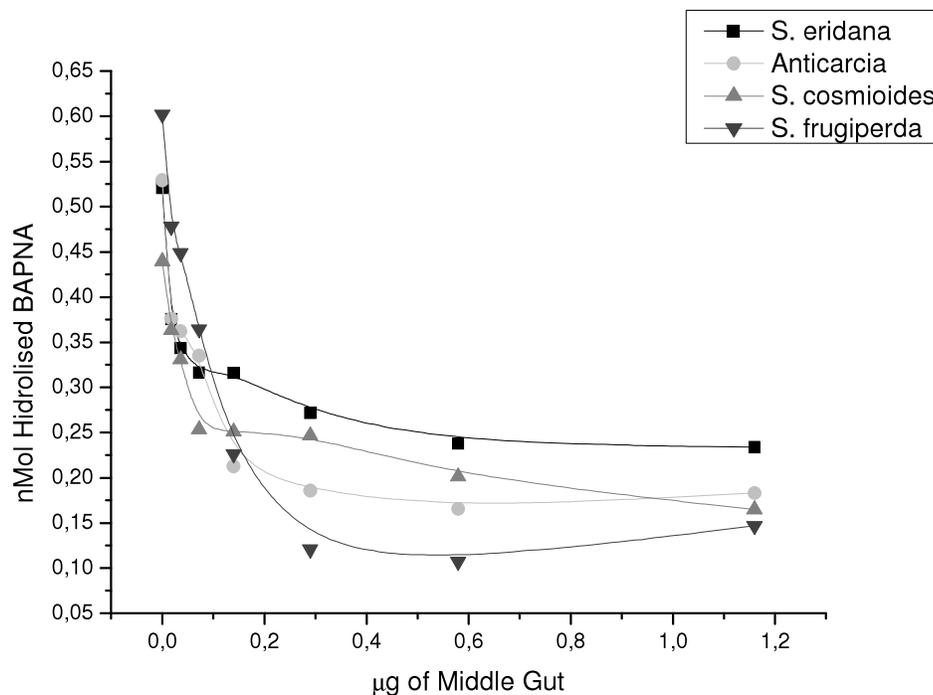


Figura 16: Inibição da atividade proteolítica das proteases intestinais de larvas-pragas no 4º instar. BAPNA foi usado como o substrato.

V – DISCUSSÃO

A família Fabaceae é amplamente estudada por conter grandes quantidades de proteínas nas sementes de seus representantes. Um grupo mais específico destas proteínas possui a capacidade inibir enzimas proteolíticas, sendo conhecidos por inibidores de proteases. Estudos sugerem que inibidores de protease possuem potencial biotecnológico para o controle de pragas agrícolas. Porém, estudos aprofundados sobre as propriedades químicas e mecanismos de ação dos inibidores sobre os insetos são necessários para avaliar sua viabilidade (MACEDO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A metodologia utilizada para extrair e purificar o inibidor de *P. pyramidalis* foi baseada em estudos semelhantes anteriormente desenvolvidos. Inicialmente, as sementes foram descascadas e pulverizadas e a farinha obtida submetida a um processo de delipidação, procedimento essencial para uma boa purificação pois elimina possíveis problemas nas etapas posteriores (BOYES *et al.*, 2008; RABILLOUD, 1996). As proteínas foram extraídas em tampão fosfato, dialisadas e liofilizadas para a obtenção do Extrato Bruto, utilizado no processo de purificação.

A primeira etapa de purificação utilizou cromatografia de exclusão molecular (Figura 1), sendo que apenas o segundo pico (S-II) apresentou atividade inibitória, sendo utilizado na etapa seguinte. O inibidor PpyTI foi purificado em coluna de hidrobicidade Phenyl-Sepharose. Nesta etapa de purificação obtivemos 7 picos, sendo que apenas o pico 4 (P-IV) apresentou atividade inibitória, sendo eluído em 100% de tampão B.

A eletroforese SDS-PAGE 12,5% permitiu acompanhar todos os passos de purificação do inibidor (Figura 5). A análise do EB e dos passos de purificação nos

permitem verificar que um alto grau de pureza foi alcançado. Com apenas 2 passos de purificação obtivemos PpyTI purificado, como ficou comprovado em gel pela presença de uma única banda polipeptídica com massa aparente de 20kDa (Fig 4), mesmo quando a amostra foi reduzida com 100mM de DTT, demonstrando que PpyTI é constituído por uma única cadeia polipeptídica. No entanto, um aumento de massa aparente foi observado quando a amostra foi tratada com DTT. Sabe-se que DTT provoca o completo desenovelamento da proteína, dificultando assim a permeação da amostra ao longo dos poros do gel de eletroforese. A dificuldade na corrida resulta neste aumento aparente de massa molecular. Em relação a massa determinada em SDS-PAGE, características similares de massa e estrutura são reportadas a outros inibidores pertencentes à subfamília Caesalpinioideae (BARIANI *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2005; KOYAMA *et al.*, 1986).

Apesar da aparente homogeneidade molecular observada no último passo de purificação e através da eletroforese obtida, realizamos uma corrida em sistema de HPLC com o intuito de investigar a presença de proteínas de diferentes graus de hidrofobicidade, o que muitas vezes é característico de inibidores que apresentam isoformas, como já descrito anteriormente (DE OLIVEIRA, 2011). A presença de isoformas é uma característica comumente observada para esta família de proteínas (LOPES *et al.*, 2009; MACEDO *et al.*, 2007c)

A aplicação da espectrometria de massas em biomoléculas tem se revelado uma técnica de grande importância para a análise de proteínas. A técnica de espectrometria de massas Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI-TOF) foi utilizado para determinar a massa acurada de PpyTI. A amostra

ionizada apresentou um padrão isotópico típico, com a presença de populações contendo diferentes cargas de ionização. Assim sendo, observamos um pico de massa exata de 19.042 Da (Figura 6). A análise do espectro de massas fornece uma grande quantidade de informações sobre proteínas em um curto período de tempo, além de necessitar de pequenas concentrações de amostra (DA SILVA-LOPEZ *et al.*, 2004). Em relação a massa obtida, esta encontra-se dentro dos parâmetros reportados para inibidores vegetais.

O sequenciamento N-terminal revelou homologia entre PpyTI e outros inibidores tipo Kunitz. Uma alta similaridade além da presença de substituições altamente conservadas foram notadas (Tabela 3). Os inibidores de *Acacia confusa*, *Enterolobium contortisiliquum*, *Adenanthera pavonina* e *Bauhinia variegata* foram aqueles que apresentaram a maior similaridade. A sequência amino terminal juntamente com os resultados anteriormente descritos permitem sugerir que PpyTI pertence à família Kunitz de inibidores de serinoprotease.

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

possuem um único sítio reativo específico para tripsina (MACEDO *et al.*, 2007c; OLIVEIRA, 2011).

Uma vez purificado, PpyTI foi submetido a ensaios de caracterização. A estequiometria de inibição do tipo 1:1 foi determinada, apontando que PpyTI possui um único sítio reativo, capaz de se complexar com uma molécula de enzima. Este resultado é comumente reportado para inibidores do tipo Kunitz (RICHARDSON, 1991), corroborando nossos resultados relacionados ao estudo de homologia sequencial.

Usando o programa SigmaPlot calculamos o K_i do PpyTI para tripsina bovina. O valor encontrado foi de $1,2 \times 10^{-9}$ M, o que demonstra uma grande afinidade do PpyTI pela enzima (Figura 7). Outro resultado obtido pelo programa foi que a inibição de PpyTI é do tipo competitiva. Outros inibidores Kunitz apresentaram valores de K_i similares (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006; MACEDO *et al.*, 2007b)

Ensaio de estabilidade foram feitos em diferentes faixas de pH (2-10), temperatura (37-100 °C) e agente redutor DTT. O PpyTI mostrou-se estável em todas as faixas de pH, com exceção de pH 2 (Figura 11) e a temperaturas de até 80 °C (Figura 10), características comumente descritas para inibidores Kunitz (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006; MACEDO *et al.*, 2000b; OLIVA *et al.*, 2000) Porém, PpyTI foi sensível a presença do agente redutor DTT (Figura 8), outra característica comum em alguns de inibidores do tipo Kunitz (GARCIA *et al.*, 2004; MACEDO *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2013b).

As enzimas extraídas do intestino de *A. kuehniella* que se alimentaram com dieta e controle e contendo inibidor, tiveram a sua atividade proteolítica

medida usando os substratos BAPNA e SAPNA (Figura 15, 16). A atividade enzimática no grupo alimentado com PpyTI diminuiu possivelmente pela formação de complexos enzima: inibidor (EHRMANN *et al.*, 2004). Adicionalmente, as enzimas de ambos os grupos quando incubadas com o PpyTI foram inibidas na mesma proporção, sugerindo que nenhuma nova enzima foi sintetizada em resposta ao inibidor em dieta artificial. Demonstramos assim que *A. kuehniella* não adapta-se a PpyTI. A adaptação de insetos a inibidores de protease pode ocorrer (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013; PAULILLO *et al.*, 2000). Assim sendo, é de grande importância um estudo prévio do efeito de um inibidor sobre uma determinada praga.

Inibidores de tripsina purificados da subfamília Cesalpinoideae já foram estudados, dentre eles CbTI (Inibidor de tripsina de *Caesalpinia bonduc*), que apresentou atividade inseticida sobre *Spodoptera litura* (Lepidoptera), afetando o desenvolvimento larval deste inseto (BASKAR *et al.*, 2012). A concentração de PpyTI usada em nosso estudo (0,25%) corresponde aos níveis que estas proteínas estão presentes em sementes de leguminosas e está dentro dos valores utilizados em outros estudos (DA SILVEIRA RAMOS *et al.*, 2009; JONGSMA *et al.*, 1997), reinterando desta maneira seu potencial inseticida, uma vez que estes níveis são facilmente expressos.

Analisando os índices nutricionais, podemos verificar que o PpyTI apresentou um efeito antinutricional para o inseto, uma vez que a diminuição na ingestão de dieta de 54% foi observada. Esta redução levou a uma redução na produção de fezes e, com base nos Índices nutricionais elaborados, podemos inferir que PpyTI diminuiu a eficiência da digestão e assimilação de nutrientes, e como consequência da alteração destes parâmetros observamos o aumento do

custo metabólico larval (tabela 3). As larvas de *A. kuehniella* que ingeriram cronicamente 0,5% de AcKI (Inibidor de Tripsina de *Acacia polyphylla*) apresentaram o respostas similares dos parâmetros nutricionais (MACHADO *et al.*, 2013a).

Para avaliar a atividade do PpyTI *in vivo*, foi feita a incorporação do inibidor em dieta artificial (0-1%) e oferecido a larvas neonatas de *A. kuehniella*. Ao final do 4º ínstar, observamos um efeito negativo sobre o ganho de peso larval bem como sobre a redução na taxa de sobrevivência. Estes efeitos exercidos durante o estágio larval comprometeram o processo de empupamento. No entanto, não notamos uma diferença de peso entre as pupas de ambos os tratamentos. Uma possível explicação para este resultado seria que, uma vez que lepidópteros adultos são áfidos, ou seja, não se alimentam na fase adulta, é necessário que as larvas acumulem todos os nutrientes e energia necessários para os processos de empupamento, vitelogênese e sobrevivência na fase adulta (OLIVEIRA *et al.*, 2010). Possivelmente este seja o motivo pelo qual o estágio larval no grupo alimentado com PpyTI seja estendido. Outros trabalhos com insetos da mesma ordem já mostravam essa característica (PAULILLO *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2009).

Ensaio enzimáticos *in vitro* utilizando intestino de vários outros insetos pragas da ordem lepidoptera foram realizados (Figura 17) e com isso foi possível observar que a atividade inibitória de PpyTI em torno de 50% em todas as espécies, se mostrando mais eficaz contra *S. frugiperda*. Assim demonstramos o potencial desse inibidor para diferentes insetos pragas.

Baseado nos resultados acerca da purificação e caracterização de PpyTI

associados aos efeitos inseticidas descritos neste trabalho, mostramos o potencial de PpyTI como uma ferramenta de investigação da atividade inseticida.

VI - CONCLUSÕES

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

- Com base em características físico-químicas podemos classificá-lo como pertencente à família Kunitz de inibidores de serinoprotease;
- PpyTI quando incorporado em dietas artificiais reduziu significativamente a sobrevivência e o peso médio das larvas de *A. kuehniella*;

Alterou o desenvolvimento de *A. kuehniella*, aumentando o tempo larval e diminuindo o número de pupas;

Baseado nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, demonstramos que PpyTI apresenta potencial para o controle de *A. kuehniella*.

VII – Referências Bibliográficas

BARIANI, A.; GONÇALVES, J. F. D. C.; CHEVREUIL, L. R.; CAVALLAZZI, J. R. P.; SOUZA, L. A. G. D.; BENTES, J. L. D. S.; PANDO, S. C. Partial purification of trypsin inhibitors from *Caesalpinia ferrea* and *Swartzia polyphylla* seeds and effect of protein extracts on pathogenic fungi. **Summa Phytopathologica**, v. 38, n. 2, p. 131-138, 2012.

BASKAR, K.; MAHESWARAN, R.; IGNACIMUTHU, S. Bioefficacy of *Caesalpinia bonduc* (L.) Roxb. against *Spodoptera litura* Fab.(Lepidoptera: Noctuidae). **Archives of Phytopathology and Plant Protection**, v. 45, n. 10, p. 1127-1137, 2012.

BERNAYS, E. A.; CHAPMAN, R. F. **Host-Plant Selection by Phytophagous Insects**. Springer, 1994. ISBN 9780412031311.

BHATTACHARYYA, A.; BABU, C. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: insight into structural and antimalarial features. **Phytochemistry**, v. 70, n. 6, p. 703-12, Apr 2009a.

BHATTACHARYYA, A.; BABU, C. R. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: Insight

into structural and antimalarial features. **Phytochemistry**, v. 70, n. 6, p. 703-712, 2009b.

BHATTACHARYYA, A.; MAZUMDAR, S.; LEIGHTON, S. M.; BABU, C. R. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization, and kinetic properties. **Phytochemistry**, v. 67, n. 3, p. 232-241, 2006.

BHATTACHARYYA, A.; RAI, S.; BABU, C. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Caesalpinia bonduc* seeds: Isolation, partial characterization and insecticidal properties. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 169-177, 2007.

BIRK, Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. **International Journal of Peptide and Protein Research**, v. 25, n. 2, p. 113-131, 1985.

BIRK, Y. **Plant protease inhibitors : significance in nutrition, plant protection, cancer prevention, and genetic engineering**. Berlin ; New York: Springer, 2003. ISBN 3540001182 (alk. paper).

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect

pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 7, p. 625-638, 1997.

BOYES, B. E.; MARTOSELLA, J. D. **Methods and system for protein separation**: Google Patents 2008.

BROADWAY, R. M. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, n. 9, p. 855-874, 1997.

CHRISTELLER, J. T.; LAING, W. A.; MARKWICK, N. P.; BURGESS, E. P. J. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: Dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 7, p. 735-746, 1992.

CRAIK, C. S.; LAUB, O.; BELL, G. I.; SPRANG, S.; FLETTERICK, R.; RUTTER, W. J. THE RELATIONSHIP OF GENE STRUCTURE TO PROTEIN STRUCTURE. In: BERT, O. M. (Ed.). **Gene Regulation**: Academic Press, 1982. p.35-54. ISBN 978-0-12-525960-6.

DA SILVA-LOPEZ, R. E.; GIOVANNI-DE-SIMONE, S. Leishmania (Leishmania) amazonensis: purification and characterization of a promastigote serine protease. **Experimental Parasitology**, v. 107, n. 3-4, p. 173-182, 2004.

DA SILVEIRA RAMOS, V.; FREIRE, M. G. M.; PARRA, J. R. P.; MACEDO, M. L. R. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 152, n. 2, p. 255-261, 2009.

DE LEO, F.; GALLERANI, R. The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis* larvae fed on transgenic plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 5, p. 489-496, 2002.

DE OLIVEIRA, C. F. R. Aspectos funcionais e estruturais do inibidor de tripsina de *Entada acaciifolia*. 2011.

DE OLIVEIRA, C. F. R.; DE PAULA SOUZA, T.; PARRA, J. R. P.; MARANGONI, S.; DE CASTRO SILVA-FILHO, M.; MACEDO, M. L. R. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 165, n. 1, p. 19-25, 2013.

DESIKACHAR, H. S. R.; DE, S. S. Role of Inhibitors in Soybean. **Science**, v. 106, n. 2757, p. 421-422, 1947.

EHRMANN, M.; CLAUSEN, T. Proteolysis as a regulatory mechanism. **Annu. Rev. Genet.**, v. 38, p. 709-724, 2004.

FAYARD, B.; BIANCHI, F.; DEY, J.; MORENO, E.; DJAFFER, S.; HYNES, N. E.; MONARD, D. The serine protease inhibitor protease nexin-1 controls mammary cancer metastasis through LRP-1-mediated MMP-9 expression. **Cancer research**, v. 69, n. 14, p. 5690-5698, 2009.

FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 2, p. 155-161, 2004.

FUJIHARA, R. T. **Chave pictórica de identificação de famílias de insetos-praga agrícolas**. 2008. Universidade Estadual Paulista

GALLO, D. G. **Entomologia Agrícola**. FEALQ, 2002. ISBN 9788571330115.

GARCÍA OLMEDO, F.; SALCEDO DURAN, G.; SÁNCHEZ-MONGE LAGUNA DE RINS, R.; GÓMEZ, L.; ROYO, J.; CARBONERO ZALDUEGUI, P. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and alpha-amylases. 1987.

GARCIA, V. A.; FREIRE, M. D. G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. **The Protein Journal**, v. 23, n. 5, p. 343-350, 2004.

GATEHOUSE, A. R.; DAVISON, G.; NEWELL, C.; MERRYWEATHER, A.; HAMILTON, W. O.; BURGESS, E. J.; GILBERT, R. C.; GATEHOUSE, J. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*: growth room trials. **Molecular Breeding**, v. 3, n. 1, p. 49-63, 1997/02/01 1997.

GILLOTT, C. **Entomology**. Springer, 2005. ISBN 9781402031823.

GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; DESHPANDE, V. V.; SAINANI, M. N.; GUPTA, V. S.; RANJEKAR, P. K. Chickpea Defensive Proteinase Inhibitors Can Be Inactivated by Podborer Gut Proteinases. **Plant Physiology**, v. 116, n. 1, p. 393-401, January 1, 1998 1998.

GOMES, C. E. M.; BARBOSA, A. E. A. D.; MACEDO, L. L. P.; PITANGA, J. C. M.; MOURA, F. T.; OLIVEIRA, A. S.; MOURA, R. M.; QUEIROZ, A. F. S.; MACEDO, F. P.; ANDRADE, L. B. S.; VIDAL, M. S.; SALES, M. P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil)

and *Ceratitis capitata* (fruit fly). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 12, p. 1095-1102, 2005.

GONZÁLEZ-RÁBADE, N.; BADILLO-CORONA, J. A.; ARANDA-BARRADAS, J. S.; OLIVER-SALVADOR, M. D. C. Production of plant proteases in vivo and in vitro — A review. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 983-996, 2011.

HILDER, V. A.; BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance – a critical review. **Crop Protection**, v. 18, n. 3, p. 177-191, 1999.

INANAGA, H.; KOBAYASI, D.; KOUZUMA, Y.; AOKI-YASUNAGA, C.; IIYAMA, K.; KIMURA, M. Protein Engineering of Novel Proteinase Inhibitors and Their Effects on the Growth of *Spodoptera exigua* Larvae. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, n. 10, p. 2259-2264, 2001.

JARDINE, D. K.; TYSSSEN, D. P.; BIRCH, C. J. Effect of protease inhibitors on HIV-1 maturation and infectivity. **Antiviral Research**, v. 45, n. 1, p. 59-68, 2000.

JOHNSTON, K. A.; LEE, M. J.; BROUGH, C.; HILDER, V. A.; GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Protease activities in the larval midgut of *Heliothis virescens*: Evidence for trypsin and chymotrypsin-like enzymes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 25, n. 3, p. 375-383, 1995.

JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, n. 10, p. 885-895, 1997.

JUNIOR, M. E. Controle biológico de insetos pragas. **SEMINÁRIO MOSAICO AMBIENTAL**, n. 1, 2011.

KOYAMA, S.; DAIYASU, H.; TAKEMOTO, H.; SABURO, H.; KOBAYASHI, Y.; KYOGOKU, Y.; IKENAKA, T. Structure of a sugar chain of a protease inhibitor isolated from barbados pride (*Caesalpinia pulcherrima* Sw.) seeds. **Journal of biochemistry**, v. 100, n. 1, p. 1-10, 1986.

KRAUT, J. Serine Proteases: Structure and Mechanism of Catalysis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 331-358, 1977/06/01 1977.

LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 5-6, 2002.

LECAILLE, F.; KALETA, J.; BRÖMME, D. Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: □ Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 12, p. 4459-4488, 2002/12/01 2002.

LEWIS, G. P. **Caesalpinia : a revision of the Poincianella-Erythrostemon group**. [Richmond, England]: Royal Botanic Gardens, Kew, 1998. ISBN 1900347326 9781900347327.

LINGARAJU, M. H.; GOWDA, L. R. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, v. 1784, n. 5, p. 850-855, 2008.

LOPES, J. L. S.; VALADARES, N. F.; MORAES, D. I.; ROSA, J. C.; ARAÚJO, H. S. S.; BELTRAMINI, L. M. Physico-chemical and antifungal properties of protease inhibitors from *Acacia plumosa*. **Phytochemistry**, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Editora Plantarum, 1992.

MACEDO, M.; DE MATOS, D.; MACHADO, O.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. **Phytochemistry**, v. 54, n. 6, p. 553-8, Jul 2000a.

MACEDO, M.; GARCIA, V.; FREIRE, M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1104-11, Apr 2007a.

MACEDO, M. L. G. R.; DE MATOS, D. G. G.; MACHADO, O. L.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J. C. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. **Phytochemistry**, v. 54, n. 6, p. 553-558, 2000b.

MACEDO, M. L. R.; DURIGAN, R. A.; DA SILVA, D. S.; MARANGONI, S.; FREIRE, M. D. G. M.; PARRA, J. R. P. Adenantha pavonina trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 73, n. 4, p. 213-231, 2010.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. D. G. M.; DA SILVA, M. B. R.; COELHO, L. C. B. B. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 486-498, 2007b.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. D. G. M.; KUBO, C. E. G.; PARRA, J. R. P. Bioinsecticidal activity of *Talisia esculenta* reserve protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Anticarsia gemmatalis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 153, n. 1, p. 24-33, 2011.

MACEDO, M. L. R.; GARCIA, V. A.; FREIRE, M. D. G. M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1104-1111, 2007c.

MACEDO, M. L. R.; PANDO, S. C.; CHEVREUIL, L. R.; MARANGONI, S. Properties of a Kunitz-Type Trypsin Inhibitor from *Delonix regia* Seeds Against Digestive Proteinases of *Anagasta kuehniella* (Z.) and *Corcyra cephalonica* (S.) (Lepidoptera: Pyralidae). **Protein and Peptide Letters**, v. 16, n. 12, p. 1459-1465, 2009.

MACHADO, S. W.; BEZERRA, C. D. S.; OLIVEIRA, C.; MACHADO, O. L. T.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Purification of a Kunitz-type inhibitor from *Acacia polyphylla* DC seeds: Characterization and insecticidal properties against *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013a.

MACHADO, S. W.; DE OLIVEIRA, C. F. R.; BEZERRA, C. D. S.; MACHADO FREIRE, M. D. G.; REGINA KILL, M.; MACHADO, O. L. T.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Purification of a Kunitz-type Inhibitor from *Acacia polyphylla* DC Seeds: Characterization and Insecticidal Properties against *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 10, p. 2469-2478, 2013/03/13 2013b.

MACHADO, S. W.; OLIVEIRA, C. F. R.; BEZERRA, C. D. S.; FREIRE, M. G. M.; KILL, M. R.; MACHADO, O. L. T.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Purification of a Kunitz-type inhibitor from *Acacia polyphylla* DC seeds: Characterization and insecticidal properties against *Anagasta kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2013c.

MAIA, G. N. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. D & Z Computação Gráfica e Editora, 2004.

MAZUMDAR-LEIGHTON, S.; BROADWAY, R. M. Identification of six chymotrypsin cDNAs from larval midguts of *Helicoverpa zea* and *Agrotis ipsilon* feeding on the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 6-7, p. 633-644, 2001.

MIGLIOLO, L.; DE OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, E. A.; FRANCO, O. L.; DE SALES, M. P. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine- and cysteine-proteinases. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 2, p. 148-156, 2010.

MONNERAT, R.; MARTINS, E.; QUEIROZ, P.; ORDÚZ, S.; JARAMILLO, G.; BENINTENDE, G.; COZZI, J.; REAL, M. D.; MARTINEZ-RAMIREZ, A.; RAUSELL, C. Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae)

populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* Cry toxins. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7029-7035, 2006.

NAKANO, O. **Entomologia economica**. ESALQ-USP., 1981.

NEURATH, H. The versatility of proteolytic enzymes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 35-49, 1986.

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. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1477, n. 1–2, p. 64-74, 2000.

OLIVEIRA, C. F. R. Aspectos funcionais e estruturais do inibidor de tripsina de *Entada acaciifolia*. 2011.

OLIVEIRA, C. F. R.; DE PAULA SOUZA, T.; PARRA, J. R. P.; MARANGONI, S.; DE CASTRO SILVA-FILHO, M.; MACEDO, M. L. R. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant

protease inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 165, n. 1, p. 19-25, 2013.

OLIVEIRA, C. F. R.; LUZ, L. A.; PAIVA, P. M. G.; COELHO, L. C. B. B.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Evaluation of seed coagulant Moringa oleifera lectin (cMoL) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of insects. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 2, p. 498-504, 2011.

OLIVEIRA, C. F. R.; VASCONCELOS, I. M.; APARICIO, R.; FREIRE, M. G. M.; BALDASSO, P. A.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 929-935, 2012.

OLIVEIRA, H. D.; SOUSA, D. O. B.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARLINI, C. R.; OLIVEIRA, H. P.; PEREIRA, M. L.; ROCHA, R. O.; MORAIS, J. K. S.; GOMES-FILHO, E.; VASCONCELOS, I. M. Gm-TX, a new toxic protein from soybean (*Glycine max*) seeds with potential for controlling insect pests. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 634-640, 2010.

PACHECO, I. A. **Insetos de grãos armazenados: identificação e biologia**. Fundação Cargill, 1995.

PATANKAR, A. G.; GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; SAINANI, M. N.; DESHPANDE, V. V.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, V. S. Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera* gut proteinases explains polyphagous nature of the insect pest. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 4–5, p. 453-464, 2001.

PAULILLO, L. C. M. S.; LOPES, A. R.; CRISTOFOLETTI, P.; NIO, T.; PARRA, J.; ROBERTO, P.; TERRA, W. R.; SILVA-FILHO, M.; RCIO, C. Changes in Midgut Endopeptidase Activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are Responsible for Adaptation to Soybean Proteinase Inhibitors. **Journal of Economic Entomology**, v. 93, n. 3, p. 892-896, 2000.

PAULILLO, L. C. M. S.; MAGNO SEBBENN, A.; DE CARVALHO DERBYSHIRE, M. T. V.; GÓES NETO, A.; DE PAULA BROTTTO, M. A.; FIGUEIRA, A. EVALUATION OF IN VITRO AND IN VIVO EFFECTS OF SEMIPURIFIED PROTEINASE INHIBITORS FROM THEOBROMA SEEDS ON MIDGUT PROTEASE ACTIVITY OF LEPIDOPTERAN PEST INSECTS. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 81, n. 1, p. 34-52, 2012.

RABILLOUD, T. Solubilization of proteins for electrophoretic analyses. **ELECTROPHORESIS**, v. 17, n. 5, p. 813-829, 1996.

RAMOS, V. D. S.; CABRERA, O. G.; CAMARGO, E. L. O.; AMBRÓSIO, A. B.; VIDAL, R. O.; DA SILVA, D. S.; GUIMARÃES, L. C.; MARANGONI, S.; PARRA, J. R. P.; PEREIRA, G. A. G.; MACEDO, M. L. R. Molecular cloning and insecticidal effect of *Inga laurina* trypsin inhibitor on *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 156, n. 3–4, p. 148-158, 2012.

RANJEKAR, P. K.; PATANKAR, A.; GUPTA, V.; BHATNAGAR, R.; BENTUR, J.; KUMAR, P. A. Genetic engineering of crop plants for insect resistance. **Current Science**, v. 89, 2003.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. **Methods in plant biochemistry**, v. 5, p. 259-305, 1991.

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas** 2007. 269

SAJID, M.; MCKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 120, n. 1, p. 1-21, 2002.

SILVA, L.; MATOS, V. P. Morfologia de frutos, sementes e plântulas de catingueira (*Caesalpinia pyramidalis* Tul.-Caesalpinaceae) e de juazeiro (*Zizyphus joazeiro* Mart.-Rhamnaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 2, p. 25-31, 1998.

SILVA, L. B.; SILVA, W.; MACEDO, M. L. R.; PERES, M. T. L. P. Effects of croton urucurana extracts and crude resin on *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, p. 653-664, 2009.

STEVENS, J. A.; DUNSE, K. M.; GUARINO, R. F.; BARBETA, B. L.; EVANS, S. C.; WEST, J. A.; ANDERSON, M. A. The impact of ingested potato type II inhibitors on the production of the major serine proteases in the gut of *Helicoverpa armigera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 2, p. 197-208, 2013.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 1-62, 1994.

TREMACOLDI, C. R.; PASCHOLATI, S. F. Inibidor de tripsina em raízes de *Eucalyptus urophylla*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 135-140, 2004.

VOLPICELLA, M.; CECI, L. R.; CORDEWENER, J.; AMERICA, T.; GALLERANI, R.; BODE, W.; JONGSMA, M. A.; BEEKWILDER, J. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 1, p. 10-19, 2003.

