Miriam Dantzger

"INIBIDOR DE PROTEINASE DO TIPO BOWMAN-BIRK ISOLADO DE SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana* (FABACEAE): CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE *Anagasta kuehniella* E *Corcyra cephalonica*"

CAMPINAS

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Miriam Dantzger

"INIBIDOR DE PROTEINASE DO TIPO BOWMAN-BIRK ISOLADO DE SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana*: CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE *Anagasta kuehniella* E *Corcyra cephalonica*"

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Biologia Funcional e Molecular, área de concentração em Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA MIRIAM DANTZGER, E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA LÍGIA RODRIGUES MACEDO

Campinas – SP – Brasil
2014

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

Dantzger, Miriam, 1981-
D236i Inibidor de proteinase do tipo Bowman-Birk isolado se sementes de *Clitoria fairchildiana* : caracterização e atividade biológica sobre *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica* / Miriam Dantzger. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Lígia Rodrigues Macedo.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fabaceae. 2. Inibidores de proteinase. 3. Pragas de insetos - Controle biológico. I. Macedo, Maria Lígia Rodrigues. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Bowman-Birk proteinase inhibitor isolated from *Clitoria fairchildiana* seeds : characterization and biological activity on *Anagasta kuehniella* and *Corcyra cephalonica*
Palavras-chave em inglês:
Fabaceae
Proteinase inhibitors
Insect pests - Biological control
Área de concentração: Bioquímica
Titulação: Doutora em Biologia Funcional e Molecular
Banca examinadora:
Maria Lígia Rodrigues Macedo [Orientador]
Claudio Chrysostomo Werneck
Alessandra Alves de Souza
Adriana Rios Lopes Rocha
Carlos Alberto Labate
Data de defesa: 25-03-2014
Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 25 de março de 2014

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

Assinatura

Profa. Dra. Maria das Graças Machado Freire

Assinatura

Dra. Alessandra Alves de Souza

Assinatura

Dra. Adriana Rios Lopes Rocha

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Alberto Labate

Assinatura

Prof. Dr. Claudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Prof. Dr. Richard Ian Samuels

Assinatura

Prof. Dr. José Roberto da Silva

Assinatura

RESUMO

Dantzger, M. Inibidor de proteinase do tipo Bowman-Birk isolado de sementes de *Clitoria fairchildiana* (Fabaceae): caracterização e atividade biológica sobre *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*, 2014. Tese de doutorado – Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular (Bioquímica). Instituto de Biologia, UNICAMP – SP, Brasil.

Os inibidores de proteinases ou peptidases extraídos de plantas têm se mostrado promissores como um método alternativo no combate aos insetos-pragas. Neste estudo, um inibidor de peptidase foi isolado de sementes de *Clitoria fairchildiana* (Papilionoideae), denominado CFPI, caracterizado funcional e estruturalmente e sua atividade inseticida foi avaliada. CFPI foi purificado por exclusão molecular, seguido por coluna de interação hidrofóbica e apresentou um pico majoritário com atividade inibitória após ter sido submetido à filtração com alta resolução. Estudos cinéticos realizados com CFPI purificado mostraram uma atividade inibitória do tipo competitiva contra tripsina e quimotripsina bovinas, com uma estequiometria de inibição de 1:1 para ambas as enzimas. A constante de inibição de CFPI contra tripsina e quimotripsina bovinas foram 3,3 x 10^{-10} e 1,5 x 10^{-10} M, respectivamente, revelando uma forte capacidade de ligação. Eletroforese em SDS-Page mostrou que CFPI possui uma única cadeia polipeptídica, com uma massa molecular aparente de 15 kDa, sob condições não redutoras. Entretanto, o inibidor apresentou uma massa acurada de 7973 Daltons determinada por MALDI-TOF, sugerindo que CFPI forme dímeros em solução. Essa característica, aliada à estequiometria de inibição para tripsina e quimotripsina, à constante de inibição (Ki) para ambas as enzimas e ao sequenciamento e alinhamento N-terminal, permitiram classificar CFPI como membro da família Bowman-Birk de inibidores. O inibidor manteve-se estável ao aquecimento progressivo por 30 min a cada temperatura, variando de 37 até 100 °C e a análise de dicroísmo não mostrou mudanças no espectro a

207 nm após aquecimento à 90 °C e subsequente resfriamento. Além disso, CFPI mostrou atividade sobre uma ampla faixa de pH (2-10). Em contraste, a redução de CFPI com DTT resultou em perda de atividade inibitória contra tripsina e quimotripsina. CFPI exibiu atividade inibitória considerável contra enzimas tripsinas de *Anagasta kuehniella* (76%), *Diatraea saccharalis* (59%) e *Heliothis virescens* (49%). Suas propriedades inseticidas foram confirmadas a partir do impacto negativo causado no crescimento de *A. kuehniella* e *C. cephalonica*. O inibidor exerceu efeito antinutricional sobre *A. kuehniella* tanto na geração F_0 como em F_1.

Palavras-chave: Fabaceae, inibidor de peptidase, inibidor Bowman-Birk, intestino médio, insetos pragas.

ABSTRACT

Dantzger, M. Bowman-Birk proteinase inhibitor isolated from *Clitoria fairchildiana* (Fabaceae) seeds: characterization and biological activity on *Anagasta kuehniella* and *Corcyra cephalonica*, 2014. Ph.D. Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Biology Institute, UNICAMP – SP, Brazil.

Proteinase inhibitors isolated from plants have shown a promising alternative method against insect pests. In this study, a proteinase inhibitor was isolated from *Clitoria fairchildiana* seeds (CFPI). CFPI was functional and structurally characterized and its insecticidal activity was evaluated. CFPI was purified by molecular exclusion, following by hydrophobic interaction column and showed a majoritarian peak with inhibitory activity after high resolution gel filtration column. Kinetic studies of the purified inhibitor showed a competitive–type inhibitory activity against bovine trypsin and chymotrypsin, with an inhibition stoichiometry of 1:1 for both enzymes. The inhibition constants against trypsin and chymotrypsin were 3.3×10^{-10} and 1.5×10^{-10} M, respectively, displaying a tight binding property. SDS–PAGE showed that CFPI has a single polypeptide chain with an apparent molecular mass of 15 kDa under non–reducing conditions. However, MALDI–TOF analysis demonstrated a molecular mass of 7.973 Da, suggesting that CFPI forms dimers in solution. This feature, combined with the stoichiometry of inhibition for trypsin and chymotrypsin, the inhibition constant (Ki) for both enzymes and the N-terminal sequencing, allowed classifying CFPI as a member of Bowman-Birk family inhibitors. CFPI remained stable to progressive heating for 30 min to each temperature range of 37 up to 100 °C and CD analysis exhibited no changes in spectra at 207 nm after heating at 90 °C and subsequent cooling. Moreover, CFPI was active over a wide pH range (2–10). In contrast, reduction with DTT resulted in a loss of inhibitory activity against trypsin and chymotrypsin. CFPI also exhibited significant

inhibitory activity against larval midgut trypsin enzymes from *Anagasta kuehniella* (76%), *Diatraea saccharalis* (59%) and *Heliothis virescens* (49%). Its insecticidal properties were further analysed by bioassays and confirmed by negative impact on growth of *A. kuehniella* and *C. cephalonica*. The inhibitor exhibited antinutritional effect on A. kuehniella in the F_0 and F_1 generations.

Keywords: Fabaceae, peptidase inhibitor, Bowman-Birk inhibitor, midgut, insect pests.

SUMÁRIO

RESUMO vii
ABSTRACT ix
ABREVIATURAS xxi
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO 1
1. Objetivo Geral do estudo 4
2. Organização do trabalho 4
3. Produção Bibliográfica 5
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 7
1. Enzimas digestivas de insetos 7
2. Serinopeptidases de insetos 9
2.1. Tripsinas de insetos 12
2.2. Quimotripsinas de insetos 13
3. Insetos praga: *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica* 14
4. Inibidores de peptidases (IPs) 16
4.1 Interação planta-inseto com ênfase nos IPs 19
4.2. Mecanismo de ação dos inibidores de serinopeptidases 23
4.3. Análise estrutural do inibidor com dicroísmo circular 25
4.4. Inibidores serinopeptidases da família Bowman-Birk (BBI) 28
4.5. BBIs possuem diversas aplicações biotecnológicas 31
CAPÍTULO 3. PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO INIBIDOR (CFPI) 35
I. OBJETIVOS 35
II. MATERIAIS E MÉTODOS 36
1. Espécie vegetal 36
2. Reagentes 36
2.1. Enzimas 36

2.2. Substratos 36

2.3. Resinas 38

3. Procedimento experimental 39

3.1. Isolamento e purificação do inibidor de peptidase de *C. fairchildiana* (CFPI) 39

3.1.1. Obtenção da farinha de sementes de C. fairchildiana 39

3.1.2. Obtenção do extrato bruto 39

3.1.3. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75 40

3.1.4. Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Phenyl Sepharose CL 4-B 40

3.1.5. Cromatografia de gel filtração em coluna Superdex 75 41

3.2. Quantificação de Proteínas 41

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS 41

3.4. Caracterização do inibidor de peptidase de *C. fairchildiana* 42

3.4.1. Determinação da massa acurada por espectrometria MALDI-TOF 42

3.4.2. Determinação e análise da sequência N-terminal 43

3.4.3. Atividade inibitória para a tripsina bovina 44

3.4.4. Atividade inibitória para a quimotripsina bovina 44

3.4.5. Estequiometria de inibição 45

3.4.6. Determinação da constante de inibição 45

3.5. Estudos de estabilidade de CFPI 46

3.5.1. Estabilidade térmica 46

3.5.2. Estabilidade a variação de pH 46

3.5.3. Estabilidade ao agente redutor DTT 47

3.6. Dicroísmo circular de CFPI 47

III. RESULTADOS 48

1. Purificação de CFPI 48

1.1 Cromatografia em coluna Sephadex G-75 48

1.2 Cromatografia em coluna Phenyl-sepharose 49

1.3 Cromatografia em coluna Superdex 50

1.4 Tabela de purificação do inibidor 50

2. Eletroforese da purificação em gel de poliacrilamida contendo SDS 51

3. Caracterização do inibidor de peptidase de *C. fairchildiana* 52

3.1. Determinação da massa acurada por espectrometria MALDI-TOF 52

3.2. Determinação e análise da sequência N-terminal 53

3.3. Estequiometria de inibição 53

3.4. Determinação da constante de inibição 55

4. Estudos de estabilidade de CFPI 57

4.1. Estabilidade térmica 57

4.2. Estabilidade a variação de pH 58

4.3. Estabilidade ao agente redutor DTT 59

5. Dicroísmo circular de CFPI 60

IV. DISCUSSÃO 63

V. CONCLUSÕES 68

CAPÍTULO 4. ESTUDO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE CFPI 69

I. OBJETIVOS 69

II. MATERIAIS E MÉTODOS 70

1. Insetos 70

2. Efeito do inibidor sobre as enzimas digestivas de insetos 72

3. Efeito de CFPI sobre o crescimento e sobrevivência das larvas ..... de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* 73

a) Sobrevivência e peso médio larval 73

b) Índices nutricionais de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* 73

c) Atividade das enzimas digestivas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* 74

d) Perfil das peptidases do IM de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* por zimografia 75

III. RESULTADOS 76

1. Efeito do inibidor sobre as enzimas digestivas de insetos 76

2. Efeito de CFPI sobre o crescimento e as peptidases digestivas das larvas ..... de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* 77

a) Sobrevivência e peso médio larval 77

b) Índices nutricionais de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* 79

c) Atividade das enzimas digestivas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* 80

d) Perfil das peptidases do IM de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* por zimografia 85

IV. DISCUSSÃO 87

1. Efeito *in vitro* de CFPI sobre as enzimas digestivas de insetos 87

2. Efeito de CFPI sobre o crescimento e sobrevivência ..... das larvas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* 88

V. CONCLUSÕES 93

CAPÍTULO 5. EFEITO DA INGESTÃO AGUDA E CRÔNICA DE CFPI SOBRE *A. KUEHNIELLA* 95

I. OBJETIVOS 95

II. MATERIAIS E MÉTODOS 96

1. Efeito da ingestão aguda de CFPI sobre as enzimas digestivas de *A. kuehniella* 96

a) Ingestão aguda de CFPI (3 a 24hs) 96

b) Ingestão aguda de CFPI (72 a 144hs) 96

2. Efeito da ingestão crônica de CFPI sobre *A. kuehniella* de 1ª. e 2ª. geração 99

2.1. Ingestão crônica de CFPI em relação ao desenvolvimento de *A. kuehniella* de ..... 1ª. geração 99

2.2. Ingestão crônica de CFPI em relação às enzimas digestivas e ao peso de *A. kuehniella* da.... 2ª. geração 99

a) Efeito de CFPI sobre o peso médio larval 100

b) Purificação parcial das enzimas digestivas de *A. kuehniella* 100

c) Sensibilidade ao CFPI das enzimas tripsina e quimotripsina semi-purificadas ..... de *A. kuehniella*.....101

III. RESULTADOS..... 102

1. Efeito da ingestão aguda de CFPI sobre as enzimas digestivas de *A. kuehniella*.....102

a) Ingestão aguda de CFPI (3 a 24hs).....102

b) Ingestão aguda de CFPI (72 a 144hs).....106

2. Efeito da ingestão crônica de CFPI sobre *A. kuehniella* de 1ª. e 2ª. geração.....115

2.1. Ingestão crônica de CFPI em relação ao desenvolvimento de ..... *A. kuehniella* de 1ª. geração 115

2.2. Ingestão crônica de CFPI em relação às enzimas digestivas e ao peso de *A. kuehniella* da... 2ª. geração.....116

a) Efeito de CFPI sobre o peso médio larval.....116

b) Purificação parcial das enzimas digestivas de *A. kuehniella*.....117

c) Sensibilidade ao CFPI das enzimas tripsina e quimotripsina semi-purificadas de..... *A. kuehniella*.....121

IV. DISCUSSÃO 124

1. Efeito da ingestão aguda de CFPI sobre as enzimas digestivas de *A. kuehniella*.....124

a) Ingestão aguda de CFPI (3 a 24hs).....124

b) Ingestão aguda de CFPI (72 a 144 hs).....126

2. Efeito da ingestão crônica de CFPI sobre *A. kuehniella* de 1ª. e 2ª. geração.....128

2.1. Ingestão crônica de CFPI em relação ao desenvolvimento de *A. kuehniella* de ..... 1ª. geração.....128

2.2. Ingestão crônica de CFPI em relação às enzimas digestivas e ao peso de ..... A. kuehniella da 2ª. geração 129

V. CONCLUSÕES 132

CAPÍTULO 6. PERSPECTIVAS FUTURAS 133

REFERÊNCIAS 134

Dedico este trabalho à minha família, os quais devo meu amor incondicional: ao meu pai Dalziro e minhas duas mães, Lenira (in memoriam) e Raquel, aos meus avós Domingos e Sebastiana e aos meus irmãos Darlene, Natália e Arthur. Ao meu "namorido" Fernando pelo companheirismo e amor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e, desde já, peço desculpas caso eu venha me esquecer de alguém.

Gostaria de agradecer algumas pessoas de suma importância na minha formação profissional, pelas quais possuo respeito e admiração:

À profa. Dra. Maria Lígia R. Macedo pela orientação marcante e decisiva, amizade e pelos ensinamentos na área;

Sou eternamente grata ao prof. Dr. Sérgio Marangoni pela disponibilização do Laboratório de Química de Proteínas, reagentes e materiais;

Agradeço imensamente ao prof. Dr. Ricardo Aparício e à Dra. Valéria Scorsato por me auxiliarem nas análises de dicroísmo circular;

Aos amigos do Laboratório de Química de Proteínas (Laquip) Caio F. Ramalho de Oliveira, Desireé S. Silva, Cézar S. Bezerra, Lays Guimarães, Victor Corasolla, Fábio Marangoni, Daniela Damico, Paulo Baldasso, e aos peruanos Salomón, José Miguel, Frank Huaco pela amizade, companheirismo e compartilhamento de informações. Também sou grata aos alunos e amigos do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas (LPPFB): Carol, Suzy, Wellington, Daniela e Michele.

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Biomembranas, especialmente à professora Eneida e ao Marcio por terem me disponibilizado a utilização de alguns equipamentos.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia, em especial ao prof. Dr. Marcelo Lancellotti, por ter auxiliado em algumas técnicas e materiais.

Ao Laboratório de Enzimologia pela disponibilização de alguns reagentes e equipamentos.

Aos membros da banca de qualificação, prof. Dr. Marcelo Lancellotti, Dra. Maria das Graças M. Freire e Dra. Gláucia Coelho de Melo e da banca de examinadores da tese.

A todos os professores do programa de pós graduação em Biologia Funcional e Molecular, por colaborarem com meu crescimento profissional e intelectual.

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação em Biologia Funcional e Molecular, especialmente à Andréia, à Silvia e ao Rafael pela dedicação, eficiência e disponibilidade.

Ao CNPq pela bolsa concedida para a realização deste trabalho.

Por fim, agradeço à minha querida família por não medir esforços para garantir uma educação de qualidade para mim.

ABREVIATURAS

AcKI	Inibidor Kunitz de *Acacia polyphylla*
ACLEC	Lectina de *Annona coriacea*
ApTI	Inibidor de tripsina de *Adenanthera pavonina*
BApNA	Nα-benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida hidroclorido
BBI	Inibidor Bowman-Birk
BSA	Albumina de Soro Bovina
Bt	*Bacilus thurigiensis*
BTCI	Inibidor tripsina/quimotripsina de black-eyed peas
CFPI	Inibidor de proteinase de *Clitoria fairchildiana*
CPTI	Inibidor de tripsina de feijão de corda
DC	Dicroísmo circular
DrTI	Inibidor de tripsina de *Delonix regia*
DTT	Ditiotreitol
EATI	Inibidor de Tripsina de *Entada acaciifolia*
GPNA	N-glutaril-L-fenilalanina p-nitroanilida
HgPI	Inibidor de proteinase de Horse gram
IM	Intestino médio
IP	Inibidor de peptidase
Ki	Constante de inibição
Km	Constante de Michaelis-Menten
LaBBI	Inibidor Bowman-Birk de *Lupinus albus*
LBTI	Inibidor de tripsina de feijão lima
PFTI	Inibidor de tripsina de *Plathymenia foliolosa*
RgPI	Inibidor de proteinase de Red gram
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase-Tempo Real
SAAPFpNA	N-succinil-Alanina-Alanina-Prolina-Fenilalanina-p-nitroanilida
SBBI	Inibidor Bowman-Birk de soja
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SKTI	Inibidor de tripsina Kunitz de soja
SPI	Inibidor de proteinase de soja
TFA	Ácido trifluoroacético
TLCK	N-α-tosil-L-lisina-clorometil-cetona
TPCK	N-α-tosil-L-fenilalanina-clorometil-cetona
Vmax	Velocidade máxima

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Ao longo da evolução, os insetos se tornaram a maior classe entre os animais, colonizando a maioria dos habitats do planeta. O sucesso evolutivo da classe pode ser atribuído em grande parte ao convívio com as plantas, as quais são utilizadas como fonte de alimento, como sítios para acasalamentos ou para o refúgio. Para as plantas, a ação de insetos herbívoros comumente causa efeitos negativos, reduzindo as chances de reprodução e sobrevivência (ARRUDA, 2011).

Os insetos-praga causam grandes prejuízos na agricultura, por causarem injúrias e transmitirem doenças, além de se alimentarem dos tecidos das plantas e de grãos armazenados. Nesse contexto, as perdas da pré-colheita devido ao ataque de insetos, apesar da utilização de inseticidas, são estimadas em 15% da produção total, representando um valor de 100 bilhões de dólares (FERRY *et al.*, 2004). No Brasil, a perda de produção devido ao ataque de insetos é de 7,1%, em média, oscilando entre 2 a 30%. Estes dados representam algo em torno de US$ 2,2 bilhões de dólares ao ano (BENTO, 1999; OERKE, 2005), justificando assim medidas econômicas e urgentes de controle.

A principal forma de controle de pragas envolve o uso de agentes químicos, que trazem benefícios mínimos com custo elevado. Segundo o Sindicato de Defensivos Agrícolas - Sindag, a venda de inseticidas aumentaram 84% entre 2006 e 2012, ou seja, de 93 mil para 170,9 mil toneladas. O consumo mundial de pesticidas tem chegado a 2,6 milhões de toneladas por ano, sendo que o Brasil desponta como o sexto maior consumidor de agrotóxicos (SINDAG, 2012).

Entretanto, o crescimento do uso de pesticidas vem causando sérios danos para o meio ambiente e para a saúde humana, devido à aplicação inadequada dos mesmos, eliminação de espécies predadoras naturais, incorporação do poluente pelas plantas e ao solo, transporte destes para os rios e bioacumulação ao longo da cadeia trófica (BARRETT *et al.*, 1994; WILSON e TISDELL, 2001).

Além das perdas na agricultura ocasionadas por pragas e o gasto excessivo com agroquímicos, devemos levar em consideração o aumento da população previsto para 8,5 bilhões de pessoas para 2025, sendo necessário um aumento de 50% da produção de alimentos para sustentar o crescimento populacional. Esses dados enfatizam a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de abordagens alternativas que possibilitam o aumento sustentável da produção agrícola (MOHAN BABU *et al.*, 2003; RAMOS *et al.*, 2008).

A busca pelo desenvolvimento de técnicas favoráveis ambientalmente torna-se a solução para diminuir os gastos e a utilização de produtos químicos. Sendo assim, um programa de manejo integrado proporcionaria uma boa 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 (LAWRENCE e KOUNDAL, 2002).

As plantas possuem, naturalmente, um certo grau de resistência a insetos e demais pragas e, há muitos anos, tem-se estudado a biossíntese e a regulação destes compostos químicos (RYAN, 1973; HILKER e MEINERS, 2010; SILVA e SAMUELS, 2011). Os defensivos são encontrados em vários tecidos vegetais e dentre esses estão inclusos antibióticos, alcalóides, terpenos e proteínas. Dentre as proteínas, podemos destacar as quitinases (GOODAY, 1999; LIBANTOVÁ *et al.*, 2009), as lectinas (OLIVEIRA *et al.*, 2011; PAIVA *et al.*, 2011) e os inibidores de peptidases (ZHOU *et al.*, 2008; SUMIKAWA *et al.*,

2010). Esses últimos constituem uma ferramenta útil para a produção de plantas resistentes a pragas e atualmente estão sendo extensivamente estudados (CRUZ *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2013). Como o tubo digestivo de insetos é uma das mais importantes superfícies de contato com o ambiente, este torna-se um importante alvo para o controle de pragas (LOPES, 2004). Dessa forma, a expressão de inibidores de proteases digestivas em plantas pode ser uma ferramenta promissora no combate aos insetos praga.

1. Objetivo Geral do estudo

O objetivo geral do estudo consistiu em isolar, caracterizar e analisar o potencial biotecnológico de um inibidor de peptidase de sementes de *Clitoria fairchildiana*, em relação ao seu papel inseticida.

2. Organização do trabalho

Para uma maior compreensão dos estudos realizados, esta tese foi dividida em 5 capítulos, nos quais são abordados os seguintes temas:

O Capítulo 2 apresenta a "Revisão Bibliográfica" na qual são abordadas as peptidases de insetos, dando ênfase às serinopeptidases, assim como as classes de inibidores de peptidases e os insetos empregados no estudo.

Nos demais capítulos constam as metodologias empregadas para os ensaios, os resultados obtidos e a conclusão. Abaixo especificamos os assuntos de cada capítulo:

Capítulo 3: Purificação e caracterização do inibidor (CFPI)

Capítulo 4: Estudo da atividade inseticida de CFPI

Capítulo 5: Efeito da ingestão aguda e crônica de CFPI sobre *A. kuehniella*

Capítulo 6: Perspectivas futuras

3. Produção Bibliográfica

Esta tese de doutorado originou, até o momento, os seguintes trabalhos:

Artigo submetido para publicação

Dantzger, M.; Vasconcelos, I. M. ; Scorsato, V.; Aparicio, R.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R. Bowman–Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* seeds: isolation, biochemical properties and insecticidal potential. *Phytochemistry.*

Artigo a ser submetido

Dantzger, M.; Marangoni, S.; Macedo, M.L.R. Study short and long-term of the Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Clitoria fairchildiana* on *Anagasta kuehniella*.

Pedido de patente

Dantzger, M.; Macedo, M.L.R. Inibidor de proteinase do tipo Bowman-Birk isolado de sementes de *Clitoria fairchildiana*: caracterização e atividade biológica sobre *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica.* Pedido de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial/INPI. 07/01/2014.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

Dantzger, M.; Oliveira, C. F. R.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R. Efeitos regulatórios do inibidor de proteinase de *Clitoria fairchildiana* sobre *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). 13° Simpósio de Controle Biológico/Siconbiol, 2013.

Dantzger, M.; Bezerra, C. S.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R. "Effect of *Clitoria fairchildiana* Proteinase Inhibitor on Different Stages of *Anagasta kuehniella* Development", 2013.

Bezerra, C. S.; Zanoni, A. M. M; Dantzger, M.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R. "Trypsin Inhibitor from *Inga vera* Seeds Interfere on Proteolytic Activity of *Anagasta kuehniella*". XLII Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2013.

Dantzger, M.; Oliveira, C. F. R.; Salu, B. R.; Oliva, M. L.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R. "Study of the Biological Role of the Trypsin Inhibitor Isolated from Clitoria fairchildiana Seeds". XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, 2012.

Dantzger, M.; Oliveira, C. F. R.; Macedo, M. L. R. "Effect of Trypsin Inhibitor from *Clitoria fairchildiana* Seeds on the Larval Development of *Anagasta kuehniella*". XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBq, 2011.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Enzimas digestivas de insetos

Para compreender o mecanismo de ação dos inibidores, faz-se necessário o conhecimento sobre as enzimas digestivas dos insetos. Esses peptídeos digestivos catalisam a quebra de proteínas ingeridas pelo inseto 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 (RAMOS *et al.*, 2008). As enzimas digestivas são também denominadas peptidases (peptídeo-hidrolases, EC 3.4) por clivar as ligações peptídicas. São encontradas abundantemente na região do intestino médio do inseto e estão subdivididas em exopeptidases (EC 3.4.11-19), que removem aminoácidos da região C–terminal ou N–terminal, e endopeptidases (EC 3.4.21-24), que clivam ligações peptídicas internas (BOLTER e JONGSMA, 1997). As peptidases são atualmente divididas em 7 subclasses com base na sua estrutura terciária, possível origem e resíduo catalítico: serino, cisteíno, treonino, aspártico, metalo, asparagina e glutâmico peptidases (TERRA e FERREIRA, 1994; RAWLINGS *et al.*, 2014).

A digestão de proteínas pelo inseto consiste em três etapas. A digestão inicial ou primária ocorre frequentemente no interior da membrana peritrófica e consiste em dispersão e redução do tamanho dos polipeptídeos. Durante a digestão intermediária, a qual ocorre

frequentemente no espaço ectoperitrófico, estas moléculas são novamente reduzidas, agora a dímeros, os quais serão reduzidos a monômeros na digestão final por enzimas microvilares integrais ou por enzimas presas no glicocálice. Essa etapa final da digestão ocorre na superfície das células do intestino médio (Figura 1). A digestão geralmente ocorre sob a ação de enzimas digestivas do intestino médio, com pouca ou nenhuma participação das enzimas salivares (TERRA e FERREIRA, 2005).

Para a digestão das proteínas de diversas fontes de alimento são necessárias endopeptidases de diferentes especificidades. As duas principais classes de peptidases no sistema digestivo de insetos fitófagos são as serino e as cisteíno peptidases. A maioria dos Lepidópteros possui as serinopeptidases como as principais enzimas digestivas, enquanto que os Coleópteros possuem principalmente cisteínopeptidases (TERRA e FERREIRA, 1994).

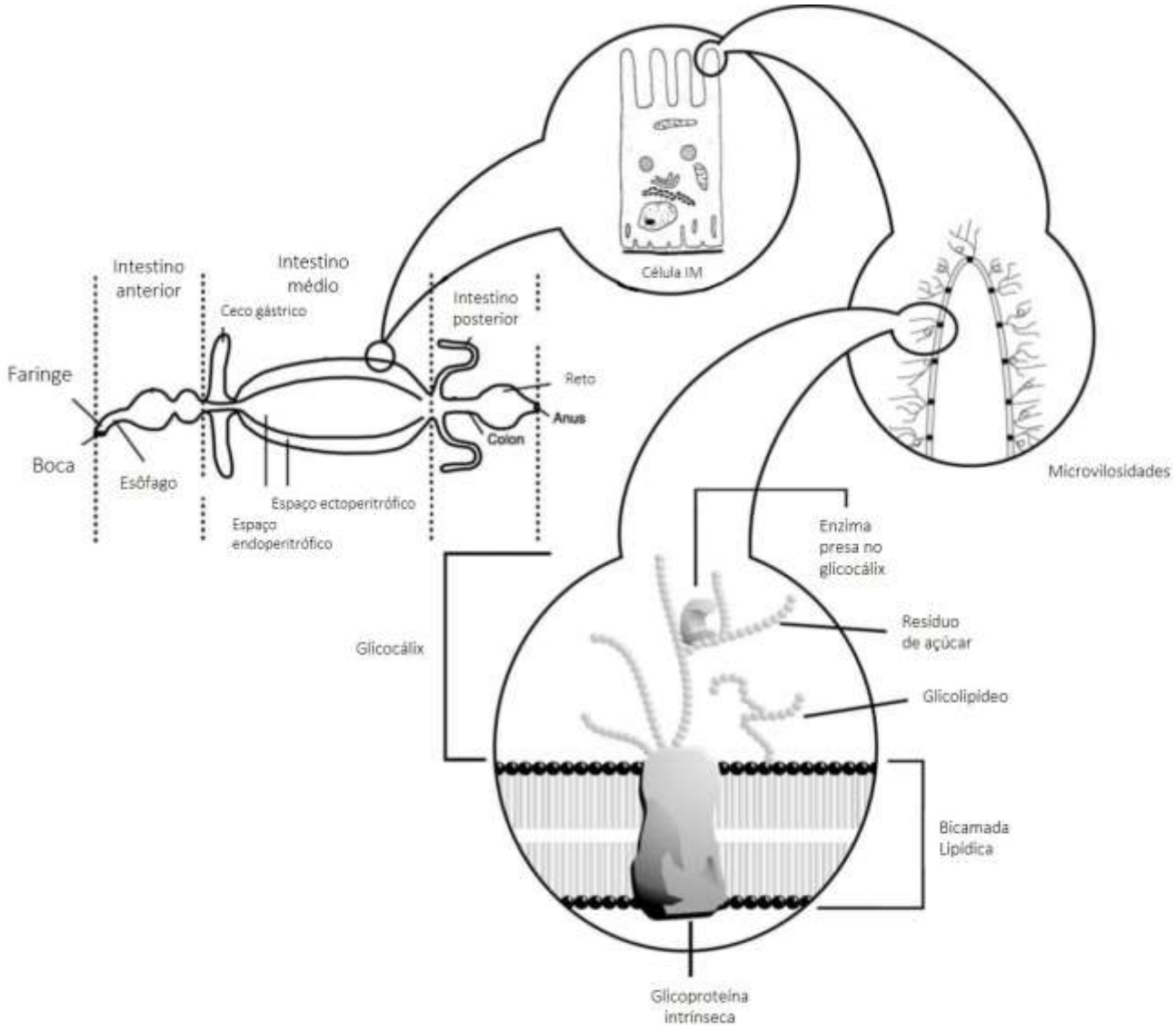

Figura 1. Representação diagramática de compartimentos do intestino do inseto. Em destaque, uma célula do intestino médio na qual ocorre a fase final do processo digestório, constituída por enzimas digestivas aderidas ao glicocálice (TERRA e FERREIRA, 2005).

2. Serinopeptidases de insetos

As endopeptidases cujo mecanismo catalítico depende da hidroxila de um resíduo de serina atuando como nucleófilo são chamadas de serinoproteinases ou serinopeptidases. Existem aproximadamente 40 famílias de serinopeptidases que são distinguíveis pelas suas

estruturas primárias (JAMES, 1999; LOPES, 2004). Esta famílias estão agrupadas em seis clãs pela comparação de suas estruturas terciárias. A maquinaria catalítica destas enzimas envolve, além do resíduo de serina, um doador de prótons que geralmente é dado por um resíduo histidina, e um terceiro resíduo que promove a orientação do anel himidazol da histidina. Geralmente, este terceiro grupo é constituído por um resíduo de ácido aspártico ou até mesmo de uma outra histidina (JAMES, 1999). Dentre os clãs de serinopeptidases, o clã SA destaca-se por possuir as enzimas digestivas tripsinas e quimotripsinas que estão presentes praticamente em todos os organismos vivos. Para os insetos, elas são responsáveis por cerca de 95% da proteólise (CHRISTELLER *et al.*, 1992; JOHNSTON *et al.*, 1995). As serinopeptidases pertencentes ao clã SA apresentam uma estrutura terciária em β-barril duplo (Figura 2) e os resíduos His, Asp e Ser dos aminoácidos participantes da tríade catalítica, sendo que o sítio catalítico está ao meio dos dois domínios (JAMES, 1999).

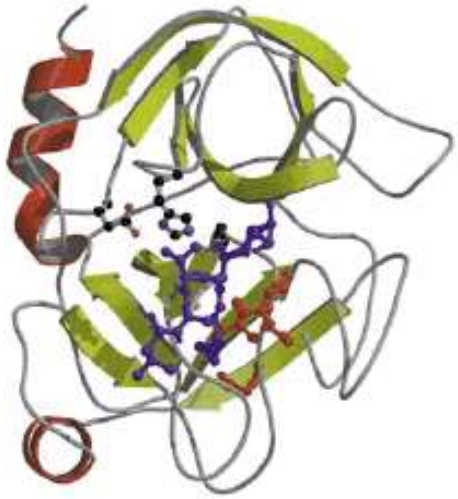

Figura 2. Estrutura terciária de uma serinopeptidase. Notar que ao meio encontram-se os aminoácidos da tríade catalítica (His, Ser e Asp) (SCIENCES, 2013).

Além disso, estas enzimas apresentam um sítio ativo formado por um sítio catalítico e um sítio de ligação, comum a todas as enzimas proteolíticas. O sítio catalítico consiste de um número limitado de resíduos de aminoácidos envolvidos na quebra de uma ligação peptídica,

seja pela transferência de prótons ou pela ligação a um oxiânion do intermediário tetraédrico. O sítio de ligação é composto de vários subsítios, cada um ligando um único aminoácido do substrato através de múltiplas interações (Figura 3). Os subsítios são denominados S no sentido do N-terminal do substrato, e S' no sentido C-teminal do substrato. Já os aminoácidos do substrato são denominados P no sentido N-terminal e P' no sentido C-terminal. Assim, P1 é a posição do aminoácido a ser clivado no substrato, e este aminoácido se liga ao subsítio S1 da enzima. Como os subsítios da enzimas são constituídos por aminoácidos que interagem com o substrato, a composição de aminoácidos de cada subsítio e suas posições espaciais determinam a sua especificidade, uma vez que subsítios diferentes apresentarão propriedades diferentes, resultando em enzimas com diferentes especificidades e propriedades cinéticas (SCHECHTER e BERGER, 1967; TAMAKI, 2011).

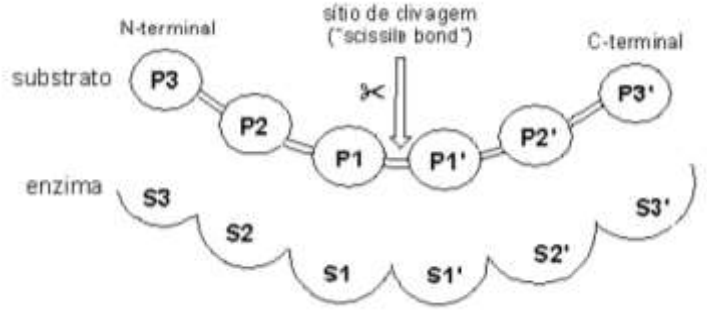

Figura 3. Representação esquemática e nomenclatura dos subsítios de ligação de uma peptidase e os resíduos complementares do seu substrato, conforme Schechter e Berger (1967), (KRAUCHENCO *et al*., 2004).

O clã SA contém as famílias S1 a S4 e S29 a S32, sendo que as tripsinas, quimotripsinas e elastases pertencem à família S1 (RAWLINGS *et al*., 2014). No entanto, apesar da similaridade de suas estruturas primária e terciária, evidenciada por estudos cristalográficos da tripsina, quimotripsina e elastase, estas enzimas apresentam

especificidades bastante distintas (PRAKASH *et al.*, 1997). Tripsinas clivam cadeias protéicas na porção carboxílica de aminoácidos básicos como lisina ou arginina, enquanto as quimotripsinas hidrolisam preferencialmente cadeias protéicas na porção carboxílica de aminoácidos hidrofóbicos de cadeia lateral aromática. Já as elastases hidrolisam cadeias protéicas na porção carboxílica de aminoácidos hidrofóbicos de cadeia lateral menos volumosas como Ala, Gly, Val e Leu (LOPES *et al.*, 2004).

As enzimas do tipo tripsina e quimotripsina foram caracterizadas em diversas ordens de insetos de interesse econômico, como Coleoptera, Diptera, Lepidoptera, Hymenoptera, Orthoptera e Thysanura (TERRA e FERREIRA, 1994; PAULILLO *et al.*, 2000; LOPES *et al.*, 2009; TEIMOURI *et al.*, 2013).

2.1. Tripsinas de insetos

A maioria das tripsinas de insetos tem pH ótimo básico, podendo variar de 7,5 a 10,5. Sua massa molecular observada em SDS-PAGE varia de 21 a 35 kDa, com algumas exceções, como a tripsina do lepidóptero *Erinnyis ello*, a qual possui 48 kDa. Além disso, o conteúdo luminal de *Heliothis virescens* apresenta quatro tripsinas com massas moleculares que variam de 70 a 17 kDa (BRITO *et al.*, 2001).

A distribuição das enzimas ao longo do intestino dos insetos é bastante heterogênea: insetos de ordens basais, como o *Periplaneta americana* (Dictyoptera), possuem atividade de tripsina majoritariamente localizada no intestino anterior. Todavia, parece haver um refluxo de enzimas, incluindo tripsinas, do intestino médio para o posterior, como visto em insetos da ordem Dictyoptera e Orthoptera, uma vez que a tripsina não é produzida em glândulas salivares (TAMAKI, 2011). Os insetos holometábolos, como *Musca domestica* e *Spodoptera*

frugiperda, apresentam atividade tríptica principalmente no intestino médio, podendo ser solúvel, aderida ao glicocálice e à membrana das células do epitélio (TAMAKI, 2011).

As sequências similares de tripsinas conhecidas possuem alta similaridade entre si, com domínios conservados contendo os resíduos catalíticos His57 (TAAHC), Asp102 (DIAL) e Ser195 (GDSGGP). Ainda assim, as propriedades cinéticas das tripsinas de insetos de quatro ordens distintas (Dictyoptera: *P. americana*; Coleoptera: *Tenebrio molitor*; Diptera: *M. domestica*; Lepidoptera: *Diatraea saccharalis*) (LOPES *et al.*, 2004) são bastantes diferentes. O estudo envolvendo substratos de fluorescência apagada mostrou diferenças na especificade primária das tripsinas de insetos lepidópteros, que preferem Lys a Arg em P1 (LOPES, 2004). Além disso, a hidrofobicidade de cada subsítio foi calculada a partir da eficiência de hidrólise de cada peptídeo com uma troca no referido subsítio. Os resultados sugerem que os subsítios das tripsinas digestivas de insetos tornam-se progressivamente hidrofóbicos ao longo da evolução. Isso indica uma adaptação para resistir aos inibidores de plantas, os quais possuem resíduos de aminoácidos polares em seus sítios reativos (TERRA e FERREIRA, 2005).

2.2. Quimotripsinas de insetos

As quimotripsinas de insetos têm usualmente massas moleculares de 20-30 kDa, pH ótimo de 8-11 e diferem das de vertebrados por sua instabilidade em pH ácido. Alguns lepidópteros apresentam baixa reatividade frente ao modificador de imidazol (da His57 catalítica) tosil-fenilalanina clorometil cetona (TPCK), em comparação às quimotripsinas de vertebrados (TERRA e FERREIRA, 2005; TAMAKI, 2011). A distribuição da quimotripsina entre os grupos de insetos aparentemente é similar à descrita acima para a tripsina.

Anteriormente, a dificuldade em detectar a atividade da quimotripsina dos intestinos de insetos era uma consequência do uso de substratos pequenos nos ensaios, como o GPNA (N-glutaril-L-fenilalanina p-nitroanilida), o qual é utilizado para detectar atividade quimotríptica de mamíferos. Todavia, tanto as quimotripsinas de insetos quanto a quimotripsina bovina preferem substratos mais longos como o SAAPFpNA (succinil-Ala-Ala-Pro-Phe-p-nitroanilida), sendo que nem sempre é possível detectar a atividade quimotríptica a partir de substratos curtos (LEE e ANSTEE, 1995).

A ausência de modificação das quimotripsinas por TPCK, descrita para *Anagasta kuehniella* (MACHADO *et al.*, 2013), *Spodoptera littoralis* (LEE e ANSTEE, 1995), *Agrotis ipsilon* e *Helicoverpa zea* (MAZUMDAR-LEIGHTON e BROADWAY, 2001), foi atribuída ao fato de este modificador apresentar um único resíduo de aminoácido que não seria suficiente para interagir com a enzima dos insetos. Todavia, as quimotripsinas dos insetos *Locusta migratoria* (SAKAL *et al.*, 1988) e *Solenopsis invicta* (WHITWORTH *et al.*, 1998) foram modificadas por TPCK.

3. Insetos praga: Anagasta kuehniella e Corcyra cephalonica

Insetos fitófagos são considerados pragas quando danificam plantações de interesse econômico, causando prejuízos. Quanto a sua biologia, estes podem ser classificados em generalistas e especialistas (FERRY *et al.*, 2004). Insetos generalistas alimentam-se de uma ampla variedade de espécies de plantas e seus mecanismos adaptativos são complexos, pois tendem a responder a diferentes substâncias químicas e proteínas de plantas (RAMOS *et al.*, 2008). Por outro lado, insetos especialistas alimentam-se de poucas espécies de plantas e podem apresentar uma eficiente forma de adaptação, envolvendo a produção de

grandes quantidades de enzimas para detoxificação, ou ainda possuem mecanismos de reserva das toxinas da planta hospedeira (PATANKAR *et al.*, 2001).

Insetos pertencentes às ordens Coleoptera e Lepidoptera representam os principais responsáveis por prejuízos no campo e no armazenamento (OLIVEIRA, 2011). Os coleópteros da família Bruchidae são de maior importância em relação a infestação de feijões (ZHU-SALZMAN e ZENG, 2008). Em relação aos lepidópteros, esta ordem agrupa as mariposas e borboletas, cujas larvas se alimentam de plantas e provocam danos (VOLPICELLA *et al.*, 2003). Os lepidópteros expressam abundantemente serinopeptidases em sua fisiologia digestiva e, portanto, constituem bons candidatos para bioensaios (MACHADO *et al.*, 2013).

Anagasta kuehniella Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), conhecida como traça da farinha, é uma mariposa de coloração parda com cerca de 20 mm de envergadura. A fêmea deposita em 4 ou 5 dias, entre 200 e 300 ovos, sobre a farinha e outros alimentos. A larva mede aproximadamente 12 mm de comprimento e é bastanta voraz. Na medida em que se alimenta vai tecendo fios de seda que podem formar massas compactas, obstruindo por vezes, a maquinaria e tubulações dos moinhos de trigo (TECNIGRAN, 2013). É considerado um inseto polífago que se alimenta de uma ampla variedade de produtos armazenados, tais como grãos, frutos, nozes, tabaco e doces, causando perdas econômicas por todo o mundo (MACHADO *et al.*, 2013).

Corcyra cephalonica (Lepidoptera: Pyralidae) causa sérios danos durante a armazenagem, vindo a ser uma das mais importantes traças do arroz, nas regiões de clima tropical e subtropical, além de infestar cereais, farelos e farinhas, ataca também amendoim, milho, arroz, cacau, café em grãos e soja (KRISHNA e AYYAR, 1934). A mariposa mede de 15 a 25 mm de envergadura. As asas anteriores são de coloração cinza amarelada e as

posteriores esbranquiçadas. O período de pré-oviposição das fêmeas de *C. cephalonica é* de 24 horas, mostrando um período de oviposição de 2 a 7 dias e o número de ovos por fêmea é de 268 no inverno e 399 ovos no verão, dependendo da dieta em que são criadas (KAMEL *et al.*, 1977). A larva é de coloração branca e mede cerca de 15 mm de comprimento, sendo muito semelhante à larva de *A. kuehniella* (DUARTE AGUILAR e ARTHUR, 1994).

O custo destinado ao controle destes insetos é tão alto que algumas vezes pode inviabilizar o cultivo (WILSON e TISDELL, 2001). Uma vez conhecidos os prejuízos provocados e tendo-se ciência da necessidade do controle destas pragas, estudos sobre ferramentas de controle devem ser realizados junto ao melhor entendimento da interação planta-inseto, com o intuito de obter alternativas eficazes de controle (OLIVEIRA, 2011).

4. Inibidores de peptidases (IPs)

Os estudos sobre IPs iniciou-se em 1938, quando Read & Hass observaram que um extrato aquoso de farinha de soja inibia a capacidade da tripsina de dissolver gelatina (GATEHOUSE e BOULTER, 1983). O auge das pesquisas deu-se com o isolamento e caracterização parcial de um inibidor de peptidase de soja (*Glycine max*) por Kunitz, em 1946. Em 1947, o primeiro estudo sistemático de IPs de origem vegetal foi realizado por Borchers & Ackerson. Entretanto, nestes primeiros trabalhos as pesquisas eram mais restritas a inibição de tripsina e, em menor intensidade, a inibição de quimotripsina (MELLO, 2005). Desde então, a inibição destas duas enzimas vem sendo muito investigada (HAQ *et al.*, 2004; BHATTACHARYYA e BABU, 2009; SUMIKAWA *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2013).

Os IPs são uma classe de substâncias, naturalmente produzidas pelas plantas e estão intimamente relacionados à sua defesa. Estão amplamente distribuídos em animais, microrganismos e principalmente plantas (BIRK, 1996) onde são encontrados inibidores para quase todos os tipos de enzimas proteolíticas (SAMPAIO, C. A. M. *et al.*, 1996). Os inibidores concentram-se principalmente nos órgãos vegetais reprodutivos, tecidos vegetativos e de reserva, tais como sementes e tubérculos (RYAN, 1973). Entretanto, já foram detectados e isolados em folhas (BIJINA *et al.*, 2011), frutos (AZARKAN *et al.*, 2006) e raízes (HOU e LIN, 2002).

Em relação à distribuição dos IPs em plantas, sabe-se que as angiospermas dicotiledôneas englobam o maior número de espécies, merecendo destaque as famílas Fabaceae e Solanaceae; enquanto que entre as monocotiledôneas, estão mais amplamente distribuídos na família Graminae (RYAN, 1973; LASKOWSKI e KATO, 1980; HILKER e MEINERS, 2010). Apesar desta ocorrência generalizada, a quantidade de inibidores é extremamente variável, mesmo entre espécies do mesmo gênero, e até mesmo entre variáveis de uma mesma espécie (HAQ *et al.*, 2004).

Os IPs são moléculas, geralmente, de baixa massa molecular, sendo a classificação dada pela especificidade e mecanismo de ação (LASKOWSKI e KATO, 1980). Sua massa molecular varia entre 6 a 30 kDa, e a grande maioria apresenta entre 70 a 90 resíduos de aminoácidos. Aqueles de massa molecular relativamente alta, apresentam-se na forma polimérica, associados em dímeros ou tetrâmeros, cujos monômeros possuem uma massa molecular mínima de aproximadamente 10 kDa (KUMAR *et al.*, 2004; RAO e SURESH, 2007).

Esses inibidores são considerados moléculas estáveis, podendo apresentar resistência ao calor, a variações de temperatura e de pH e à proteólise por peptidases 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 e WEDER, 1990).

Os inibidores são agrupados de acordo com as peptidases que inibem e, portanto, podemos encontrar os inibidores das serinopeptidases (quimotripsina, tripsina, elastase, calicreína e subtilisina), cisteinopeptidases (papaína, catepsina B e actinidina), asparticopeptidases (pepsina e catepsina D) e metalopeptidases (carboxipeptidase A e B e termolisina) (LAWRENCE e KOUNDAL, 2002). O MEROPS é um banco de dados de peptidases que agrupa informações sobre a sequência gênica, classificação, nomenclatura, proteínas inibidas e a estrutura dos inibidores, provendo vasta informação acerca dos IPs estudados (RAWLINGS *et al*., 2014). Dentre os mais estudados e caracterizados estão os que inibem as enzimas do tipo serinopeptidases (PRASAD, E.R. *et al*., 2010). Eles são encontrados em alta concentração em sementes de leguminosas e suas estruturas têm sido determinadas de várias espécies de plantas nativas do Brasil (MACEDO *et al*., 2002; CRUZ *et al*., 2013; MACHADO *et al*., 2013). As duas famílias de inibidores serinopeptidases melhor caracterizadas são as do tipo Kunitz e Bowman-Birk. Inibidores do tipo Kunitz possuem massa molecular entre 18-22 kDa, uma ou duas cadeias polipeptídicas, poucos resíduos de cisteína em sua constituição (normalmente com 4 resíduos de cisteína em duas pontes dissulfeto) e um sítio reativo. Em contraste, os inibidores do tipo Bowman-Birk (BBI) possuem massa molecular menor (7-15 kDa), alta concentração de resíduos de cisteína e dois sítios reativos (BIRK, 1996; LAWRENCE e KOUNDAL, 2002).

Inúmeros trabalhos sobre purificação e estudo inseticida com inibidores da família Kunitz têm sido reportados. Em comparação, a literatura sobre o efeito dos BBIs contra insetos é mais escassa e necessita ser mais explorada.

4.1 Interação planta-inseto com ênfase nos IPs

As plantas desenvolveram diferentes mecanismos de defesa visando diminuir o ataque dos insetos, que incluem barreiras físicas e químicas, além de complexas vias de sinalização (FALCO *et al.*, 2001). Dentre elas estão a indução de proteínas de defesa (HARUTA *et al.*, 2001), a liberação para o ambiente de compostos voláteis que atraem predadores dos insetos fitófagos (SMITH *et al.*, 2009), a síntese de metebólitos secundários (BALDWIN, 2001) e o aumento da densidade de tricomas em folhas e caules (TIAN *et al.*, 2012). Em contrapartida, os insetos desenvolveram estratégias para superar tais barreiras impostas pelas plantas. Estas estratégias incluem a metabolização e o sequestro de compostos tóxicos (NISHIDA, 2002), mecanismos de fuga (BEHMER *et al.*, 2005) e alterações nos padrões de expressão gênica (PYTELKOVÁ *et al.*, 2009). Os principais mecanismos de interação entre plantas e insetos estão resumidos na Figura 4.

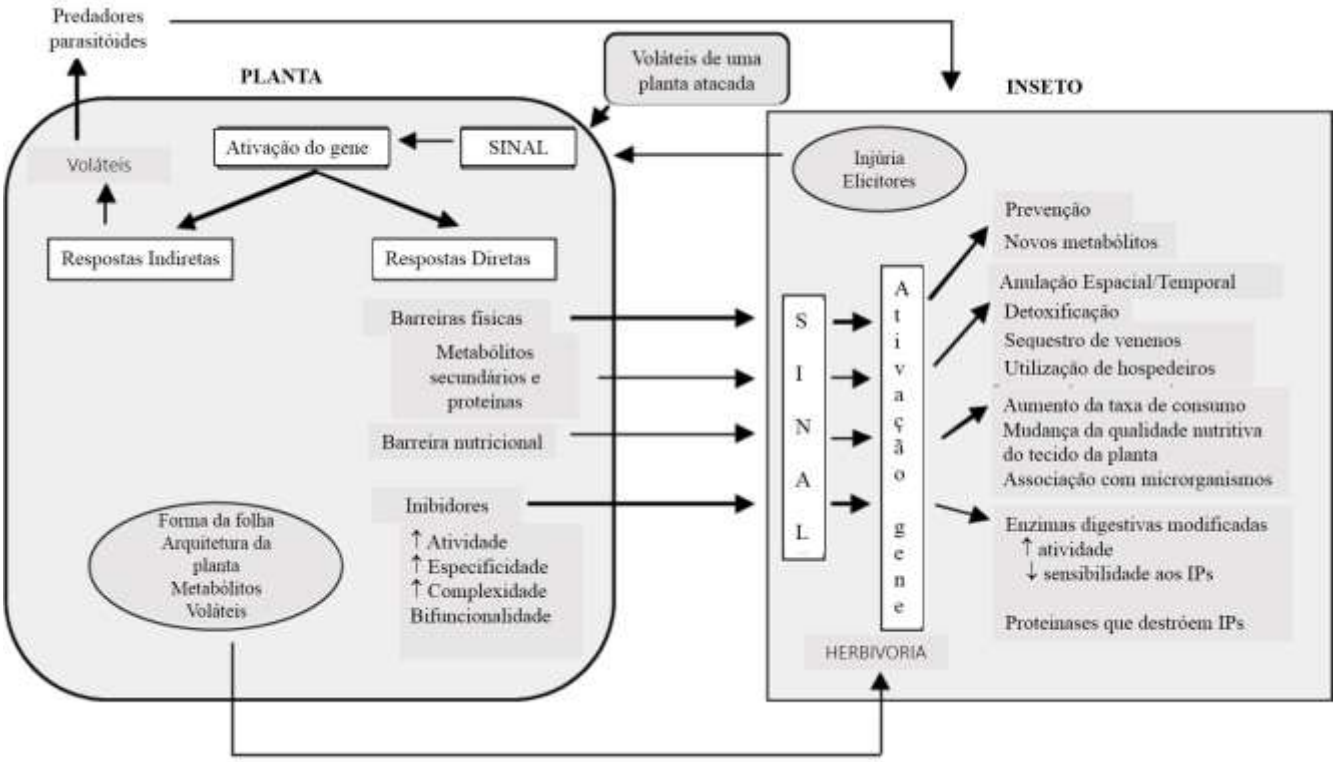

Figura 4. Interações entre plantas e insetos (MELLO e SILVA-FILHO, 2002).

As plantas podem sintetizar de forma constitutiva compostos químicos, que repelem os herbívoros, por serem tóxicos ou reduzirem a digestibilidade dos tecidos vegetais. Uma outra estratégia utilizada pelas plantas é a indução da síntese destas substâncias em resposta a injúrias causadas pelo ataque dos herbívoros. Estes dois mecanismos de defesa são responsáveis por prevenir a maioria dos ataques, embora existam determinados insetos que são capazes de se adaptar de forma específica e causar danos às plantas (JOSÉ, 2002).

Uma classe de substâncias que está intimamente relacionada à defesa das plantas é a dos IPs. Os níveis destes inibidores em folhas são normalmente baixos, podendo ser rapidamente induzidos a níveis elevados quando as plantas são atacados por insetos, sofrem danos mecânicos ou são expostas aos fitohormônios (GOVIND *et al.*, 2010). Além da síntese de IP induzida no local do ataque, foi demonstrado que sinais específicos originários dos

tecidos danificados são transportados via floema e estimulam a síntese do inibidor por toda a planta (BOLTER e JONGSMA, 1997). Esses inibidores funcionam como substratos específicos para as proteases digestivas, formando um complexo estável na qual a proteólise é limitada e extremamente lenta. A especificidade e eficiência dos IPs são determinadas pela ligação entre o sítio ativo da peptidase e o sítio reativo do inibidor, causando a inibição de todas suas funções catalíticas (LASKOWSKI e KATO, 1980).

Essas proteínas de defesa geralmente inibem competitivamente a atividade das peptidases (LAWRENCE e KOUNDAL, 2002). Nos insetos, retardam o processo digestivo a partir da inibição de suas enzimas digestivas, causando uma redução na assimilação de nutrientes e prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução. Como consequência, acarretam retardo no crescimento e desenvolvimento do inseto (PRASAD, E.R. *et al.*, 2010), altos índices de mortalidade (FRANCO *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2010), bem como aumento do período de pré-oviposição e menor fecundidade (POMPERMAYER *et al.*, 2001). Além disso, ao retardarem o desenvolvimento dos herbívoros, esses IPs prolongam o período em que predadores podem ser atraídos para as plantas atacadas, por meio de compostos voláteis liberados por elas, contribuindo de forma indireta no controle dos insetos (BALDWIN, 2001).

Nesse contexto, ao longo da evolução, plantas e insetos desenvolveram mecanismos ecológicos, fisiológicos e bioquímicos para diminuir os efeitos negativos desta interação. As plantas desenvolveram mecanismos extraordinários contra as peptidases dos insetos, tais como o aumento da atividade de inibidores nos tecidos (RAKWAL *et al.*, 2001), a síntese de uma vasta gama de inibidores que possuem atividade contra várias enzimas (CHRISTELLER *et al.*, 1992), a produção de inibidores bifuncionais que atuam contra serino e cisteínopeptidases (OLIVEIRA *et al.*, 2007), o aumento da complexidade dos inibidores com

propriedades bioquímicas diferentes por meio da produção de isoinibidores (RUFINO *et al.*, 2013), a expressão de inibidores altamente específicos para as enzimas dos insetos (FALCO *et al.*, 2001) e a síntese de inibidores resistentes à proteólise e ativos sob várias condições de pH do trato digestivo de insetos (CHRISTELLER, 1998). Em contrapartida, os insetos desenvolveram diversos mecanismos de adaptação para superar os efeitos negativos causados pelos IPs presentes nas plantas hospedeiras. Estes incluem o aumento da atividade das enzimas digestivas e a síntese de enzimas insensíveis ao inibidor (BRIOSCHI *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013), a modificação do espectro ou atividade relativa de várias hidrolases digestivas (PATANKAR *et al.*, 2001), a digestão de inibidores por peptidases (COELHO *et al.*, 2010), e a redução da sensibilidade das enzimas via formação de oligômeros de alto peso molecular insensíveis aos IPs (BRITO *et al.*, 2001).

Brioschi e colaboradores (2007) analisaram o transcriptoma do intestino médio de larvas de *Spodoptera frugiperda* alimentadas com uma dieta suplementada com inibidor de peptidase de soja (SPI). Os autores verificaram dois grandes e diversificados grupos de quimotripsinas e tripsinas, sendo que alguns dos genes codificantes de proteínas foram melhor caracterizados por RT-PCR. A análise da transcrição revelou dois grupos: um grupo de genes constitutivamente expressos na larva controle que sofreu superexpressão com a introdução de SPI na dieta, e um segundo grupo que estava ausente no controle e foi induzido pela dieta rica em SPI. Esses dados sugerem que o mecanismo de adaptação deste inseto polífago envolve a síntese de novas enzimas concomitante a um aumento na produção das enzimas existentes.

4.2. Mecanismo de ação dos inibidores de serinopeptidases

A fim de se compreender o mecanismo pelo qual os inibidores influenciam a atividade proteolítica é preciso primeiramente compreender o mecanismo de ação das serinopeptidases. O mecanismo padrão pelo qual as serinopeptidases clivam peptídeos é acompanhado em 3 passos (Figura 5). Primeiro a enzima se liga ao susbtrato para formar o complexo de Michaelis, no qual o nucleófilo (Ser195) ataca a carbonila da ligação "clivável" do peptídeo para formar um complexo de transição conhecido como intermediário tetraédrico. Segundo, o intermediário tetraédrico se decompõe no intermediário acil-enzima com o grupo abandonador não covalentemente ligado. Então o grupo deixante, o novo N-terminal do peptídeo substrato clivado, é deslocado da enzima e substituído por uma molécula de água. No terceiro e último passo, o intermediário acil-enzima é deacilado pelo que é essencialmente o reverso do primeiro passo, com a molécula de água sendo o nucleófilo atacante e a serina catalítica o grupo abandonador, seguido pela saída do novo C-terminal do peptídeo clivado e regenerando a enzima ativa (VOET e VOET, 2010).

Um inibidor padrão clássico é hidrolisado cerca de 10^7 vezes mais lentamente que um bom substrato, sendo que o passo determinante é a deacilação do intermediário acil-enzima. A formação do complexo enzima-inibidor ocorre rapidamente, mas a sua dissociação é lenta e resulta na enzima livre e em um inibidor clivado. A ligação do inibidor clivado no sítio ativo da enzima é forte e orientada, prevenindo a hidrólise do intermediário acil-enzima e favorecendo a reação inversa com a religação do grupo abandonador, o qual diminui drasticamente a velocidade da reação (KRAUCHENCO *et al.*, 2004).

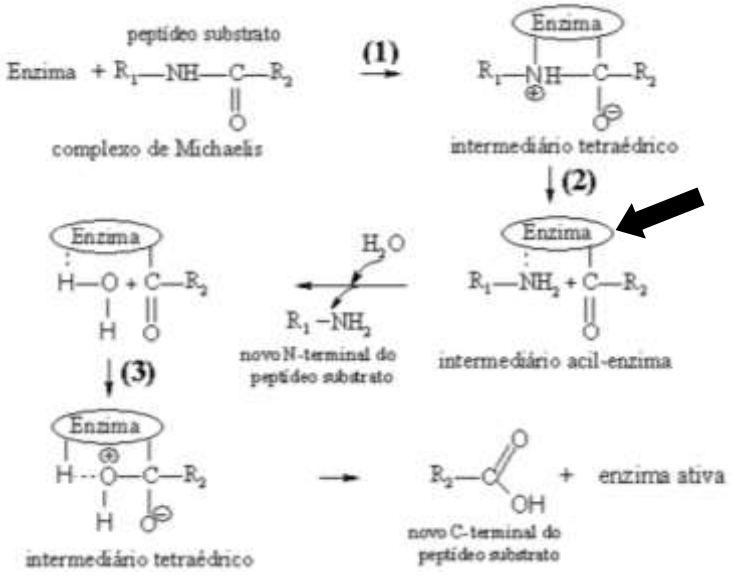

Figura 5. Representação esquemática do mecanismo geral de ação das serinopeptidases. A seta indica a reação na qual o inibidor interfere e reverte (VOET e VOET, 2010).

A interação ocorre em uma região molecular do inibidor definida como sítio reativo, caracterizada por uma alça ligante exposta, responsável pela ligação ao sítio ativo da enzima alvo, o que permite a formação de um complexo fortemente estável, com constantes de dissociação da ordem de 10^{-8} a 10^{-13} M, podendo assim neutralizar a atividade enzimática (BIRK, 2003). Estudos de cristalografia de raios-X e de Ressonância Magnética Nuclear revelaram que cerca de 10-15 resíduos de aminoácidos do inibidor estão em contato com o sítio ativo da protease alvo durante a formação do complexo peptidase-inibidor (BIRK, 2003).

No sítio reativo de um inibidor podemos identificar um resíduo de aminoácido que é especificamente reconhecido pelo sítio de ligação primário da protease alvo, chamado de resíduo P1, e adjacente a este temos o resíduo P1'. A ligação peptídica formada entre estes dois resíduos, chamada de ligação peptídica do sítio reativo, é suscetível à hidrólise durante a formação do complexo peptidase-inibidor (LASKOWSKI e KATO, 1980). O diferencial mais importante dos inibidores em relação à grande maioria dos substratos é que eles possuem

pontes dissulfeto estruturando o sítio reativo. Após a hidrólise da ligação peptídica do sítio reativo, este ainda é mantido sem mudanças conformacionais significativas, graças à presença destas pontes (LASKOWSKI e KATO, 1980; BIRK, 2003).

4.3. Análise estrutural do inibidor com dicroísmo circular

O dicroísmo circular (DC) é uma técnica espectroscópica amplamente usada para a avaliação da conformação e estabilidade de proteínas em várias condições ambientais como temperatura, força iônica e a presença de solutos ou pequenas moléculas (CORRÊA e RAMOS, 2009). DC é a medida da absorbância diferencial entre as duas rotações de luz circularmente polarizadas por uma molécula assimétrica. Essa técnica usa uma fonte de luz, na qual o vetor oscila rotacionalmente para a direita ou para a esquerda, formando uma hélice ao redor do eixo de propagação da luz. É uma técnica não-destrutiva, relativamente fácil de operar, requer pequena quantidade de amostra (1 – 10 mg/mL) e pouca coleção de dados.

Para entender o DC, como qualquer método espectroscópico, é importante se familiarizar com a lei Beer-Lambert. Um feixe de luz com intensidade I_0, passando por uma amostra, é absorvido e continua sua trajetória com intensidade *I*. A absorbância *A* em um comprimento de onda determinado é:

$A = \log_{10} (I_0 / I)$

Sendo que o *A* é relacionado às propriedades físico-químicas da amostra:

$A = \varepsilon \times l \times C$

Onde ε é o coeficiente de extinção (uma propriedade intrínseca da molécula) em $M^{-1}.cm^{-1}$; *l* é o caminho óptico em cm; *C* é a concentração em molar.

Para proteínas os resultados são geralmente expressos em elipsidade molar residual média, [θ], conforme a seguinte equação:

$$[\theta] = (\theta \times 100 \times M) / (C \times l \times n)$$

Onde θ é a elipsidade em graus, *l* é o caminho óptico em cm, *C* é a concentração em mg/mL, *M* é a massa molecular e n é o número de resíduos na proteína. A elipsidade molar residual média [θ] é dada em $g.cm^2.dmol^{-1}$. Esta padronização permite uma comparação independente com resultados obtidos para diferentes proteínas ou de medidas tomadas em diferentes laboratórios ou ainda usando espectropolarímetros diferentes.

O dicroísmo permite a determinação da estrutura secundária de proteínas porque a ligação peptídica é assimétrica e moléculas sem um plano de simetria mostram o fenômeno de dicroísmo circular. O cromóforo amida da ligação peptídica domina o espectro DC de proteínas abaixo de 250 nm. As ligações amida possuem 2 transições eletrônicas de baixa energia que apresentam dicroísmo circular a 215–230 nm e 185–200 nm. Estas duas transições dominam o fenômeno de DC para comprimentos de ondas UV longe (< 240 nm).

Em um espectro de DC típico, a ausência de sinal significa ausência de dicroísmo circular, um sinal negativo significa absorção da luz polarizada circularmente à esquerda e um sinal positivo significa absorção da luz polarizada circularmente à direita. O espectro para todas as proteínas α-hélice têm 2 bandas negativas de magnitude similar a 222 e 208 nm, além de uma banda positiva a aproximadamente 190 nm (Figura 6). A banda a 222 nm está relacionada às fortes ligações de hidrogênio na α-hélice e é relativamente independente do comprimento das hélices. O espectro para uma proteína β-folha possui, em geral, uma banda negativa entre 210–220 nm e uma banda positiva entre 195–200 nm (Figura 6). O espectro

para proteinas β-folha são mais diversificados que aqueles para proteínas helicais porque as β-folhas podem estar como paralelas, anti-paralelas ou em conformações misturadas, ou ainda podem estar retorcidas de muitas formas. O espectro de uma proteína desordenada ou randômica tem uma banda negativa de grande magnitude ao redor de 200 nm (Figura 6).

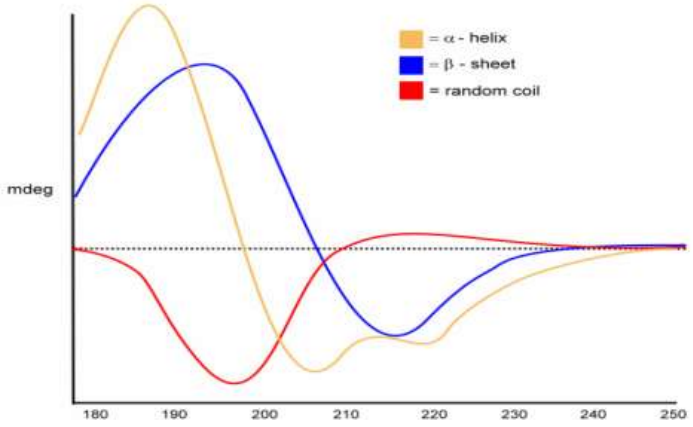

Figura 6. Espectro DC far-UV característico para proteínas α-hélice, β-folha e randomizada.

Em estudos com inibidores, o DC é utilizado principalmente para predição de estrutura secundária (OLIVEIRA *et al.*, 2012) e para verificar a estabilidade conformacional da proteína frente a variações de pH (PRASAD, E. R. *et al.*, 2010b), aquecimento (SCARAFONI *et al.*, 2008) e aos agentes redutores (SINGH e APPU RAO, 2002). Uma análise acerca da estrutura do inibidor de *Dolichos biflorus* e sua interação com as enzimas tripsina e quimotripsina foi realizada utilizando DC (RAMASARMA *et al.*, 1994). Medidas de DC far-UV indicaram a ausência de estrutura helical, 31% de estrutura β e o resto formado por estrutura aperiódica no inibidor de *D. biflorus*. Por comparação das medidas de absorbância do inibidor sozinho e complexado às enzimas, foi possível calcular uma estequiometria de inibição de 1:1 com ambas enzimas.

4.4. Inibidores serinopeptidases da família Bowman-Birk (BBI)

Os BBIs são encontrados em plantas da família Fabaceae (RAGG *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2007) e Poaceae (RAJ *et al.*, 2002; PARK *et al.*, 2004) e se caracterizam por possuírem dois domínios inibitórios localizados em lados opostos da molécula, sendo por essa razão, conhecidos como "inibidores de dupla-cabeça". Em dicotiledôneas, são proteínas de baixo peso molecular, variando de 6 a 9 kDa, sendo caracterizados por 7 pontes dissulfeto altamente conservadas que permitem a formação de uma estrutura assimétrica composta por dois domínios independentes, um capaz de inibir peptidases do tipo tripsinas e o outro com atividade inibitória sobre as tripsinas, quimotripsinas ou elastases (KUMAR *et al.*, 2004). Em monocotiledôneas, estes inibidores apresentam uma variação de peso molecular de 8 a 20 kDa e o número de cisteínas numa mesma molécula pode chegar a 26. Em ambas mono e dicotiledôneas, a porção N-terminal dos genes varia bastante, o que sugere que esta região seja menos importante na interação entre o inibidor e a peptidase (ODANI *et al.*, 1986; MELLO *et al.*, 2003).

As posições P1-P1' dos BBI é o local de ligação do peptídeo ao sítio reativo da peptidase. O resíduo de aminoácido em P1 do primeiro domínio inibitório geralmente é conservado e específico para tripsina, enquanto que o localizado no segundo domínio determina a especificidade dos BBIs quanto a enzima a ser inibida: Arg, Lys ou Ser para tripsina; Leu, Phe, His, Tyr ou Met para quimotripsina; Ala para elastase (LASKOWSKI e KATO, 1980; PRAKASH *et al.*, 1996). A Figura 7 mostra a representação da estrutura de um BBI complexado com duas moléculas de tripsina (CAPALDI *et al.*, 2007).

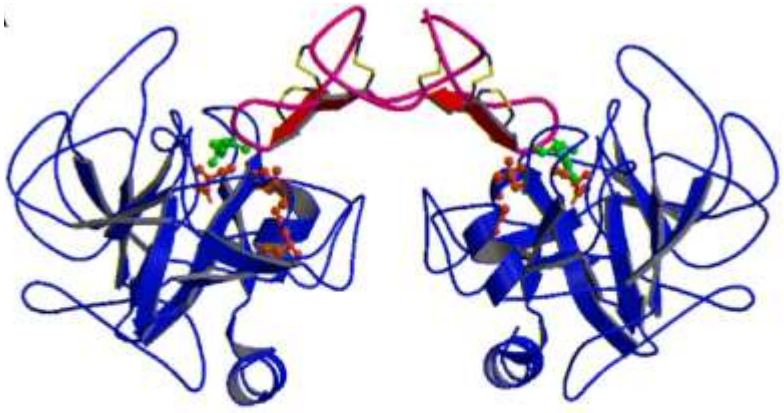

Figura 7. Representação da estrutura do complexo ternário de um inibidor Bowman-Birk de *Medicago scutellata* (vermelho) com duas moléculas de tripsina (azul). As cadeias laterais dos resíduos P1 e P1' do inibidor e os resíduos S1 das moléculas de tripsina estão representados como modelos esféricos (CAPALDI *et al.*, 2007).

A posição P2' é importante na estabilidade do inibidor quanto à hidrólise. A isoleucina em P2' aumenta a estabilidade da molécula quando comparamos com a presença de asparagina, por exemplo. Existem dois pontos importantes na estrutura dos BBIs que os tornam eficientes como inibidores e muito resistentes ao calor, força iônica e pH (MAEDER *et al.*, 1992). O primeiro ponto é a conformação da alça de inibição que é complementar ao sítio ativo da enzima a ser inibida, o que permite uma ligação bastante forte entre enzima e inibidor. O outro é a rigidez estrutural ou conformacional inflexível da alça de inibição atribuída à presença das pontes dissulfeto entre as cisteínas, à presença de pontes de hidrogênio, ao seu tamanho reduzido, à ocorrência de uma ou mais prolinas na alça e, no caso da primeira alça de inibição, uma treonina β-ramifica na posição P2 (Figura 8). Por sua vez, sua estrutura tridimensional apresenta grande estabilidade, garantindo sua atividade mesmo em condições desfavoráveis.

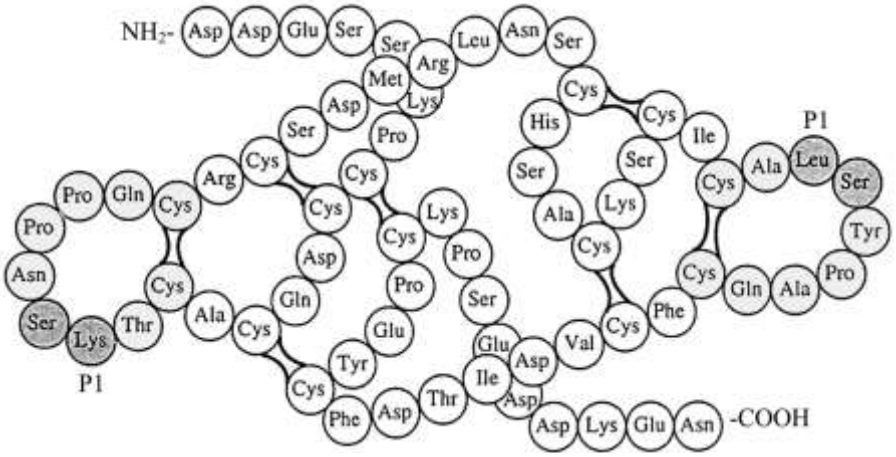

Figura 8. Estrutura primária de um BBI de soja mostrando a organização das sete pontes dissulfeto e os domínios inibitórios. Os nove resíduos que compõem os loops do domínio inibitório estão preenchidos e a posição dos resíduos P1 estão indicados (ODANI e IKENAKA, 1973).

A interação prolongada dos BBIs com proteases na semente pode provocar a quebra de pequenos peptídeos que vão gerar isoformas em quantidades e atividades diferentes. Durante o processo de germinação ocorrem mudanças na composição de isoformas existentes na semente, provavelmente em decorrência a proteólises que resultam em pequenas modificações da composição de aminoácidos (KUMAR *et al.*, 2002). O aparecimento de novas formas de inibidor durante o processo de germinação, concomitante ao desaparecimento de formas provenientes da semente madura, a constatação de inibidores com atividades inibitórias e mobilidades eletroforéticas semelhantes sugerem que as novas formas são resultantes de processamentos proteolíticos a partir do inibidor da semente. A análise da sequência de aminoácidos de vários BBIs demonstra uma grande homologia, com pequenas diferenças encontradas principalmente nas regiões amino e carboxi terminais, indicando modificações por ação de proteases específicas (SREERAMA e GOWDA, 1998).

4.5. BBIs possuem diversas aplicações biotecnológicas

Diversas funções fisiológicas têm sido descritas para os BBIs nas plantas, incluindo reserva de aminoácidos sulfurosos, regulação dos níveis de peptidases endógenas e proteção contra insetos pragas e microrganismos invasores (RAGG *et al.*, 2006; LIOI *et al.*, 2010; PRASAD, E. R. *et al.*, 2010a). Em adição, atividades anti-carcinogênica ou radioprotetora e propriedades imune estimulantes têm sido reportadas (SAMPAIO, C. A. *et al.*, 1996; KUMAR *et al.*, 2004; FANG *et al.*, 2011). Um BBI de 7,5 kDa isolado de feijão fava (*Vicia faba*) inibiu a atividade dos fungos *Mycosphaerella arachidicola*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinérea*, além de exercer atividade inibitória contra transcriptase reversa HIV-1 (YE *et al.*, 2001). A expressão de BBI induzida por herbivoria em folhas de alfafa foi reportado como um exemplo de função anti-pragas para esse inibidor (BROWN *et al.*, 1985).

Estudos *in vivo* em *in vitro* têm demonstrado que BBIs são ativos contra peptidases digestivas de insetos, prejudicando a digestão e, consequentemente, causando um atraso no crescimento e desenvolvimento larval, além de afetar sua sobrevivência (RAHBÉ *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2007; PRASAD, E. R. *et al.*, 2010a). Por esta razão, BBIs são considerados uma ferramenta promissora para o controle de pragas, principalmente em engenharia de plantas, onde a expressão destes inibidores pode ser usada para aumentar a resistência contra insetos fitófagos em cultivos economicamente importantes (POMPERMAYER *et al.*, 2001; FALCO e SILVA-FILHO, 2003). Além disso, peptídeos cíclicos pequenos baseados no sítio reativo dos BBIs são capazes de reter a estrutura e a atividade da região loop da proteína parente, permitindo a produção de inibidores mais potentes e facilmente sintetizados (MCBRIDE *et al.*, 2002).

Um estudo avaliou a eficiência da cana-de-açúcar transgênica expressando IPs de soja das famílias Kunitz e Bowman-Birk em conferir resistência contra *Diatraea sacccharalis*. As larvas alimentadas com folhas da planta transgênica mostraram crescimento reduzido quando comparado com as alimentadas com folhas de plantas não transformadas (FALCO e SILVA-FILHO, 2003).

Atualmente, diversos produtos transgênicos (soja, milho, algodão) contendo proteínas Bt estão disponíveis no mercado, causando um grande impacto na agricultura. As proteínas inseticidas Cry produzidas por subespécies de *Bacillus thurigiensis* são pró-toxinas que necessitam ser processadas por enzimas intestinais do inseto para ter a forma ativa. Após a ingestão, a forma cristalina da proteína é solubilizada no ambiente alcalino do intestino médio (pH 8-10) do lepidóptero, díptero e alguns insetos coleópteros, formando toxinas ativas que se ligarão aos receptores das microvilosidades intestinais. Em seguida, as toxinas se inserem na membrana formando poros, causando um desequilíbrio osmótico que leva à morte os insetos suscetíveis (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002). Todavia, apesar do grande sucesso desta nova classe de bioinseticidas, existe uma preocupação em relação à segurança de proteínas Bt para os mamíferos (VAZQUEZ-PADRON *et al.*, 1999).

Plantas expressando IPs podem ser consideradas como uma tática adicional para o controle de insetos-praga com maior especificidade que os inseticidas convencionais, além de serem compatíveis com os princípios do manejo integrado de pragas (PAOLETTI e PIMENTEL, 2000), pois possibilitam um controle mais ecológico destas. Entretanto, estes inibidores devem ser selecionados levando-se em consideração a fisiologia e a bioquímica de sua digestão pelo inseto (FRIZZAS e OLIVEIRA, 2006).

É importante também fazer uso de combinações desses inibidores com outras proteínas que induzem estresse ou inibem o crescimento dos insetos a serem controlados, ou por combinações desses inibidores que cobrem o espectro de peptidases intestinais, o que dificultará a capacidade de adaptação dos insetos pelo simples aumento da expressão de genes de peptidases insensíveis aos inibidores (PAULILLO *et al*., 2000).

CAPÍTULO 3

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO INIBIDOR (CFPI)

I. OBJETIVOS

Este capítulo tem como objetivos:

- Purificar um inibidor de peptidase serínica de sementes de *C. fairchildiana*;

- Realizar sua caracterização físico-química, através de técnicas cromatográficas, eletroforéticas, por espectrometria de massas e sequenciamento N-terminal;

- Determinar sua estequiometria de inibição para tripsina e quimotripsina bovinas, assim como os parâmetros cinéticos (constante de inibição e tipo de inibição);

- Analisar a estabilidade do inibidor submetendo-o a condições variadas de pH e temperatura, bem como a diferentes concentrações do agente redutor ditiotreitol (DTT);

- Através de ensaios de dicroísmo circular, verificar possíveis alterações na estrutura secundária do inibidor submetido ao aquecimento ou após incubação com DTT.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Espécie vegetal

Sementes de *C. fairchildiana* (Fabaceae) foram coletadas entre os meses de março a abril de 2011 na Unicamp (localização: -22.820179,-47.069261). Os frutos secos maduros foram colhidos e as sementes foram lavadas e secas em temperatura ambiente antes de serem acondicionadas em freezer a – 20 °C. A Figura 9 apresenta a árvore, flores e frutos de *C. fairhildiana*.

2. Reagentes

2.1. Enzimas

Tripsina e quimotripsina de pâncreas bovino foram adquiridas da Sigma Chemical Company.

2.2. Substratos

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

Figura 9. *Clitoria fairchildiana* RA Howard: A. árvore, B. flor, C. fruto verde, D. sementes. Foto (A) de Dantzger, M.; Fotos B-D de clickmudas (www.clickmudas.com.br).

2.3. Resinas

As resinas de exclusão molecular Sephadex G-75 e Superdex 75, assim como a de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose CL-4B, foram adquiridas da GE Healthcare (Uppsala, Suíça).

A massa molecular relativa (M_r) das frações coletadas na Superdex 75 foi determinada através do gráfico de logM_r x V_e/V_0, onde V_e corresponde ao volume de eluição da proteína e V_0 é o volume de exclusão do azul de dextrano (Figura 10).

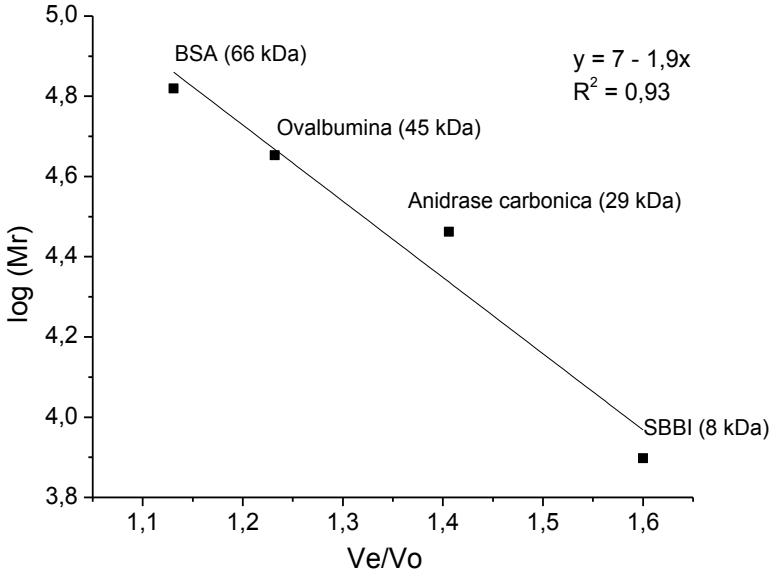

Figura 10. Curva de calibração de massa molecular da Superdex 75. A coluna foi equilibrada e eluída com tampão fosfato 20 mM, pH 7,2. Frações de 1 mL foram coletadas num fluxo de 48 mL/h. A detecção das proteínas foi acompanhada a 280 nm.

3. Procedimento experimental

3.1. Isolamento e purificação do inibidor de peptidase de C. fairchildiana (CFPI)

3.1.1. Obtenção da farinha de sementes de C. fairchildiana

As sementes maduras foram inicialmente submetidas a um processo de desidratação em estufa à 40 °C por 24 horas para facilitar a retirada das cascas. Posteriormente, as cascas foram retiradas manualmente e as polpas das sementes foram subsequentemente trituradas em moinho elétrico a 27.000 rpm. A farinha obtida foi submetida ao processo de delipidação com hexano. Ao final da delipidação, a farinha foi depositada em uma bandeja plástica revestida com papel filtro para que houvesse a completa volatilização do solvente.

3.1.2. Obtenção do extrato bruto

A farinha delipidada foi submetida a extração proteica com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6, na proporção de 1:10 (p/v), sob agitação constante overnight em temperatura de 4 °C. Em seguida, o material foi centrifugado a 5.000 rpm a 4 °C durante 30 minutos para a separação do sobrenadante. O extrato bruto (EB) presente no sobrenadante foi dialisado por 24 horas contra água destilada a 4 °C, liofilizado e utilizado nas etapas posteriores de purificação do inibidor.

3.1.3. Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephadex G-75

Uma amostra de extrato bruto (300mg) foi dissolvida em 3mL de tampão fosfato 0,1 M, NaCl 0,1 M, pH 7,6, sonicada por 5 minutos e centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos para clarificação. Posteriormente, a amostra foi aplicada em uma coluna de exclusão molecular Sephadex G-75 (3,0 x 80 cm), previamente equilibrada com o mesmo tampão usado para dissolver o EB. Foram coletadas frações de 3,0 mL por tubo, em um fluxo de 12 mL por hora. A detecção de proteínas foi feita em espectrofotômetro a 280nm. Por fim, determinou-se a atividade inibitória (antitríptica) das frações.

3.1.4. Cromatografia de interação hidrofóbica em coluna Phenyl Sepharose CL 4-B

A fração que apresentou atividade antitríptica na exclusão molecular foi dialisada, liofilizada e aplicada (10 mg) em uma coluna de interação hidrofóbica Phenyl Sepharose (1,5 x 9,0 cm), equilibrada inicialmente com o tampão de ligação (fosfato de sódio 20 mM com 0,4M sulfato de amônio, pH 7,2). A eluição das proteínas foi conduzida em um gradiente de concentração (0 a 20 mM) do tampão fosfato de sódio pH 7,2, num fluxo de 72 mL/h. Determinou-se o perfil cromatográfico utilizando um comprimento de onda de 220 nm, e foi separada a fração que apresentou atividade antitríptica.

3.1.5. Cromatografia de gel filtração em coluna Superdex 75

A terceira fração eluída com 10mM de tampão fosfato na coluna de interação hidrofóbica, denominada P3, foi dializada, liofilizada e aplicada (10mg) em uma coluna Superdex 75 (1,0 x 25 cm) acoplada ao sistema AKTA Purifier, equilibrada com tampão fosfato 20 mM, pH 7,2 e com fluxo de 48 mL/h. Foi monitorado o perfil cromatográfico utilizando um comprimento de onda de 280 nm e a fração com atividade anti-tríptica foi coletada, dialisada e liofilizada.

3.2. Quantificação de Proteínas

Todas as frações obtidas no processo de purificação tiveram seu conteúdo proteico quantificado conforme o método desenvolvido por Bradford (1976), utilizando soro albumina bovina como padrão a 1 mg/mL.

3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (PAGE-SDS) foi realizada seguindo-se a metodologia descrita por Laemmli (1970). As placas de poliacrilamida foram feitas de modo descontínuo: apresentaram um gel de concentração de 5% e um gel de corrida de 15%. As placas foram preparadas utilizando-se uma solução de acrilamida estoque. O gel de concentração 5% foi preparado utilizando-se o tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e o gel de corrida foi feito com tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8. Em ambos os géis foram

acrescentados 0,1% (v/v) de SDS 20%. A PAGE-SDS foi realizada em um sistema duplo de mini placas SE 250 Mighty Small II (Hoefer Scientific Instruments). As amostras e os marcadores de massa molecular foram dissolvidos em tampão de amostra (Tris-HCl, 0,075 M, pH 6,8; 10% de glicerol; 4% de SDS; 0,001% de azul de bromofenol). As proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular foram: fosforilase (94 kDa), albumina sérica bovina (67 kDa), ovalbumina (43 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina de soja (20 kDa) e α-lactoalbumina (14 kDa). A corrida eletroforética foi realizada com corrente constante (30 mA) e voltagem livre. Os géis foram corados com solução de Coomassie Blue 0,05 % a 37 °C overnight e o excesso de corante removido em ácido acético 7%.

3.4. Caracterização do inibidor de peptidase de C. fairchildiana

3.4.1. Determinação da massa acurada por espectrometria MALDI-TOF

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

3.4.2. Determinação e análise da sequência N-terminal

O método de degradação automático desenvolvido por Edman (1950) foi utilizado para determinar a sequência da porção N-terminal do inibidor CFPI. 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 foi composto de 3 etapas: acoplamento de fenilisotiocianato (PITC) ao resíduo N-terminal; clivagem do resíduo por ciclização em meio ácido; conversão do derivativo tiazolinona (ATZ) formado, para um derivado mais estável, a tioidantoína (PTH), que pode ser identificado por cromatografia. A amostra foi submetida a sequenciamento automático em sequenciador de proteínas de fase gasosa Shimadzu PPSQ-10. Os aminoácidos processados foram identificados a 269 nm após a separação em coluna C-18 (4,6 mm x 2,5 mm) sobre condições isocráticas. 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).

3.4.3. Atividade inibitória para a tripsina bovina

A atividade inibitória para a tripsina bovina foi determinada pela medida da atividade hidrolítica residual da mesma para o substrato BApNA (Nα–benzoil–DL–arginina–4–nitroanilida hidroclorido), seguindo a metodologia desenvolvida por Elanger *et al.* (1961). Alíquotas de 4 µL de tripsina (0,25 mg/mL) foram incubadas com diferentes concentrações do inibidor em volumes variáveis de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Após 15 minutos de incubação à 37 °C, foi adicionado 200 µL de BApNA a 1mM, completando um volume final de 270 µL/poço. O ensaio foi conduzido por um período total de 30 minutos. As mudanças na absorbância a 410 nm, após subtrair a leitura do tampão como branco, foram detectadas no leitor de microplacas VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices).

3.4.4. Atividade inibitória para a quimotripsina bovina

Um ensaio similar ao da tripsina bovina foi preparado para determinar a atividade inibitória para a quimotripsina. Para isso foi utilizado o substrato SAAPFpNA (N–Succinil–Ala–Ala–Pro–Phe–p–nitroanilida), conforme metodologia desenvolvida por Delmar *et al.* (1979). Alíquotas de 10 µL de quimotripsina (0,5 mg/mL) foram incubadas com diferentes concentrações do inibidor em volumes variáveis de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0. Após 15 minutos de incubação à 37 °C, foi adicionado 20 µL de SAAPFpNA a 1mM, completando um volume final de 120 µL/poço. O ensaio foi conduzido por um período total de 5 minutos. As mudanças na absorbância a 410 nm, após subtrair a leitura do tampão como branco, foram detectadas no leitor de microplacas VersaMax Microplate Reader (Molecular Devices).

3.4.5. Estequiometria de inibição

A relação estequiométrica entre CFPI/tripsina e CFPI/quimotripsina foi determinada a partir da incubação por 10 minutos à 37 °C de uma concentração fixa de enzima (4 µM para tripsina e 200 µM para quimotripsina) com concentrações crescentes do inibidor (de 0,01 a 0,08 mM para tripsina; de 0,1 a 0,8 mM para quimotripsina). Decorrido o tempo descrito, adicionou-se o substrato e a reação ocorreu durante 30 minutos para tripsina e 5 minutos para a quimotripsina. A hidrólise do substrato foi acompanhada a 410 nm no leitor de microplacas, a fim de determinar a atividade residual das enzimas no ensaio. Com a intenção de verificar a complexação do inibidor com ambas as enzimas na razão molar de 1:1:1, CFPI foi incubado à 37 °C por 30 minutos com tripsina e quimotripsina na proporção molar de 1:1 (CFPI:enzima). Em seguida, a atividade residual de ambas as enzimas foi determinada após adição de substrato.

3.4.6. Determinação da constante de inibição

A constante de inibição (Ki) foi determinada para a tripsina e quimotripsina, pré-incubando a respectiva enzima com concentrações crescentes de CFPI (0,05 e 0,1 nM) durante 15 minutos, seguida pelo incubação à 37 °C com diferentes concentrações (0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 0.625 e 0.75 mM) de BApNA ou SAAPFpNA, respectivamente. O tempo de incubação após a adição de substrato foi de 30 minutos para BApNA e 5 minutos para SAAPFpNA. O valor de Ki foi calculado a partir do gráfico de Lineweaver-Burk, utilizando o programa SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose, CA).

3.5. Estudos de estabilidade de CFPI

3.5.1. Estabilidade térmica

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

3.5.2. Estabilidade a variação de pH

Para determinar a estabilidade a variações de pH, o inibidor foi diluído no mesmo volume em diferentes tampões com a mesma concentração molar (100 mM): glicina-HCl (pH 2-3), acetato de sódio (pH 4-5), fosfato de sódio (pH 6-7), Tris-HCl (pH 8) e glicina-NaOH (pH 9-10). Após a incubação por 60 minutos à 37 °C em cada tampão, o pH de todas as alíquotas foi ajustado para pH 8,0 para se determinar a atividade inibitória através do ensaio de inibição para a tripsina e quimotripsina, conforme anteriormente descrito. Para cada valor de pH, 6 replicatas foram preparadas, sendo os resultados expressos como média ± desvio padrão.

3.5.3. Estabilidade ao agente redutor DTT

CFPI foi incubado com DTT em diferentes concentrações finais: 0,25 a 1,0 mM. A reação foi interrompida pela adição de iodoacetamida, duas vezes a concentração final de DTT. Durante a incubação à 37 °C, alíquotas foram retiradas em intervalos de tempo de 15, 30, 60 e 120 minutos para cada concentração avaliada. Para todos os intervalos, um controle sem DTT foi feito. Após incubação, as alíquotas foram submetidas aos ensaios de atividade inibitória. Os resultados foram expressos como a média de 6 replicatas ± desvio padrão.

3.6. Dicroísmo circular de CFPI

As medidas de dicroísmo circular foram realizadas no Instituto de Química, Unicamp, em um espectropolarímetro JASCO J-720, usando uma cuveta de quartzo de caminho óptico de 1 mm. CFPI foi utilizado numa concentração de 0,1 mg/mL, dissolvido em tampão fosfato de sódio pH 7,3. Para analisar possíveis alterações estruturais no inibidor, foram realizadas medidas de DC entre 190-260 nm para CFPI nativo e CFPI tratado com 1 mM DTT por 1 hora. O espectro obtido foi o resultado de 10 acumulações descontado de seus respectivos brancos. Uma curva de desnaturação-renaturação foi obtida por aquecimento da amostra de CFPI nativo de 20 à 90 °C a uma taxa de 1 °C/minuto. O resfriamento de 90 para 20 °C deu-se imediatamente após a amostra alcançar a mais alta temperatura do ensaio. Um controlador de temperatura do tipo peltier (Jasco PTC 423S/15) foi utilizado e a medida de DC foi obtida a 207 nm, como um resultado de 10 acumulações.

III. RESULTADOS

1. Purificação de CFPI

1.1 Cromatografia em coluna Sephadex G-75

O extrato bruto obtido da farinha de sementes apresentou atividade inibitória contra tripsina bovina, e portanto, foi aplicado em uma coluna de exclusão molecular Sephadex G-75, no qual resultou em 4 picos bem definidos (Figura 11). Somente o segundo pico, denominado G-2, foi capaz de inibir a tripsina.

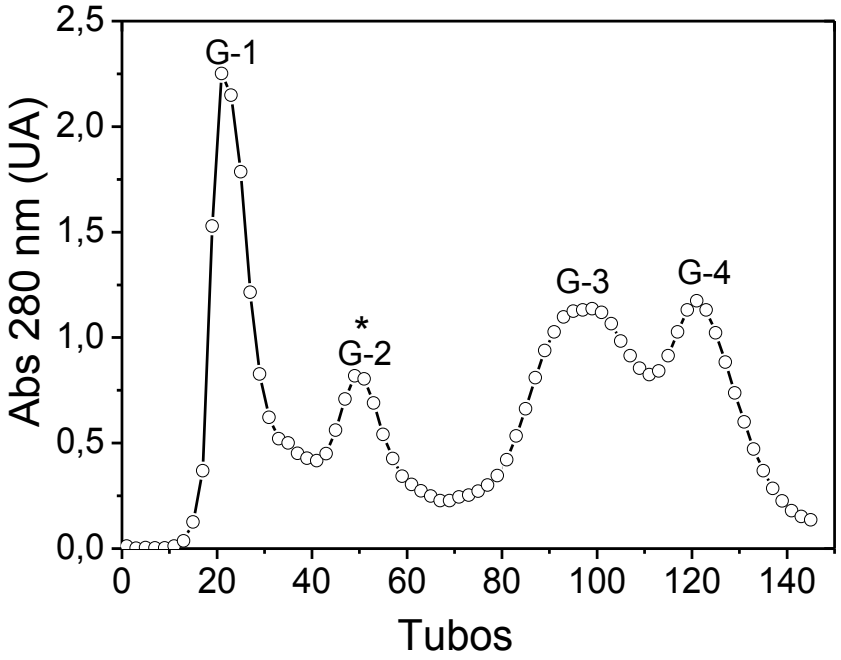

Figura 11. Perfil cromatográfico do EB aplicado em coluna Sephadex G-75 (3 x 80 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1 M com 0,1 M de NaCl, pH 7,6. Frações de 3 mL foram coletadas num fluxo de 12 mL/h. A detecção das proteínas foi acompanhada a 280 nm. A fração que apresentou atividade inibitória está evidenciada por asterisco.

1.2 Cromatografia em coluna Phenyl-sepharose

Após diálise e liofilização, a fração G-2 foi utilizada no passo de purificação subsequente, uma cromatografia de interação hidrofóbica em coluna de Phenyl-Sepharose CL-4B. O perfil cromatográfico mostra a presença de 5 picos de proteínas resultantes (Figura 12), sendo o terceiro pico (P-3), eluído com 100% de fosfato de sódio 20 mM pH 7,2, constituído de atividade inibitória. Este foi dialisado, liofilizado e utilizado na etapa seguinte de purificação.

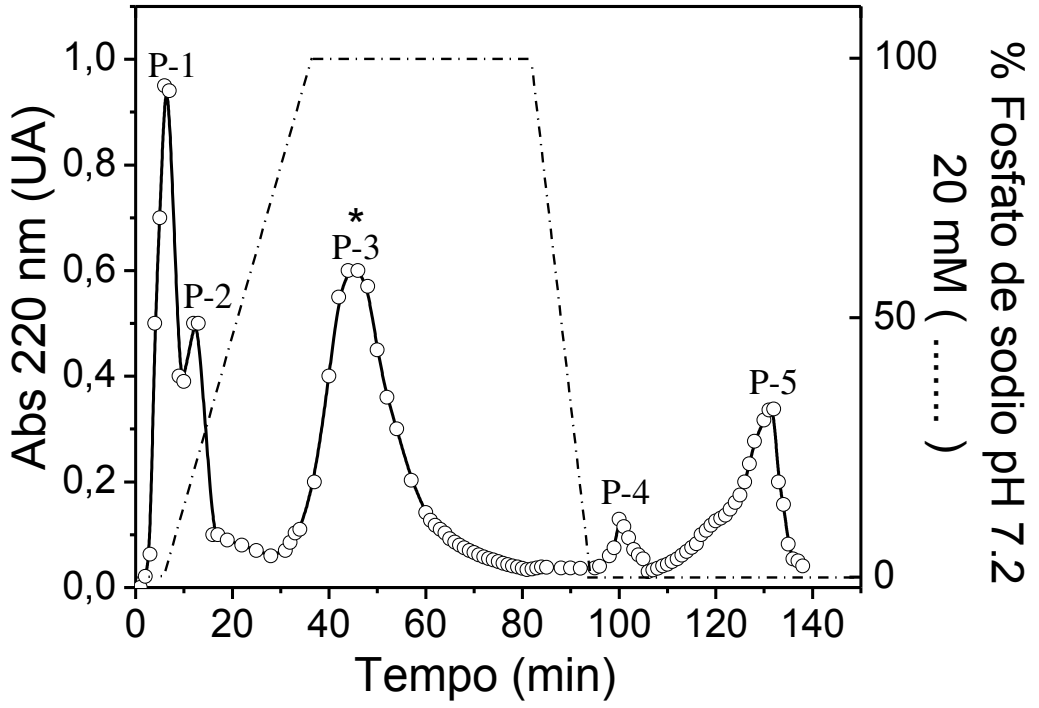

Figura 12. Perfil cromatográfico da fração G-2 aplicada em coluna Phenyl-Sepharose CL-4B (1,5 x 9 cm), equilibrada com tampão de ligação (fosfato de sódio 20 mM com sulfato de amônio 0,4 M pH 7,2). Frações de 1 mL foram eluídas com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2 num fluxo de 72 mL/h. A detecção das proteínas foi acompanhada a 220 nm. A fração que apresentou atividade inibitória está evidenciada por asterisco.

1.3 Cromatografia em coluna Superdex

A fração P-3 foi aplicada em uma coluna de gel filtração Superdex 75 e o cromatograma apresentou dois picos de proteínas, S-1 e S-2, sendo este último pico majoritário com atividade inibitória (Figura 13). A fração S-2 foi dialisada e liofilizada, e consequentemente denominada CFPI.

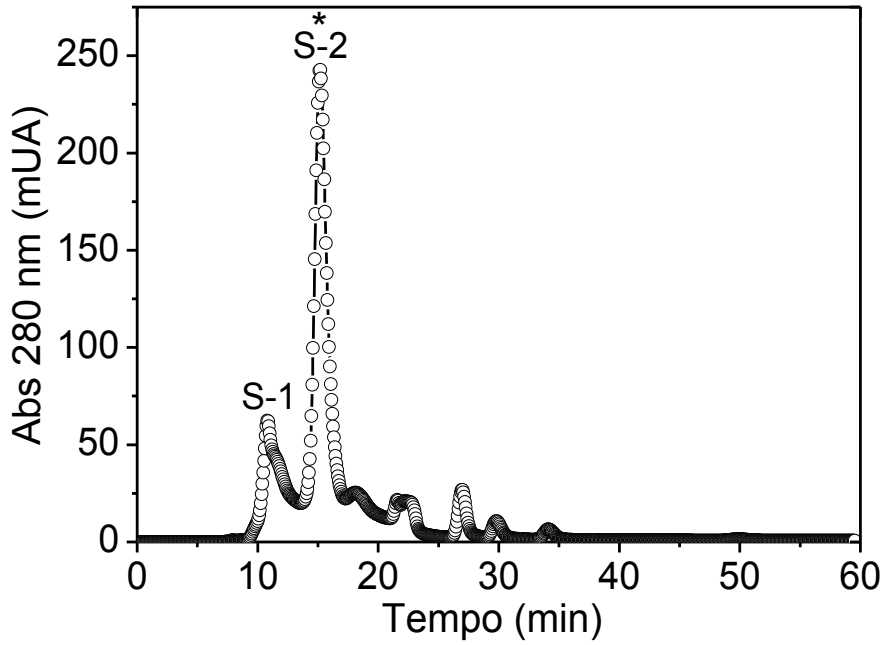

Figura 13. Perfil cromatográfico da fração P-3 aplicada em coluna Superdex 75 (1,0 x 25 cm), equilibrada com tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,2. Frações de 1 mL foram coletadas num fluxo de 48 mL/h. A detecção das proteínas foi acompanhada a 280 nm. A fração que apresentou atividade inibitória está evidenciada por asterisco.

1.4 Tabela de purificação do inibidor

Os procedimentos de purificação mostraram-se eficientes, desde que CFPI teve um rendimento de 21,2% e foi purificado 17 vezes, conforme verificado na Tabela 1.

Tabela 1. Passos de purificação de CFPI

Passos	Proteína total (mg)	Atividade inibitória total (UI*) × 10^9	Atividade específica (UI/mg) × 10^5	Rendimento (%)	Purificação (vezes)
EB	24000	1.45	0.6	100	1,0
G–75	4280	1.41	3.3	97,2	5,5
Phenyl–Sepharose	1207.6	0.672	5.5	46,3	9,17
Superdex 75	301.9	0.308	10.2	21,2	17

* Uma unidade inibitória (UI) foi definida como a quantidade de inibidor que diminui a absorbância em 0,01 a 410 nm.

2. Eletroforese da purificação em gel de poliacrilamida contendo SDS

A pureza e o perfil das frações proteicas obtidas das etapas de purificação foram analisadas através de gel de eletroforese 15% (PAGE-SDS), o qual está exibido na Figura 14. Observamos que CFPI apresentou uma única cadeia polipeptídica com massa molecular aparente de 15 kDa sob condições não-redutoras.

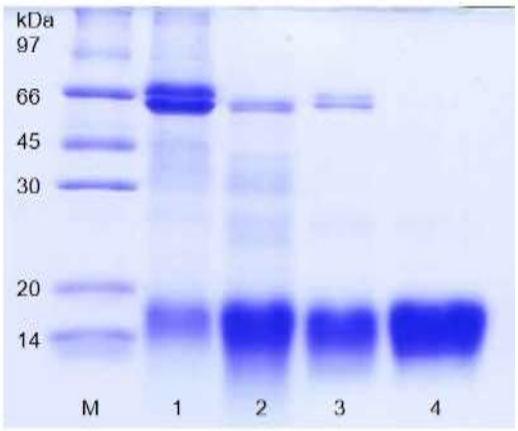

Figura 14. PAGE-SDS 15% das frações oriundas das etapas de purificação. (M) Marcadores de peso molecular; (1) EB; (2) G-2; (3) P-3; (4) S-2.

3. Caracterização do inibidor de peptidase de C. fairchildiana

3.1. Determinação da massa acurada por espectrometria MALDI-TOF

Uma análise mais acurada realizada por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF revelou a massa exata de CFPI, sendo o pico majoritário de 7973,14 Da obtido em coluna C-18 (Figura 15), evidenciando que a massa molecular anteriormente obtida por eletroforese se trata de uma forma dimérica.

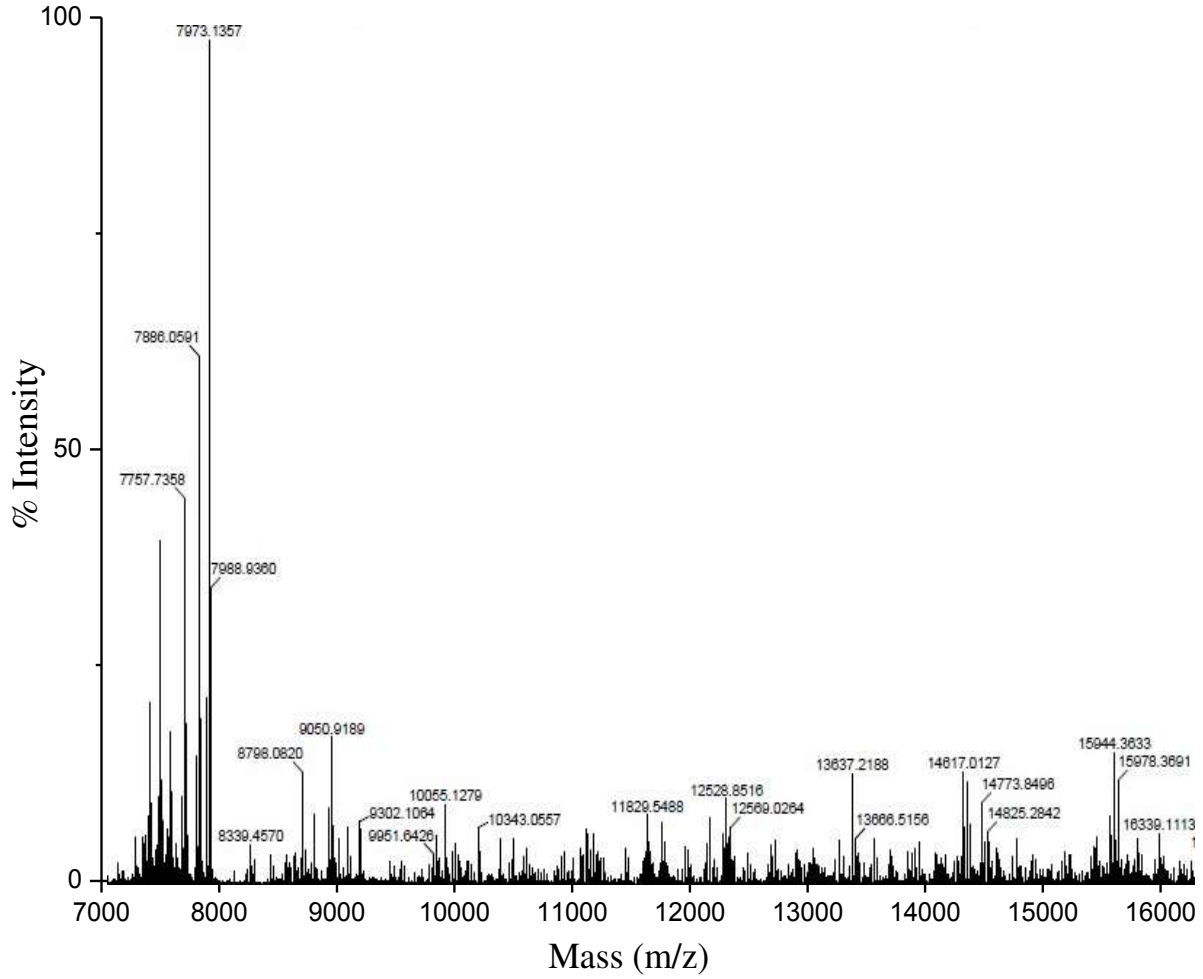

Figura 15. Perfil do espectro de CFPI por espectrometria de massas MALDI-TOF.

3.2. Determinação e análise da sequência N-terminal

O alinhamento da sequencia N-terminal de CFPI com outros IPs, utilizando o banco de dados NCBI-BLAST, revelou uma homologia entre CFPI e diversos inibidores da família Bowman-Birk (Tabela 2).

Tabela 2. Alinhamento da sequência N-terminal de CFPI com outros BBI. B2RG94, *Phaseolus zimapanensis* (LIOI *et al.*, 2010)*;* MBTI-F, *Vigna radiata* (WILSON e CHEN, 1983); IBB2-PHANN, *Phaseolus angularis* (YOSHIDA e YOSHIKAWA, 1975); G7L3N0, *Medicago truncatula* (YOUNG *et al.*, 2011); A4Q9H4, *Phaseolus maculatus* (LIOI *et al.*, 2010); LaBBI, *Lupinus albus* (SCARAFONI *et al.*, 2008). Resíduos idênticos estão destacados em cinza escuro e as substituições conservadas em cinza claro. As letras brancas sob um fundo negro mostram o resíduo P1 no sítio anti-quimotripsina.

Proteína	Sequências primárias																											Identidade (%)
CFPI	S	I	P	A	Q	C	H	C	A	D	L	R	F	G	S	C	H	S	A	C	K	S	C	V	C	T	F	
B2RG94*	S	I	P	P	Q	C	H	C	S	D	L	R	L	N	S	C	H	S	A	C	K	S	C	I	C	T	F	81,5
MBTI-F	S	I	P	P	Q	C	H	C	A	D	I	R	L	N	S	C	H	S	A	C	K	S	C	M	C	T		80,8
IBB2-PHANN	S	I	P	P	Q	C	Q	C	A	D	I	R	L	D	S	C	H	S	A	C	K	S	C	M	C	T		76,9
G7L3N0*	S	I	P	P	Q	C	H	C	T	D	I	G	–	E	T	C	H	S	A	C	K	S	C	L	C	T		72,0
A4Q9H4*	S	I	P	P	I	C	Q	C	S	D	I	R	L	N	S	C	H	S	A	C	K	S	C	M	C	T		69,2
LaBBI	S	I	P	P	Q	C	R	C	T	D	I	G	–	E	T	C	H	S	A	C	K	S	C	I	C	T		68,0

* Nome da proteína de acordo com o banco de dados UniProtKB.

3.3. Estequiometria de inibição

Uma análise da atividade inibitória de CFPI contra tripsina e quimotripsina, determinada com os substratos BApNA e SAAPFpNA, respectivamente, mostrou inibição considerável contra ambas as peptidases. A curva estequiométrica de CFPI foi determinada separadamente para a tripsina e quimotripsina (Figura 16). Na relação de 1:2 (CFPI:enzima),

a atividade da quimotripsina foi reduzida em 83%, enquanto a atividade da tripsina, diminuiu 75%. A partir da análise da Figura 16, observamos que aproximadamente 100% da atividade enzimática de ambas as enzimas foi inibida quando a proporção molar alcançou 1:1 (CFPI:enzima). A pré-incubação do inibidor com ambas as peptidases no meio de reação, numa razão molar de 1:1 (CFPI:enzima) resultou na inibição completa da atividade da tripsina e quimotripsina, conforme verificado na Figura 17.

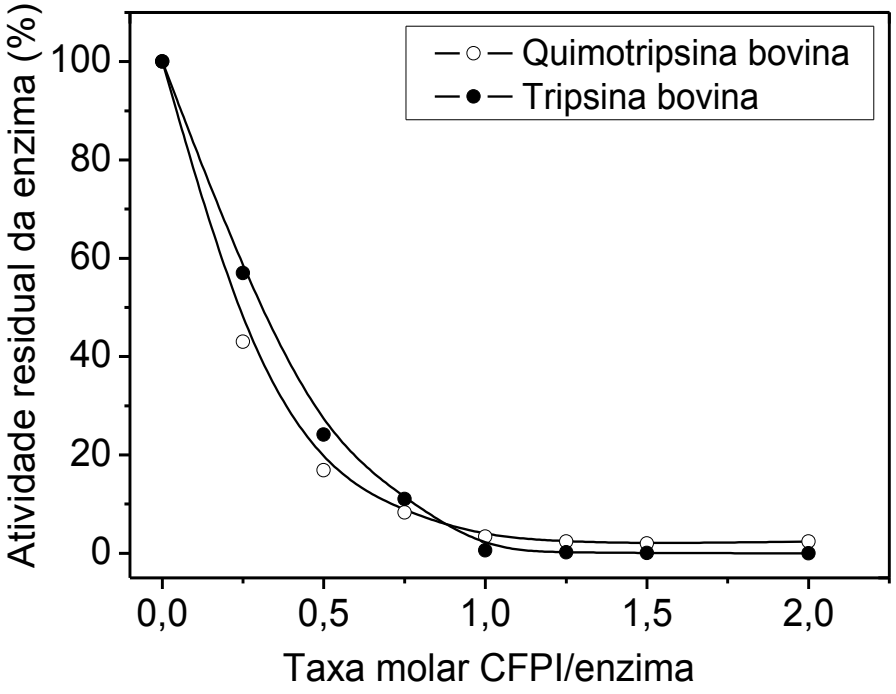

Figura 16. Curva de inibição da quimotripsina e tripsina bovinas por CFPI. As enzimas foram separadamente pré-incubadas (10 min, 37 °C, Tris-HCl 50 mM pH 8) com concentrações crescentes de inibidor. A atividade residual da tripsina foi determinada com BApNA, e da quimotripsina com SAAPFpNA, sendo ambos os substratos a 1 mM.

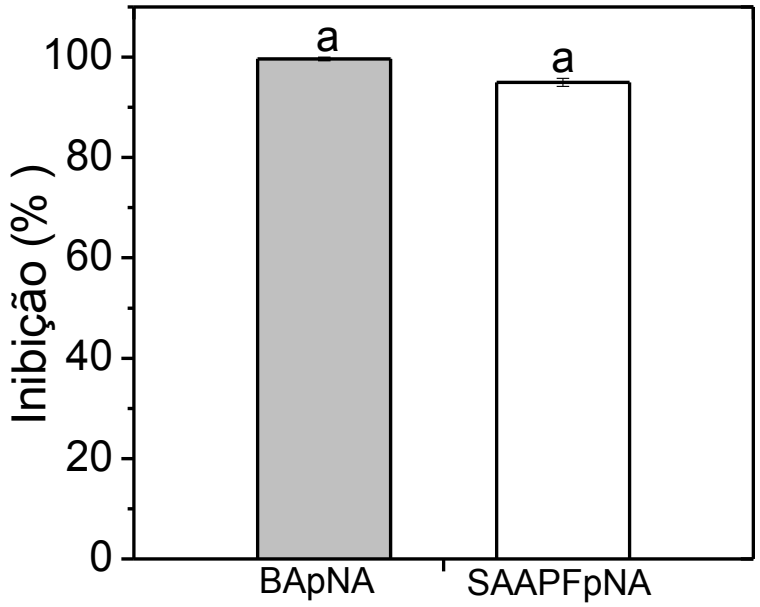

Figura 17. Inibição da quimotripsina e tripsina bovinas pré-incubadas (30 min, 37 °C, Tris-HCl 50 mM pH 8) com CFPI, concomitantemente, na proporção molar de 1:1:1. A atividade residual da tripsina foi determinada com BApNA, e da quimotripsina com SAAPFpNA, sendo ambos os substratos a 1 mM. A mesma letra significa que não houve diferença estatística entre os grupos para o teste de Tukey, sendo p>0,05.

3.4. Determinação da constante de inibição

O gráfico de Lineweaver-Burk de CFPI mostrou inibição do tipo competitiva para a tripsina (Figura 18) e quimotripsina (Figura 19), uma vez que o valor de velocidade máxima, determinado pela intersecção das retas no eixo y, foi o mesmo para a enzima controle e incubada com o inibidor. Além disso, as retas tiveram diferentes valores de Km aparente, determinado pela intersecção das retas no eixo x. A constante de inibição (Ki) contra tripsina e quimotripsina, calculada pelo programa SigmaPlot a partir do gráfico de Lineweaver-Burk, foi de 3,3 x 10^{-10} M e 1,5 x 10^{-10} M, respectivamente.

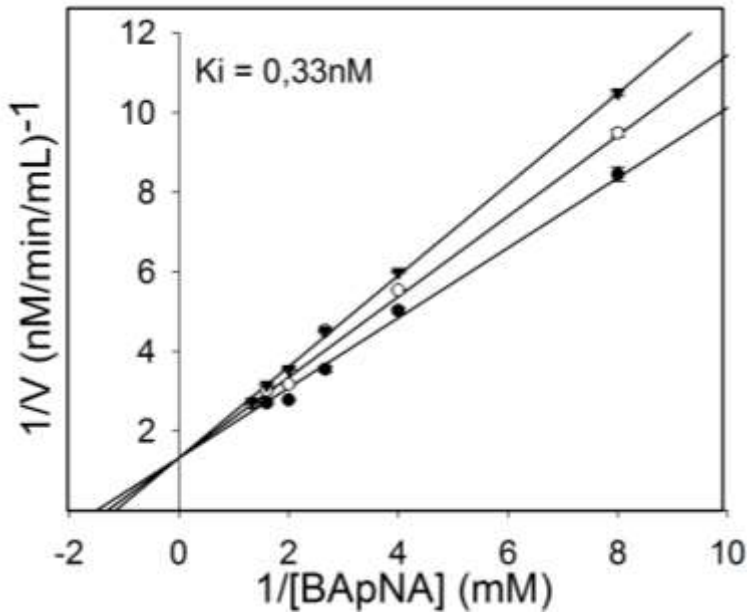

Figura 18. Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação da constante de inibição (Ki) para a tripsina frente a 2 concentrações diferentes de CFPI. As concentrações finais do inibidor foram (○) 0,05 nM e (▼) 0,1 nM.

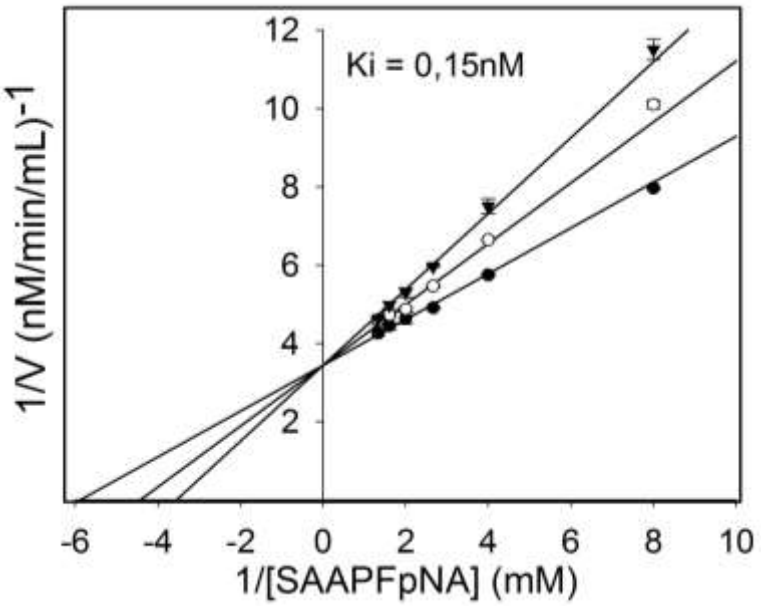

Figura 19. Gráfico de Lineweaver-Burk para a determinação da constante de inibição (Ki) para a quimotripsina frente a 2 concentrações diferentes de CFPI. As concentrações finais do inibidor foram (○) 0,05 nM e (▼) 0,1 nM.

4. Estudos de estabilidade de CFPI

4.1. Estabilidade térmica

O estudo dos efeitos da temperatura sobre a atividade de CFPI mostrou que o inibidor foi bastante estável, pois manteve aproximadamente 92% de inibição da tripsina após incubação por 30 minutos à 100 °C. Entretanto, a atividade inibitória de CFPI contra a quimotripsina foi mais suscetível que para a tripsina. Sob as mesmas condições descritas acima, CFPI inibiu a quimotripsina em cerca de 76%, conforme observado na Figura 20.

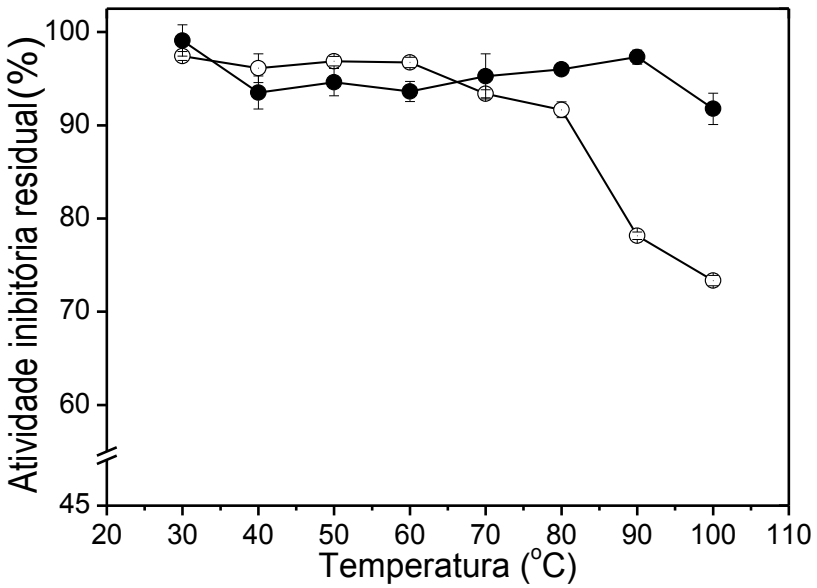

Figura 20. Efeito da temperatura sobre a estabilidade de CFPI para a tripsina (●) e quimotripsina (○) bovinas. O inibidor foi incubado em diferentes temperaturas (37 a 100 °C) por 30 min e, em seguida, foi resfriado em gelo e determinou-se sua atividade residual para tripsina e quimotripsina. Foram realizadas 6 replicatas para cada valor de temperatura. Os resultados foram representados como média ± desvio padrão.

4.2. Estabilidade a variação de pH

CFPI apresentou atividade inibitória ótima contra tripsina e quimotripsina em pH 8, como pode-se observar na Figura 21. Além disso, a atividade inibitória de CFPI contra ambas enzimas foi estável em outros valores de pH (2-10), com uma perda marginal de 14% e 9,5% na inibição da tripsina e quimotripsina, respectivamente, em valores de pH baixos (Figura 21). Em valores de pH elevados, CFPI perdeu somente 12% de sua atividade contra quimotripsina e 6% de sua habilidade de inibir tripsina.

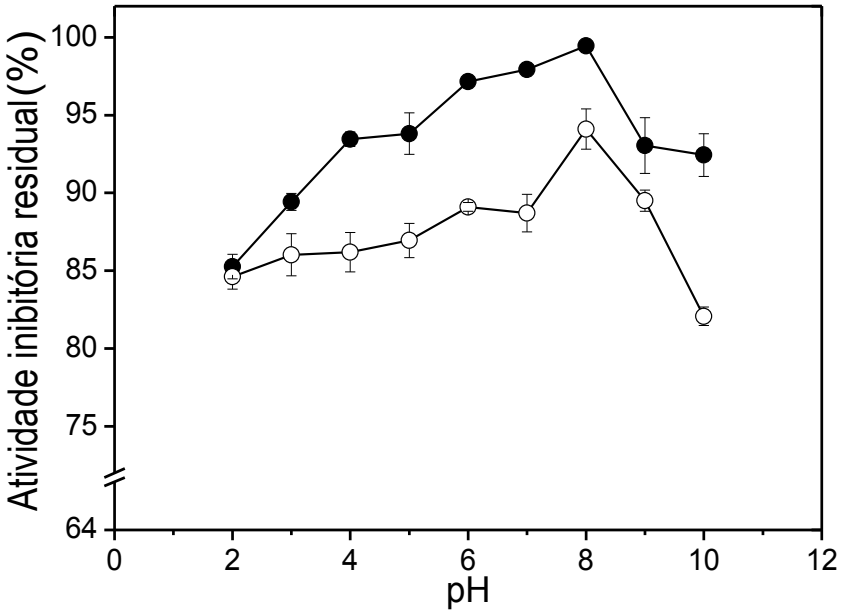

Figura 21. Efeito da variação de pH sobre a estabilidade de CFPI para a tripsina (●) e quimotripsina (○) bovinas. O inibidor foi incubado em diferentes tampões com a mesma concentração molar (100 mM) por 60 min à 37 °C e, em seguida, o pH foi ajustado e determinou-se sua atividade residual para tripsina e quimotripsina. Foram realizadas 6 replicatas para cada valor de pH. Os resultados foram representados como média ± desvio padrão.

4.3. Estabilidade ao agente redutor DTT

Em períodos de incubação curtos, a atividade inibitória de CFPI contra tripsina e quimotripsina foi discretamente afetada após incubação com diferentes concentrações de DTT. A atividade inibitória para ambas as enzimas reduziu aproximadamente 15% a 1 mM de DTT por 15 minutos (Figuras 22 e 23). Todavia, períodos prolongados de incubação resultou em maior redução na atividade inibitória. A presença de DTT reduziu a capacidade de CFPI em inibir a tripsina mais que a quimotripsina. A inibição da tripsina por CFPI reduziu em 77% após incubação com DTT a 1 mM durante 120 minutos (Figura 22), ao passo que a atividade inibitória contra a quimotripsina diminuiu 41% sob as mesmas condições (Figura 23).

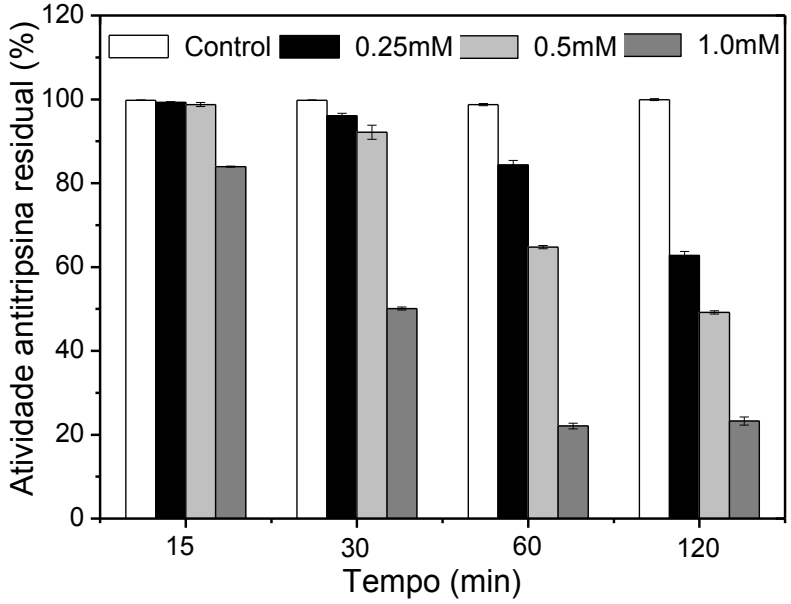

Figura 22. Efeito do DTT sobre a estabilidade de CFPI para a tripsina bovina. Diferentes concentrações de DTT (0,25 a 1mM) foram incubadas com CFPI à 37 °C em diferentes intervalos de tempo. A reação foi interrompida com iodoacetamida. Após a incubação, alíquotas foram retiradas para cada concentração avaliada e

submetidas aos ensaios de atividade inibitória. Os resultados foram representados como média de 6 replicatas ± desvio padrão.

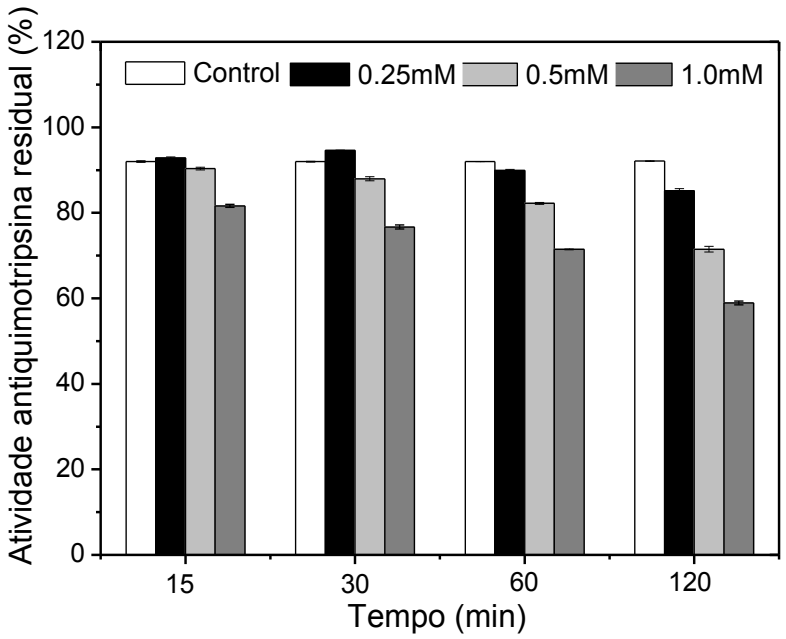

Figura 23. Efeito do DTT sobre a estabilidade de CFPI para a quimotripsina bovina. Diferentes concentrações de DTT (0,25 a 1mM) foram incubadas com CFPI à 37 °C em diferentes intervalos de tempo. A reação foi interrompida com iodoacetamida. Após a incubação, alíquotas foram retiradas para cada concentração avaliada e submetidas aos ensaios de atividade inibitória. Os resultados foram representados como média de 6 replicatas ± desvio padrão.

5. Dicroísmo circular de CFPI

O efeito da temperatura sobre a estrutura secundária de CFPI foi analisado por dicroísmo circular (DC). O espectro de DC, seguindo um aumento gradual de temperatura de 20 a 90 °C, não mostrou mudanças em perda de sinal (Figura 24). Analogamente, o sinal do DC de CFPI a 207 nm permaneceu inalterado sob subsequente resfriamento de 90 a 20 °C.

A interpretação do espectro nativo de CFPI revelou uma elipsidade mínima acentuada próxima a 207 nm, seguida por outro espectro mínimo mais suave por volta de 225 nm (Figura 25). A estrutura secundária de CFPI foi predita utilizando os algoritmos SELCON3, CONTIN e CDSSTR. Todos os algoritmos apresentaram resultados similares. A predição estrutural gerada pelo algoritmo SELCON3 apontou a presença de 34% de α-hélices, 10% folhas-β, 56% de estruturas não ordenadas (Tabela 3), evidenciando a presença majoritária de α-hélices e estruturas não ordenadas.

A análise de DC de CFPI incubado com 1 mM de DTT durante 1 hora revelou alterações no espectro, mostrando redução de sinal a 190 nm e na região entre 205 a 230 nm (Figura 25). A predição da estrutura de CFPI reduzido revelou a presença de 32% em α-hélices, 17% folhas-β e 51% de estruturas não ordenadas (Tabela 3).

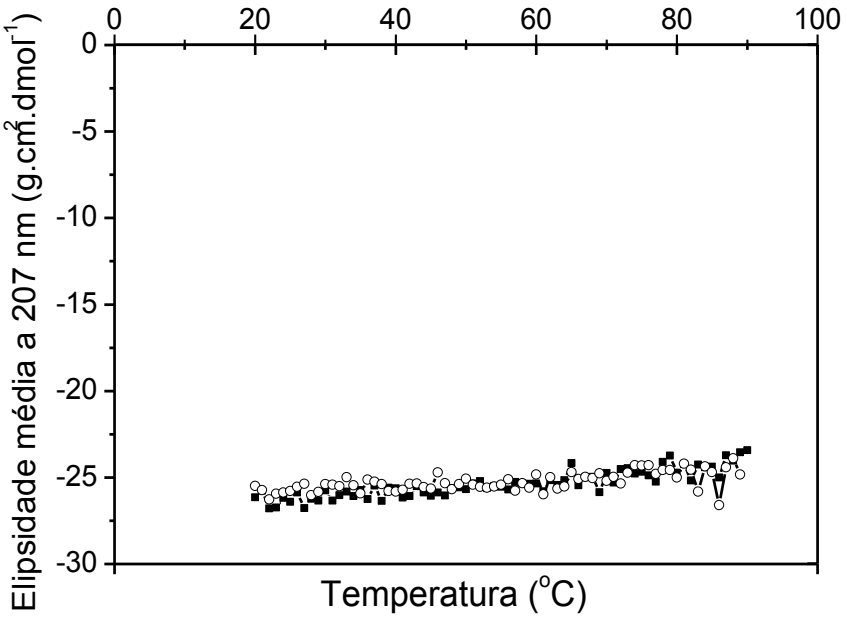

Figura 24. Espectro de DC a 207 nm para CFPI nativo (0,1 mg/mL) submetido ao aquecimento gradual (1 °C/min) de 20-90 °C (■) e subsequente resfriamento de 90-20 °C (○). O espectro obtido representa o resultado de 10 acumulações descontado de seus respectivos brancos.

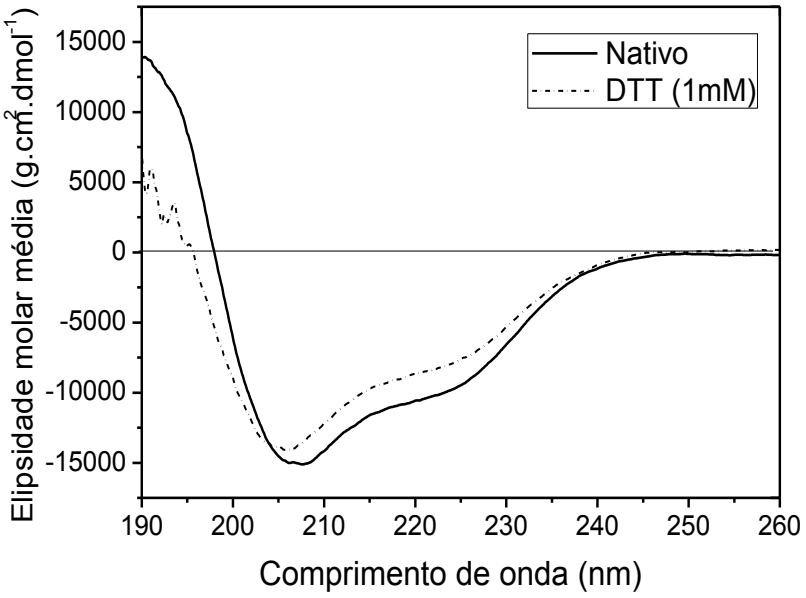

Figura 25. Espectro de DC (190 - 260 nm) para CFPI nativo e incubado em 1mM de DTT por 1 hora. O inibidor foi utilizado numa concentração de 0,1 mg/mL, dissolvido em tampão fosfato de sódio pH 7,3. O espectro obtido representa o resultado de 10 acumulações descontado de seus respectivos brancos.

Tabela 3. Predição de estrutura secundária de CFPI através do algoritmo SELCON3.

	Conteúdo de estrutura secundária (%)		
	α-hélice	folha-β	Randômica
CFPI	34	10	56
CFPI + DTT (1 mM, 37 °C, 1h)	32	17	51

IV. DISCUSSÃO

Os inibidores Bowman-Birk (BBIs) têm sido extensivamente estudados devido ao seu potencial em biotecnologia, tanto em uso medicinal como em agricultura. Em engenharia de plantas, a expressão destes inibidores pode ser usada para obter resistência contra insetos-praga que prejudicam culturas economicamente importantes. Por esta razão, a purificação e caracterização de novos IPs pode ser útil para o controle natural de insetos fitófagos.

O presente estudo descreve a purificação e as propriedades bioquímicas de um inibidor Bowma-Birk de sementes de *Clitoria fairchildiana*, nomeado CFPI, além de analisar sua função inseticida para insetos-praga lepidópteros, particularmente contra *Anagasta kuehniella* e *Corcyra cephalonica*.

No processo de purificação de CFPI diversas técnicas foram testadas, tais como coluna de troca iônica DEAE-Sepharose, cromatografia de afinidade Sepharose-tripsina e cromatografia em coluna C-18. Entretanto, os procedimentos cromatográficos que mais renderam e preservaram a estrutura do inibidor foram exclusão molecular (G-75, Superdex) e a coluna de hidrofobicidade Phenyl-Sepharose.

CFPI mostrou uma cadeia polipeptídica única com uma massa molecular relativa de aproximadamente 15 kDa em Page-SDS. Este padrão de massa molecular provavelmente indica um comportamento de auto associação muito observado em BBIs (KUMAR *et al.*, 2004; PRASAD, E.R. *et al.*, 2010), nos quais as formas diméricas ou multiméricas são mais estáveis que os monômeros em solução. A presença de regiões hidrofóbicas na superfície do monômero resulta em uma forte rede de ligação de hidrogênio no dímero, trazendo-lhe

estabilidade e favorecendo a presença de outras formas multiméricas (RAO e SURESH, 2007).

A massa molecular de 7973 Da do pico majoritário obtido por espectrometria de massas MALDI-TOF de CFPI prova que a massa relativa de 15 kDa determinada por Page-SDS se refere à forma dimérica do inibidor. Os picos com 7886 e 7757 Da, também observados na espectrometria de massas, podem ser isoformas resultantes de uma proteólise parcial da região amino ou carboxi-terminal, em concordância com o verificado em inibidor Bowman-Birk de *Lupinus albus* (SCARAFONI *et al.*, 2008). BBIs são produtos de famílias multigênicas que justificam a existência de múltiplas isoformas por processamento da proteína em terminações amino e carboxílicas (DOMONEY *et al.*, 1995). A coevolução entre plantas e insetos tem resultado na produção de numerosos isoinibidores para combater novas peptidases de insetos (LOPES *et al.*, 2004). Diversos BBIs isolados de plantas leguminosas, como os de *Lens culinaris* (RAGG *et al.*, 2006), *Pisum sativum* (DOMONEY *et al.*, 1995) e *Vigna radiata* (WILSON e CHEN, 1983), possuem isoinibidores.

O alinhamento da sequência N-terminal com outros IPs mostrou que CFPI tem uma alta similaridade (aproximadamente 60-80%) e regiões conservadas com BBIs de várias sementes da família Fabaceae e subfamília Papilionoideae. Os resíduos de cisteína conservados e os aminoácidos que formam a sequência consenso S–I–P–A–Q–C, do primeiro sítio reativo, claramente indicam que CFPI é um novo membro da família Bowman-Birk.

A especificidade dos BBIs varia entre as plantas leguminosas. A especificidade e o reconhecimento molecular dos dois domínios inibitórios dos BBIs de leguminosas são governados principalmente pelo resíduo na posição P_1 (LASKOWSKI e KATO, 1980; DE PAOLA *et al.*, 2012). Inibidores Bowman-Birk de leguminosas são reportados como uma

estrutura em dupla-cabeça que consiste em dois domínios inibitórios formando "loops" ligantes. O resíduo P_1 do primeiro domínio inibitório é conservado e específico para a tripsina, enquanto aquele que está localizado no segundo domínio determina a especificidade dos BBIs: Arg, Lys ou Ser para tripsina; Leu, Phe, His ou Tyr para quimotripsina; Ala para elastase (LASKOWSKI e KATO, 1980; PRAKASH *et al.*, 1996). Baseado na similaridade da sequência de CFPI com IPs de *L. albus* (SCARAFONI *et al.*, 2008) e *V. radiata* (WILSON e CHEN, 1983), a sequência N-terminal de CFPI mostrou o resíduo P_1 do segundo sítio reativo, consistindo no aminoácido Phe. Este resultado revela a especificidade de CFPI em inibir tripsina e quimotripsina.

Estudos estequiométricos mostraram que CFPI inibe a tripsina e quimotripsina a uma razão molar de 1:1 (inibidor/enzima). O padrão estequiométrico de CFPI está de acordo com o observado para o inibidor Bowman-Birk maior isolado de sementes de *Dolichos biflorus* (RAMASARMA *et al.*, 1994) e BTCI de *Vigna unguiculata* (BARBOSA *et al.*, 2007). Alguns inibidores Bowman-Birk de diversas leguminosas apresentaram uma proporção molar de 1:1 ou 1:2 com tripsina, porém não foram muito efetivos em inibir a quimotripsina (PRASAD, E. R. *et al.*, 2010b; PRASAD, E.R. *et al.*, 2010).

Os gráficos de Lineweaver–Burk revelaram uma inibição competitiva para a tripsina e quimotripsina e evidenciaram uma forte afinidade de CFPI por ambas enzimas, com valores de Ki aparente contra tripsina e quimotripsina de $3{,}3 \times 10^{-10}$ M e $1{,}5 \times 10^{-10}$ M, respectivamente. Estes valores obtidos foram similares ao Ki de outros BBIs estudados (SAMPAIO, C. A. *et al.*, 1996; BUENO *et al.*, 1999). A alta afinidade e especificidade de CFPI pode estar relacionada com a fisiologia da planta *C. fairchildiana*, a qual é sazonalmente atacada por *Urbanus acawoios*, um lepidóptero que causa a sua defoliação (TREVISAN *et*

al., 2004). Portanto, não é surpresa que *C. fairchildiana* produza inibidores de serinopeptidases para proteger suas sementes.

CFPI foi estável às variações de pH e termais, mas mostrou sensibilidade ao agente redutor DTT, o que é característico dos inibidores Bowman-Birk. A marcante estabilidade exibida pelos BBIs é devido ao arranjo conservado de sete pontes dissulfeto, as quais possuem um papel essencial na estabilização do sítio reativo da proteína (KUMAR *et al.*, 2004). A redução de CFPI com DTT levou a uma perda mais pronunciada da atividade inibitória contra tripsina em relação à inibição contra a quimotripsina, sugerindo a ocorrência de mais pontes dissulfeto próximas do domínio anti-tripsina que do anti-quimotripsina (SINGH e APPU RAO, 2002). Resultados análogos foram reportados em Bowman-Birk de *Cajanus cajan* (PRASAD, E.R. *et al.*, 2010) e *Vigna mungo* (PRASAD, E. R. *et al.*, 2010b). Em contraste, CFPI foi mais resistente a desnaturação redutora que os inibidores de *C. cajan* e *V. mungo*, os quais mostraram perda completa da atividade inibitória após redução com 1 mM de DTT. A análise de dicroísmo circular (DC) de CFPI reduzido sugere que, mesmo após redução, o inibidor teve uma conformação estável e reteve uma quantidade considerável de sua estrutura secundária, corroborando com o observado para o inibidor isolado de *D. biflorus* (RAMASARMA *et al.*, 1994).

O espectro nativo de CFPI teve uma elipsidade mínima a 207 nm, indicativo de uma estrutura aperiódica que corrobora bem com as estruturas secundárias de outros BBIs estudados, tais como HGPI de *D. biflorus* (RAMASARMA *et al.*, 1994) e RgPI de *C. cajan* (PRASAD, E.R. *et al.*, 2010). Todavia, o inibidor em estudo apresentou uma quantidade maior de estruturas α-hélices em comparação às folhas-β, o que é incomum em BBIs.

CFPI exibiu atividade inibitória significante até 100 °C e manteve-se estável durante um intervalo de pH de 2 a 10. Estabilidades térmica e ao pH foram observadas em outros

inibidores Bowman-Birk de leguminosas, como *V. mungo* (PRASAD, E. R. *et al.*, 2010b) e *Vicia faba* (FANG *et al.*, 2011). O efeito da temperatura sobre a estrutura secundária de CFPI foi analisado por DC. O progressivo aquecimento e subsequente resfriamento de CFPI não induziu mudanças conformacionais, indicando uma estrutura pouco flexível e com grande estabilidade. Diferentemente de CFPI, LaBBI de *L. albus* (SCARAFONI *et al.*, 2008) e RgPI de *C. cajan* (PRASAD, E.R. *et al.*, 2010) apresentaram alterações conformacionais quando aquecidos à 90 °C, as quais foram revertidas com o resfriamento.

V. CONCLUSÕES

- CFPI é um novo inibidor de peptidase e o primeiro na espécie *C. fairchildiana* a ser isolado e caracterizado;

- Considerando suas características físico-químicas e composição de aminoácidos podemos classificá-lo como pertencente à família de inibidores Bowman-Birk;

- É uma proteína rica em estrutura aperiódica e altamente estável às variações de pH e temperatura, mas sensível ao DTT.

CAPÍTULO 4

ESTUDO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE CFPI

I. OBJETIVOS

- Verificar a capacidade inibitória de CFPI em relação às peptidases digestivas do intestino médio de diversos insetos-praga;

- Realizar estudos de alimentação com o inseto selecionado a fim de analisar o potencial inseticida de CFPI;

- Comparar os resultados obtidos para o inseto selecionado com a de outro inseto mais resistente a ação do inibidor.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Insetos

Foram utilizadas 7 espécies de insetos da ordem Lepidoptera, divididos entre as famílias Pyralidae *(Anagasta kuehniella, Corcyra cephalonica*); Noctuidae (*Anticarsia gemmatalis, Heliothis virescens, Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera albula*); e Crambidae (*Diatraea saccharalis*). Os insetos da família Pyralidae foram obtidos do Laboratório de Purificação de Proteínas e suas Funções Biológicas/LPPFB da UFMS/Campo Grande. Os demais insetos foram fornecidos pelo Dr. J.R.P. Parra (Laboratório de Biologia dos Insetos da Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz" - Esalq, USP, Piracicaba, SP). Os insetos foram mantidos em condições ideais e rigorosamente controladas, com temperatura de 28 ± 1 °C, umidade relativa de 65-75%, iluminação diária de 16 horas e com dieta padrão de gérmen de trigo. A Figura 26 apresenta as formas larval e adulta dos insetos utilizados no estudo.

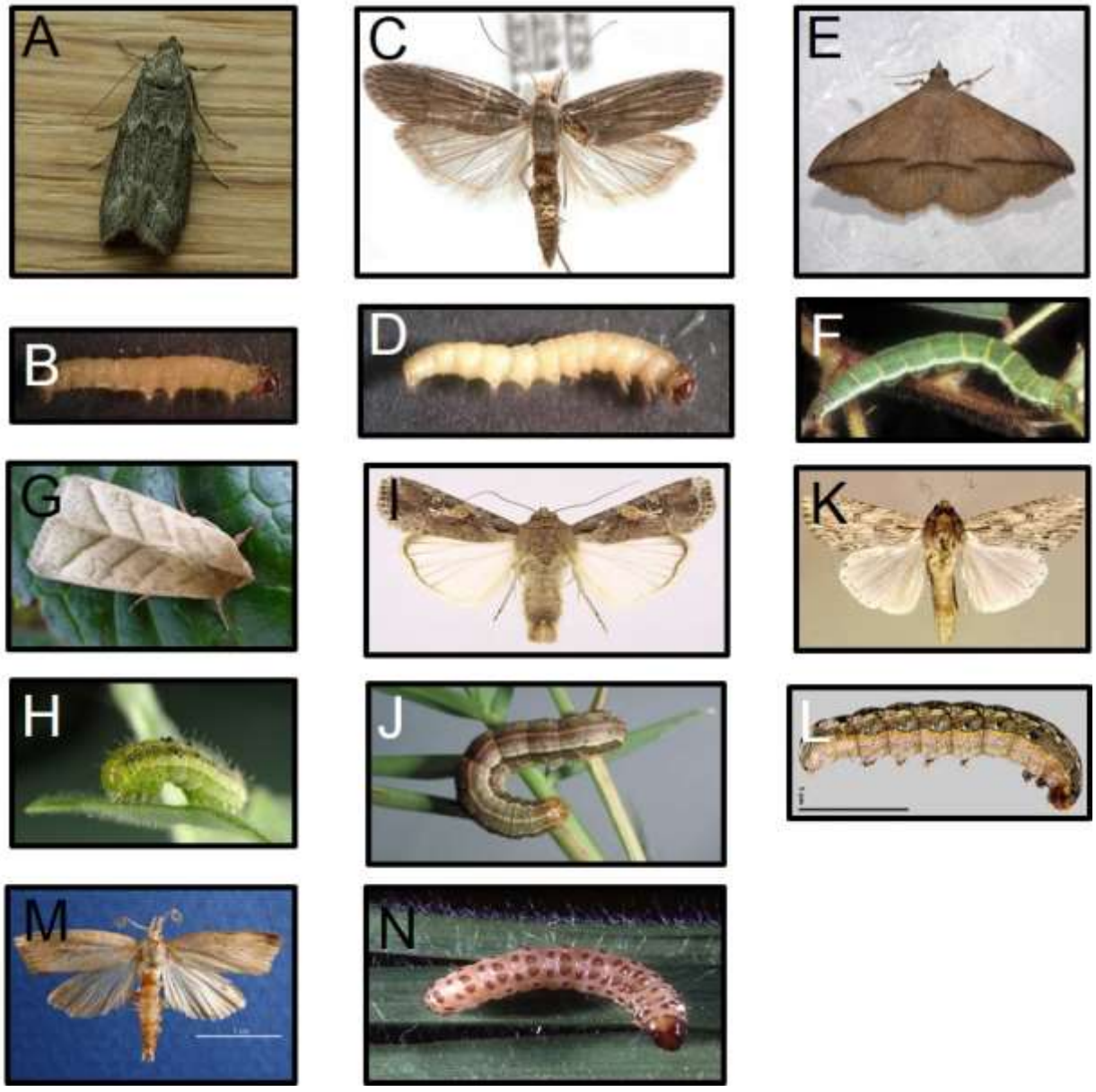

Figura 26. Insetos-praga utilizados no estudo. A. adulto de *Anagasta kuehniella*; B. larva de *A. kuehniella*; C. adulto de *Corcyra cephalonica*; D. larva de *C. cephalonica*; E. adulto de *Anticarsia gemmatalis*; F. larva de *A. gemmatalis*; G. adulto de *Heliothis virescens*; H. larva de *H. virescens*; I. adulto de *Spodoptera frugiperda*; J. larva de *S. frugiperda*; K. adulto de *Spodoptera albula*; L. larva de *S. albula*; M. adulto de *Diatraea saccharalis*; N. larva de *D. saccharalis*. Fotos obtidas de wikipedia (www.wikipedia.com) ou bugguide (www.bugguide.net/node/view/15740).

2. Efeito do inibidor sobre as enzimas digestivas de insetos

A atividade inibitória de CFPI foi testada contra as proteases intestinais de 7 espécies de insetos-praga: *A. kuehniella*, *A. gemmatalis, C. cephalonica*, *D. saccharalis*, *H. virescens*, *S. frugiperda* e *S. albula*. As larvas foram criadas em dieta artificial e permaneceram na mesma até o momento da extração das peptidases, realizado de acordo com a metodologia desenvolvida por Macedo *et al*. (2003) com pequenas modificações. Larvas de 4° instar foram imobilizadas em nitrogênio líquido e tiveram seus intestinos removidos a frio com o auxílio de pinças. Os intestinos foram congelados em nitrogênio líquido e macerados em pistilo resfriado. O homogenato obtido foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 minutos à 4 °C. O sobrenadante foi coletado e acondicionado em um volume conhecido de tampão fosfato de sódio 0,1 M, aliquotado, quantificado seu conteúdo proteico por Bradford (1976) e utilizado imediatamente nos ensaios de atividade enzimática, ou então armazenados à -20 °C.

O efeito de CFPI sobre a atividade proteolítica do homogenato do intestino médio (IM) foi determinado usando BApNA (para enzimas tripsina) e SAAPFpNA (para enzimas do tipo quimotripsina) como substratos. Os ensaios foram feitos em pH 8 com tampão Tris-HCl 50 mM. O inibidor (3ug) foi incubado com o homogenato do IM à 37 °C por 15 minutos antes da adição do substrato. A hidrólise do substrato e mudanças na absorbância a 410 nm foram acompanhadas no leitor de microplacas, como previamente descrito no Capítulo 3, Seções 3.4.3 e 3.4.4. O homogenato do IM foi utilizado numa concentração de proteína que apresentou uma atividade de aproximadamente 0,6 e 0,3 nM/min para BApNA e SAAPFpNA, respectivamente, ao final das reações tríptica e quimotríptica. Todas as incubações foram conduzidas em triplicata e os controles apropriados foram inclusos.

3. Efeito de CFPI sobre o crescimento e sobrevivência das larvas de A. kuehniella e C. cephalonica

a) Sobrevivência e peso médio larval

Para analisar o efeito de CFPI sobre o desenvolvimento de larvas de *A. kuehniella*, comparando com um inseto mais resistente como *C. cephalonica*, dietas artificiais foram fornecidas contendo o inibidor na concentração de 0,5% e 1,0%. Para cada dieta, 4 larvas neonatas foram colocadas em potes plásticos claros contendo 200mg de dieta artificial, e fechados hermeticamente. A dieta artificial foi preparada conforme Parra (1999), consistindo de uma mistura de farinha de trigo integral e gérmen de trigo na proporção de 3:2 para *A. kuehniella* e 2:3 para *C. cephalonica*. Cada tratamento foi repetido 10 vezes (n = 40). Ao atingir o 4° instar, após 22 dias de incubação à 28 °C e umidade relativa de 65-70%, o peso e o número de larvas foi determinado. O grupo controle foi constituído por larvas alimentadas com dieta sem a presença do inibidor.

b) Índices nutricionais de A. kuehniella e C. cephalonica

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. Os parâmetros nutricionais de consumo, digestão e utilização do alimento foram calculados como descrito

por Waldbauer (1968). Os índices nutricionais, denominados Eficiência de Conversão do alimento Ingerido (ECI), Eficiência de Conversão do alimento Digerido (ECD), Custo Metabólico (CM) e Digestibilidade Aparente (AD), foram calculados como se segue:

$ECI = (\Delta B / I) \times 100$; $ECD = [\Delta B / (I - F)] \times 100$; $AD = [(I - F) / I] \times 100$;

$CM = 100 - ECD$

Onde,

ΔB = mudanças no peso médio das larvas

I = peso do alimento consumido

F = peso das fezes produzidas

I – F = alimento assimilado

c) Atividade das enzimas digestivas de A. kuehniella e C. cephalonica

A atividade de enzimas do tipo tripsina e quimotripsina do IM foram determinadas pela hidrólise dos substratos BApNA e SAAPFpNA, respectivamente. Para isso, o IM (2 µg de proteína) e as fezes (5 µg de proteína) das larvas, alimentadas em dieta controle e dieta contendo inibidor, foram incubados com tampão Tris 50 mM pH 8,0 por 10 minutos, antes da adição de 1 mM do substrato. Após a adição do substrato, a reação foi acompanhada a 410 nm em leitor de miocroplacas à 37 ºC por 30 minutos para tripsina, e 5 minutos para quimotripsina. A atividade enzimática foi determinada em nM de substrato hidrolisado/minuto.

Para analisar a habilidade de CFPI continuar inibindo a atividade proteolítica de enzimas do intestino de *A. kuehniella* e *C. corcyra*, amostras do IM foram incubadas à 37 °C com concentrações crescentes do inibidor (0-3 µg) durante 10 minutos. Posteriormente,

determinou-se a atividade residual das enzimas tripsina e quimotripsina, como descrito anteriormente no Capítulo 3, Seções 3.4.3 e 3.4.4, respectivamente.

d) Perfil das peptidases do IM de A. kuehniella e C. cephalonica por zimografia

As proteínas extraídas do IM (5 μg) das larvas de *A. kuehniella* e *C. corcyra* foram aplicadas sobre um gel de eletroforese PAGE-SDS 10%. Para analisar a atividade das enzimas do tipo tripsina, amostras foram pré-incubadas por 30 minutos à 37 ºC com um inibidor específico – TLCK (N-α-tosil-L-lisina clorometil cetona). Após a eletroforese à 4 °C, 110 V e amperagem livre, os géis foram lavados com Triton X-100 2,5% (v/v), diluído em 0,1 M glicina-NaOH pH 9,6, durante 1 hora sob agitação para remover o SDS. Posteriormente, os géis foram lavados com glicina-NaOH 0,1 M (pH 9,6) para retirar o Triton e incubados com 1% caseína (w/v) em 0,1 M glicina-NaOH pH 9,6 por 40 minutos. Em seguida, os géis foram lavados com água destilada e corados com Coomassie brilliant blue R-250. As bandas de atividade proteolítica apareceram como zonas claras em um fundo azul.

III. RESULTADOS

1. Efeito do inibidor sobre as enzimas digestivas de insetos

CFPI foi ensaiado contra peptidases digestivas de diversos insetos pragas lepidópteros (Tabela 4). Entre as peptidases intestinais testadas, CFPI (3 µg) foi mais efetivo contra *A. kuehniella*, *D. saccharalis*, *H. virescens* e *C. cephalonica*, no qual inibiu as tripsinas em 76, 59, 49 e 41% da atividade proteolítica. Em contrapartida, CFPI inibiu fracamente as enzimas tripsina de *S. albula* (21%). O inibidor em estudo demonstrou maior atividade inibitória contra as enzimas do tipo tripsina de insetos em comparação com as quimotripsinas. Somente as quimotripsinas de *A. kuehniella* foram signicativamente inibidas (34%) por CFPI.

Tabela 4. Atividade inibitória *in vitro* de CFPI para peptidases digestivas de insetos pragas lepidópteros*

Insetos	% Inibição da tripsina	% Inibição da quimotripsina
Anagasta kuehniella (traça da farinha)	76 ± 0,9	34 ± 0,2
Diatraea saccharalis (broca da cana)	59 ± 1,5	14 ± 0,07
Heliothis virescens (lagarta da maçã)	49 ± 0,2	12 ± 0,5
Corcyra cephalonica (traça do arroz)	41 ± 0,5	15 ± 0,3
Anticarsia gemmatalis (lagarta da soja)	33 ± 0,2	10 ± 1,2
Spodoptera frugiperda (lagarta do cartucho)	31 ± 1,7	1 ± 0,2
Spodoptera albula (lagarta militar grisalha)	21 ± 0,3	2 ± 0,3

* Valores são a média ± desvio padrão (cada média representa 3 replicatas). O inibidor foi incubado com o homogenato do IM de cada inseto à 37 C por 15 min antes da adição de substrato. O homogenato do IM dos insetos foi utilizado numa concentração de proteína que apresentou uma atividade de 0,6 e 0,3 nM/min para a tripsina e quimotripsina, respectivamente.

2. Efeito de CFPI sobre o crescimento e as peptidases digestivas das larvas de A. kuehniella e C. cephalonica

a) Sobrevivência e peso médio larval

O inibidor a 0,5% adicionado à dieta, embora tenha reduzido a sobrevivência (Figura 27) e o peso médio (Figura 28) das larvas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica*, não foi capaz de produzir resultados estatisticamente significativos. CFPI a 1% na dieta diminuiu significativamente a taxa de sobrevivência de *A. kuehniella* em 27,5%. Todavia, não afetou a sobrevivência de *C. cephalonica* (Figura 27). O peso médio das larvas controle de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* foi de 9,99 mg e 11,66 mg, respectivamente. CFPI a 1% exibiu um efeito inseticida considerável contra *A. kuehniella* porque foi capaz de reduzir seu peso larval em cerca de 37% (6,3 mg), além de afetar a sua sobrevivência. Para *C. cephalonica*, um inseto mais resistente a este inibidor, CFPI a 1% reduziu discretamente o peso larval em 18% (9,55 mg) (Figura 28). Na figura 29 podemos observar o peso de uma larva de *A. kuehniella* no 4° instar submetida à dieta com CFPI 1%, sendo consideravelmente menor que a larva alimentada em dieta controle. A larva de *C. cephalonica*, por sua vez, tem o peso discretamente reduzido, notado pela menor espessura e tamanho da cabeça, quando comparado à larva controle (Figura 29).

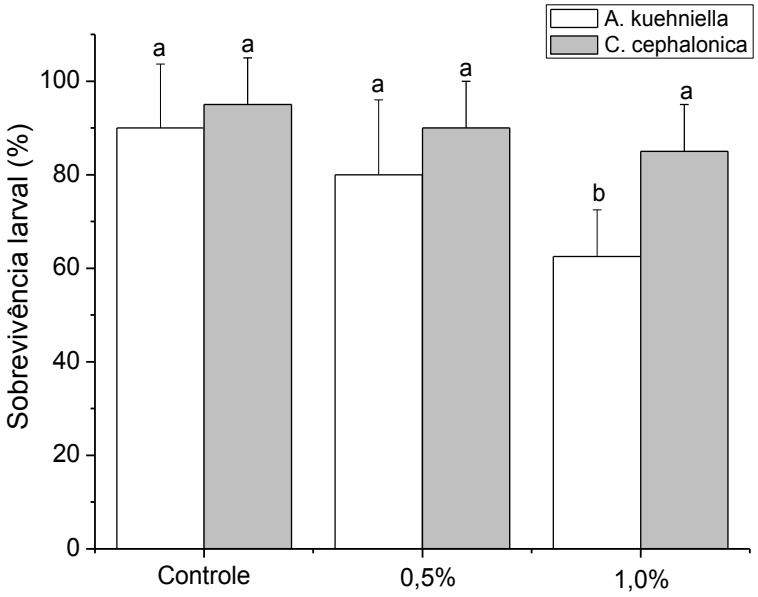

Figura 27. Sobrevivência de larvas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* (4° instar) alimentadas em uma dieta artificial controle ou em uma dieta contendo CFPI (w/w). Larvas neonatas foram alimentadas em dieta artificial contendo o inibidor nas concentrações de 0,5 e 1,0%, ou ainda na ausência deste (controle), até atingir o 4° instar). Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (ANOVA, p<0,01).

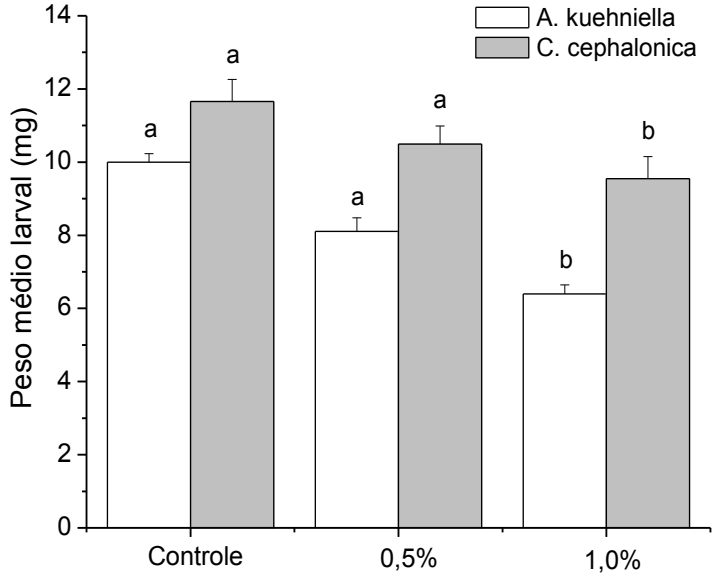

Figura 28. Peso médio das larvas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* (4° instar) alimentadas em uma dieta artificial controle ou em uma dieta contendo CFPI (w/w). Larvas neonatas foram alimentadas em dieta artificial contendo o inibidor nas concentrações de 0,5 e 1,0%, ou ainda na ausência deste (controle), até atingir o 4° instar). Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (ANOVA, p<0,01).

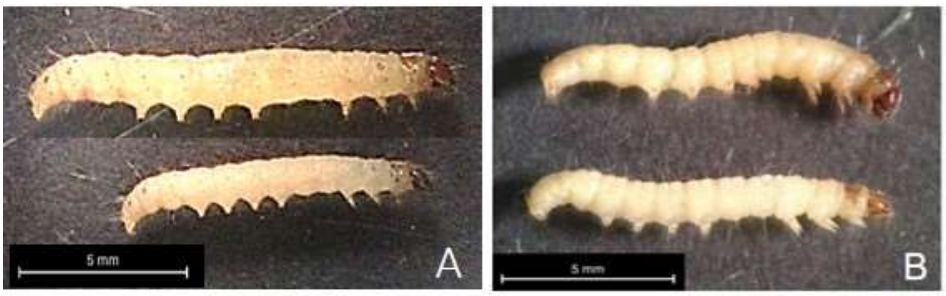

Figura 29. Fotografia de larvas de *A. kuehniella* (A) e *C. cephalonica* (B) alimentadas em uma dieta controle (larvas acima) ou em uma dieta contendo CFPI 1% (w/w). Aumento de 10x.

b) Índices nutricionais de A. kuehniella e C. cephalonica

A partir da análise da Tabela 5, podemos constatar que as larvas de *A. kuehniella* apresentaram alterações nutricionais em todos os parâmetros calculados após ingestão de CFPI, enquanto que as larvas de *C. cephalonica* alimentadas com o inibidor pelo mesmo tempo tiveram alterações significativas somente em ECD e CM.

Para *A. kuehniella*, a ingestão crônica de CFPI resultou em valores de ECD e ECI mais baixos do que os obtidos para as larvas em dieta controle, sendo 19,8% e 14,3% menores, respectivamente. O tratamento com CFPI resultou em um aumento de sua digestibilidade (AD) em 6,8% e um custo metabólico 9,2% maior.

As larvas de *C. cephalonica* não mostraram alteração significativa em ECI e AD, mas apresentaram redução de 12,3% em ECD e um acréscimo de 9,6% em CM. Comparando os resultados dos índices nutricionais de *C. cephalonica* com os obtidos para *A. kuehniella*, constatamos um aumento no ECD para as larvas de *C. cephalonica* tanto para o grupo controle (27% maior) quanto para os tratados com CFPI (33% maior). Os valores de AD e

CM foram 46% e 17% menores, respectivamente, para as larvas de *C. cephalonica* tanto tratadas quanto as controles, em relação às larvas de *A. kuehniella*.

Tabela 5. Parâmetros nutricionais de larvas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* do 4° instar alimentadas em dieta controle ou em dieta contendo CFPI a 1% (w/w).

	A. kuehniella		***C. cephalonica***	
Índices nutricionais	**Controle**	**CFPI 1%**	**Controle**	**CFPI 1%**
ECI (%)	28,00 ± 0,04a	23,99 ± 0,34b	20,6 ± 0,8a	18,83 ± 0,5a
ECD (%)	31,81 ± 0,05a	25,51 ± 0,51b	43,8 ± 0,8a	38,40 ± 0,6b
AD (%)	88,01 ± 0,11a	94,00 ± 0,76b	47,2 ± 0,2a	49,00 ± 0,3a
CM (%)	68,18 ± 0,05a	74,48 ± 0,51b	56,2 ± 0,8a	61,60 ± 0,6b

ECI = Eficiência de Conversão do alimento Ingerido; ECD= Eficiência de Conversão do alimento Digerido; AD = Digestibilidade Aparente; CM = Custo Metabólico. Os parâmetros nutricionais foram calculados a partir do peso da dieta restante e das fezes depositadas pelas larvas ao final do período de alimentação necessário para as larvas atingirem o 4° instar. A análise estatística foi feita usando ANOVA com pós teste Tukey como comparação múltipla. Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas ($p<0,01$).

c) Atividade das enzimas digestivas de A. kuehniella e C. cephalonica

As larvas de *A. kuehniella* alimentadas com CFPI apresentaram um padrão de redução de atividade das tripsinas provenientes do IM (Figura 30) quando comparadas com as larvas que receberam dieta controle, enquanto as tripsina presentes nas fezes não foram significativamente alteradas (Figura 31). Em contrapartida, as quimotripsinas de *A. kuehniella* mostraram diminuição na atividade quando as larvas receberam CFPI na dieta (Figuras 32 e 33). Em contraste, as larvas de *C. cephalonica* alimentadas com CFPI apresentaram um aumento de atividade das enzimas tripsinas em relação às larvas controle (Figuras 30 a 33).

As larvas de *A. kuehniella* alimentadas com CFPI mostraram uma forte inibição de 56% na atividade das tripsinas do IM (Figura 30), enquanto que no extrato fecal a atividade dessas enzimas foi similar às larvas controle (Figura 31). A atividade das quimotripsinas do IM teve uma diminuição significante de 26% nas larvas alimentadas com CFPI (Figura 32). Da mesma forma, as quimotripsinas presentes nas fezes das larvas alimentadas com CFPI tiveram a atividade reduzida em 27% (Figura 33).

As larvas de *C. cephalonica* alimentadas com o inibidor apresentaram um considerável aumento de 43% na atividade das tripsinas do IM (Figura 30), assim como também mostraram um aumento de 24% na atividade dessas enzimas presentes nas fezes (Figura 31). As quimotripsinas de *C. cephalonica*, por sua vez, não apresentaram uma diferença significativa entre as larvas tratadas e controle (Figuras 32 e 33).

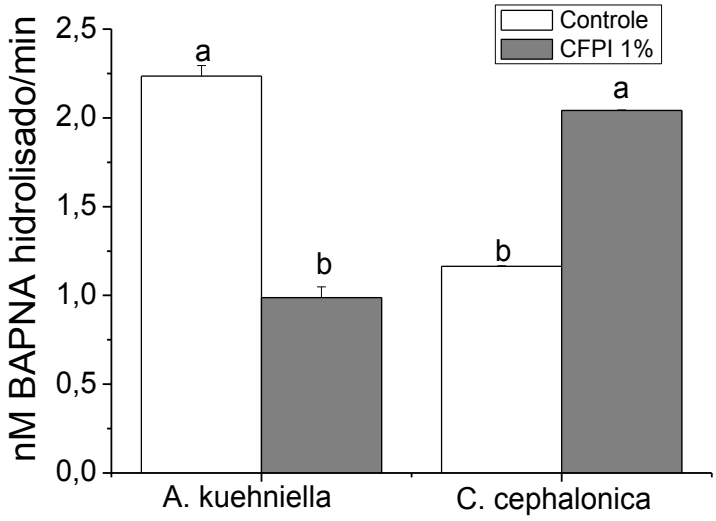

Figura 30. Atividade das enzimas do tipo tripsina do intestino médio de larvas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* do 4° instar alimentadas em uma dieta artificial controle ou em uma dieta contendo CFPI a 1% (w/w). A atividade tríptica foi determinada pela hidrólise do substrato BApNA, utilizando 2 μg de proteína do IM. Barras representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (ANOVA, $p<0,01$).

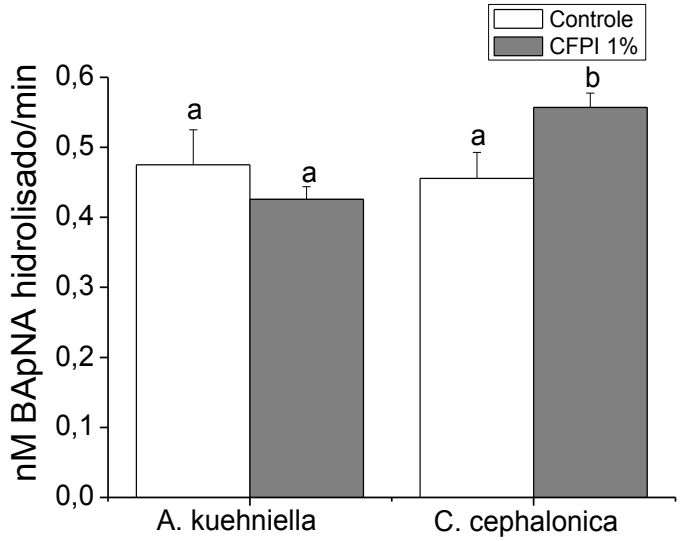

Figura 31. Atividade das enzimas do tipo tripsina encontrada nas fezes de larvas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* do 4° instar alimentadas em uma dieta artificial controle ou em uma dieta contendo CFPI a 1% (w/w). A atividade tríptica foi determinada pela hidrólise do substrato BApNA, utilizando 5 μg de proteína do IM. Barras representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (ANOVA, $p<0,01$).

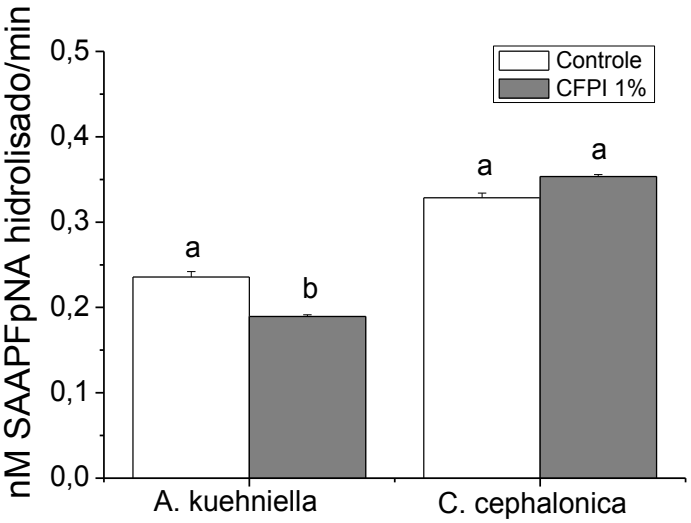

Figura 32. Atividade das enzimas do tipo quimotripsina do intestino médio de larvas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* do 4° instar alimentadas em uma dieta artificial controle ou em uma dieta contendo CFPI a 1% (w/w). A atividade quimotríptica foi determinada pela hidrólise do substrato SAAPFpNA, utilizando 2 μg de proteína do IM. Barras representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (ANOVA, $p<0,01$).

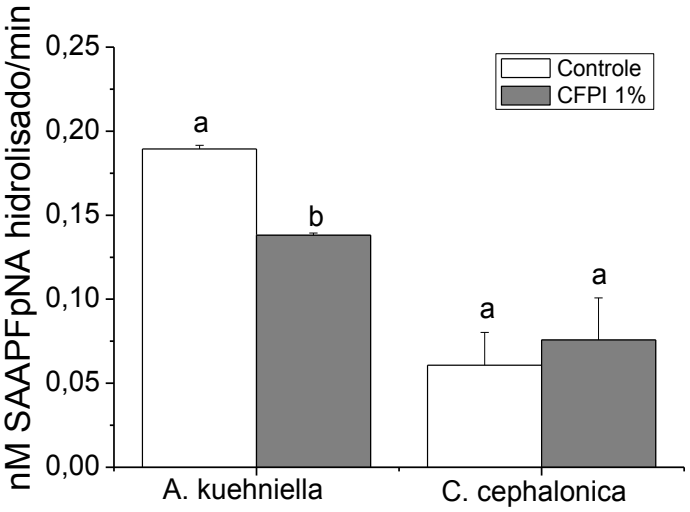

Figura 33. Atividade das enzimas do tipo quimotripsina encontrada nas fezes de larvas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* do 4° instar alimentadas em uma dieta artificial controle ou em uma dieta contendo CFPI a 1% (w/w). A atividade quimotríptica foi determinada pela hidrólise do substrato SAAPFpNA, utilizando 5 μg de proteína do IM. Barras representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (ANOVA, $p<0,01$).

Para verificar se as peptidases do IM dos insetos em estudo permaneceram sensíveis ao CFPI após ingestão crônica, o extrato do IM foi incubado com concentrações crescentes do inibidor (Figuras 34 e 35). Nas larvas de *A. kuehniella*, as tripsinas e quimotripsinas foram proporcionalmente inibidas a adição de CFPI. Além disso, as enzimas das larvas alimentadas com CFPI se mostraram mais suscetíveis ao inibidor que as submetidas à dieta controle. As peptidases de *C. cephalonica* tratadas com CFPI apresentaram um comportamento diferente, pois as tripsinas foram menos inibidas com adição de CFPI que aquelas provenientes das larvas mantidas em dieta controle. As quimotripsinas tanto das larvas controle quanto das tratadas com CFPI não foram inibidas após incubação com concentrações variadas de CFPI.

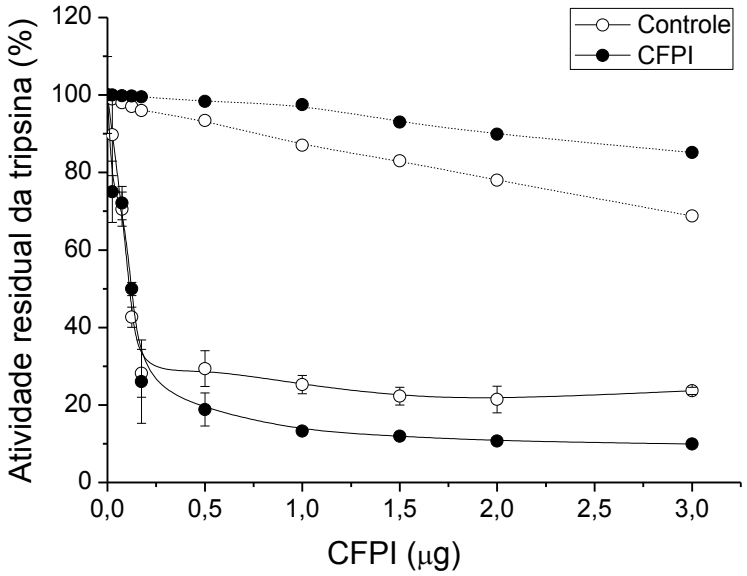

Figura 34. Inibição *in vitro* por CFPI da atividade proteolítica das tripsinas do IM extraído de larvas de *A. kuehniella* (—) e *C. cephalonica* (·····) do 4° instar alimentadas em dieta controle ou em dieta contendo CFPI 1%. A atividade residual da tripsina foi determinada após incubação do IM (2 μg de proteína) com concentrações crescentes de CFPI à 37 °C por 10 min, utilizando BApNA como substrato.

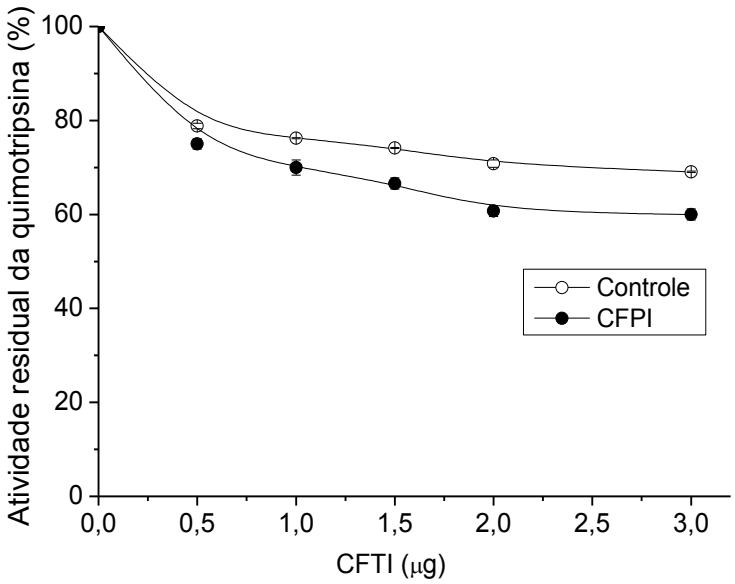

Figura 35. Inibição *in vitro* por CFPI da atividade proteolítica das quimotripsinas do IM extraído de larvas de *A. kuehniella* do 4° instar alimentadas em dieta controle ou em dieta contendo CFPI 1%. A atividade residual da quimotripsina foi determinada após incubação do IM (2 μg de proteína) com concentrações crescentes de CFPI, utilizando SAAPFpNA como substrato.

d) Perfil das peptidases do IM de A. kuehniella e C. cephalonica por zimografia

O gel de atividade proteolítica com caseína mostrou o perfil das enzimas digestivas de *A. kuehniella*, sendo as mais ativas as proteases de maior (>66 kDa) e de menor (<30 KDa) peso molecular (Figura 36, linhas 1 a 4). Em contraste, as larvas de *C. cephalonica* apresentaram considerável atividade proteolítica das enzimas digestivas com peso molecular mediano (entre 45 e 30 kDa) que não foi observado em *A. kuehniella* (Figura 36, linhas 5 a 8). Também verificamos um maior número de proteases digestivas ativas em *C. cephalonica*, capazes de produzir diversas bandas proteolíticas observadas no gel, quando comparamos com as poucas bandas produzidas pelas enzimas de *A. kuehniella*.

As larvas de *A. kuehniella* alimentadas com CFPI apresentaram inibição das proteases digestivas de baixo peso molecular de 21 kDa ou menos (linha 2) em relação às larvas mantidas em dieta controle (linha 1). Além disso, foi observado uma nova banda com cerca de 32 kDa nas larvas de *A. kuehniella* tratadas com CFPI (linha 2) que reduziu após incubação com TLCK (linha 4), porém não foi totalmente excluída.

Comparando as larvas de *C. cephalonica* mantidas em dieta controle (linha 5 e 7) com as tratadas com CFPI (linhas 6 e 8), observamos um aumento na atividade das bandas com cerca de 66 e 45 kDa que não foram inibidas por TLCK nas larvas tratadas com inibidor (linha 8).

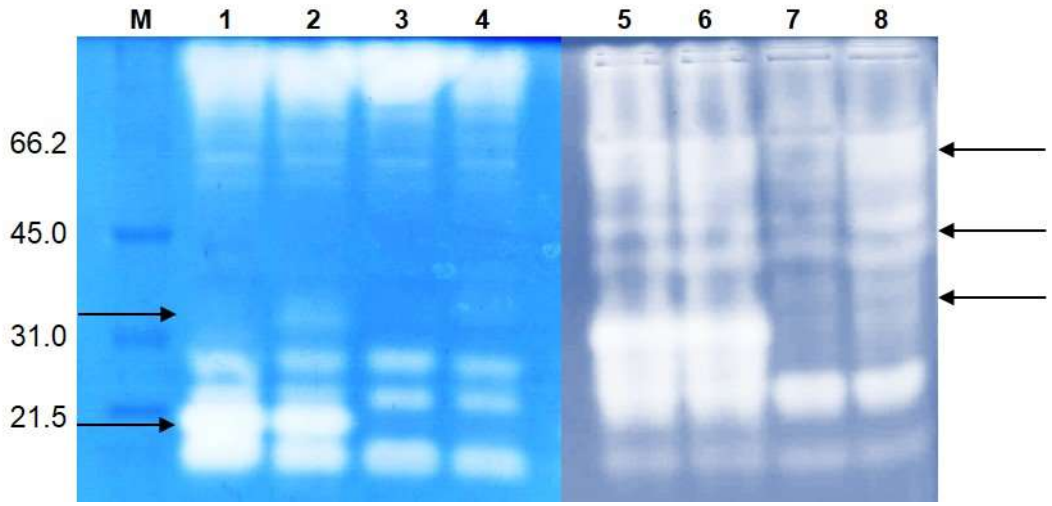

Figura 36. Eletroforese em PAGE-SDS 10% contendo caseína 1%. M. marcadores de massa molecular; 1. IM de larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dieta controle; 2. IM das larvas de *A. kuehniella* tratadas com CFP 1%; 3. IM das larvas controles de *A. kuehniella* incubado com TLCK; 4. IM das larvas de *A. kuehniella* tratadas com CFP 1% incubado com TLCK; 5. IM das larvas controles de *C. cephalonica*; 6. IM das larvas de *C. cephalonica* tratadas com CFPI 1%; 7. IM das larvas controles de *C. cephalonica* incubado com TLCK; 8. IM das larvas de *C. cephalonica* tratadas com CFP 1% incubado com TLCK. Utilizou-se 3 μg de homogenato de IM para cada amostra. Setas indicam alterações no perfil proteolítico do tratado em relação ao controle.

IV. DISCUSSÃO

1. Efeito in vitro de CFPI sobre as enzimas digestivas de insetos

Para analisar a atividade inibitória de CFPI contra peptidases digestivas de insetos-praga, o intestino médio foi extraído e ensaiado com BApNA e SAAPFpNA. A alta especificidade de CFPI sobre a tripsina e quimotripsina bovinas resultou em um ensaio focado em insetos lepidópteros. Vários estudos têm mostrado que a maioria das larvas lepidópteras possuem as serinopeptidases como as enzimas proteolíticas mais abundantes (TERRA e FERREIRA, 1994).

CFPI mostrou forte inibição *in vitro* das enzimas do tipo tripsina de *A. kuehniella* (76%) e *D. saccharalis* (59%), inibiu moderadamente *H. virescens* (49%), *C. cephalonica* (41%), A. *gemmatalis* (33%) e *S. frugiperda* (31%), mas não foi efetivo contra *S. eridana* (21%). Em contradição com os resultados obtidos para as serinopeptidases bovinas, CFPI inibiu as quimotripsinas de *A. kuehniella* a um grau menor (34%) quando comparado com as tripsinas (76%), enquanto as quimotripsinas dos outros insetos foram apenas fracamente inibidas. Isto pode ser atribuído à incompatibilidade estrutural entre o sítio reativo anti-quimotripsina de CFPI com as quimotripsinas dos insetos (LOPES *et al*., 2004). Sabe-se que ao longo da evolução, as enzimas digestivas dos insetos tem aumentado a hidrofobicidade dos seus sítios ativos, resultando em uma menor interação destes com os sítios reativos hidrofílicos dos IPs (TERRA e FERREIRA, 1994).

Vários IPs de plantas leguminosas foram avaliados *in vitro* em relação ao potencial de diminuir a atividade de peptidases digestivas de larvas lepidópteras. Dentre estes, AcKI (inibidor tipo-Kunitz de *Acacia polyphilla*) mostrou-se ativo contra enzimas digestivas de

A. kuehniella e inibiu a atividade da tripsina (90%) e da quimotripsina (30%) (MACHADO *et al.*, 2013), similar ao CFPI. A inibição *in vitro* de enzimas tripsinas de *D. saccharalis* foi analisada com extratos foliares de plantas de cana-de-açúcar expressando IPs de soja. Verificou-se um alto nível de inibição por SBBI (inibidor Bowman-Birk de soja) da planta B9 (60%) e por SKTI (inibidor tipo-Kunitz de soja) das plantas K1 (60%) e K8 (50%) (FALCO e SILVA-FILHO, 2003), semelhante ao efeito de CFPI sobre este inseto. Similar ao CFPI, o inibidor tipo-Kunitz de *Plathymenia foliolosa* (PFTI) inibiu as tripsinas de *A. gemmatalis* em cerca de 30% (RAMOS *et al.*, 2008).

Um inibidor tipo-Kunitz de *Delonix regia* (MACEDO *et al.*, 2009) também foi capaz de inibir as peptidases digestivas de *A. kuehniella* e *C. cephalonica*, assim como CFPI. Todavia, foi necessário uma quantidade muito maior deste inibidor (20 µg) para se alcançar uma inibição semelhante à obtida com 3 µg de CFPI para ambos os insetos.

Contrário ao efeito de CFPI, SBBI e EATI (inibidor de tripsina de *Entada acaciifolia*) apresentaram uma alta inibição (80%) contra peptidases digestivas de *S. frugiperda*. Entretanto, quando *S. frugiperda* foi cronicamente exposto a SBBI e EATI, este inseto mostrou resistência aos inibidores (BRIOSCHI *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2013).

2. Efeito de CFPI sobre o crescimento e sobrevivência das larvas de A. kuehniella e C. cephalonica

Com o objetivo de analisar a resposta de *A. kuehniella*, que foi mais suscetível ao CFPI *in vitro*, com a de *C. cephalonica*, que geralmente se mostra mais resistente aos inibidores em geral, larvas neonatas de ambos os insetos foram incorporados à uma dieta contendo o inibidor nas concentrações de 0,5% e 1,0%. Parâmetros como peso médio larval, taxa de

sobrevivência, dosagens das peptidases digestivas e índices nutricionais, foram avaliados. Para ambas as espécies, CFPI a 0,5% não causou alterações significativas no peso médio e sobrevivência. Todavia, o inibidor a 1% provocou redução no peso das larvas de 4° instar, sendo o seu efeito mais evidente em *A. kuehniella* (redução de 37%) que em *C. cephalonica* (redução de 18%). CFPI a 1% diminuiu a taxa de sobrevivência de *A. kuehniella*, mas não foi capaz de causar mortalidade considerável em *C. cephalonica*. DrTI (inibidor tipo-Kunitz de *D. regia*), incorporado à uma dieta artificial a 1%, não afetou a sobrevivência e o peso médio das larvas de 4° instar de *A. kuehniella* e *C. cephalonica* (MACEDO *et al.*, 2009).

Os índices nutricionais evidenciam um maior efeito anti-metabólico de CFPI para *A. kuehniella* do que para *C. cephalonica*. Além disso, corroboram com a redução de peso e sobrevivência das larvas de *A. kuehniella* tratadas com o inibidor. Essas larvas apresentaram uma menor eficiência de conversão de alimento em energia para o crescimento e um maior custo metabólico com a detoxificação e a excreção do inibidor, além de uma aumentada digestibilidade, em comparação com as larvas alimentadas em dieta controle. Esses resultados sugerem que CFPI retardou a digestão de *A. kuehniella* através da inibição de suas enzimas digestivas e, consequentemente, causou um maior tempo de retenção do alimento no intestino para a assimilação de nutrientes (TEIMOURI *et al.*, 2013). Como resultado, somente uma pequena parte do alimento metabolizado foi disponibilizado para o crescimento larval. Resultados semelhantes para o mesmo inseto foram observados com o consumo crônico de 0,5% AcKI (MACHADO *et al.*, 2013) ou com dieta contendo 0,7% de PFTI (RAMOS *et al.*, 2008).

As larvas de *C. cephalonica* apresentaram índices nutricionais mais eficientes que *A. kuehniella*, uma vez que aquelas tiveram maior eficiência em conversão de alimento. Ainda assim, a dieta com inibidor afetou a eficiência de conversão de alimento digerido, ou

seja, diminuiu a absorção do alimento pelo intestino, e aumentou o custo metabólico para *C. cephalonica.* A digestibilidade semelhante entre as larvas tratadas com CFPI e as mantidas em dieta controle indica uma menor interação do inibidor com as enzimas digestivas desse inseto e, consequentemente, um menor efeito sobre o seu crescimento. A lectina isolada de *Annona coriacea* (ACLEC) foi incorporada a 2% em dieta artificial para *A. kuehniella* e *C. cephalonica* (COELHO *et al.*, 2007). ACLEC afetou os índices nutricionais de *A. kuehniella*, porém não foi capaz de produzir efeitos deletérios sobre a assimilação de nutrientes ou o crescimento de *C. cephalonica*.

Enquanto as larvas de *A. kuehniella* tiveram a atividade de suas enzimas tripsinas e quimotripsinas reduzidas com a ingestão de CFPI 1%, as larvas de *C. cephalonica* mostraram maior atividade de suas enzimas digestivas na presença do inibidor, sugerindo um aumento na expressão de suas peptidases como resposta ao tratamento.

A inibição marcante (56%) da atividade das tripsinas de *A. kuehniella* alimentadas com CFPI, em relação à larvas controle, indica a formação de um complexo entre CFPI e tripsinas inativo e responsável por retardar a digestão larval. O fato de que as tripsinas encontradas no extrato fecal estavam com a atividade similar entre as larvas alimentadas com CFPI e controle, sugere que o complexo entre CFPI e enzimas se desfaz ao passar pelos vários compartimentos intestinais. AcKI e PFTI também reduziram a atividade das tripsinas das larvas de 4° instar de *A. kuehniella* quando incorporadas a uma dieta artificial (RAMOS *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2013). CFPI também inibiu as quimotripsinas de *A. kuehniella*, porém mostrou-se menos efetivo contra essas enzimas, semelhante aos resultados observados nos ensaios *in vitro.*

Enquanto a maioria das enzimas tripsinas e quimotripsinas de *A. kuehniella* permaneceram sensíveis a incubação *in vitro* com CFPI, as tripsinas das larvas de

C. cephalonica alimentadas com dieta contendo CFPI apresentaram maior hidrólise do substrato BApNA em comparação com as larvas controles, comprovando a presença de tripsinas insensíveis que não foram inibidas por CFPI nas larvas tratadas. Além disso, a ausência de inibição das quimotripsinas de *C. cephalonica* revela que essas enzimas são imcompatíveis com o sítio reativo de CFPI, e portanto, não interagem com o inibidor.

Os géis de atividade proteolítica evidenciaram que as larvas de *C. cephalonica* possuem mais peptidases digestivas ativas do que as larvas de *A. kuehniella*. Essa vasta gama de peptidases presentes no intestino de *C. cephalonica*, podendo ser tripsinas, quimotripsinas e elastases (TABATABAEI *et al.*, 2011), muitas vezes dificultam a ação de um único inibidor.

O mecanismo de adaptação dos insetos aos IPs tem sido bem reportado e envolve um aumento na produção de peptidases digestivas sensíveis, a síntese de enzimas insensíveis ou a proteólise do inibidor (BOWN *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2013). A habilidade das larvas de *A. kuehniella* em induzir a produção de enzimas insensíveis ao inibidor, como visualizado no zimograma, pode explicar o efeito moderado de CFPI sobre as enzimas digestivas das larvas tratadas com ele, quando comparado com a forte inibição das tripsinas *in vitro*.

Estudos mostram que insetos generalistas regulam diferencialmente seus transcritos de vias metabólicas e peptidases em resposta aos IPs, desenvolvendo uma resposta fisiológica mais generalizada quando sua função digestiva é alterada (GOVIND *et al.*, 2010). Como esses insetos convivem naturalmente com várias proteínas de defesa presentes na diversas plantas das quais se alimenta, suas peptidases muitas vezes se mostram resistentes a um inibidor quando testado, conforme visto com as quimotripsinas de *C. cephalonica*. Broadway e colaboradores (1996) explicam que a suscetibilidade dos insetos aos IPs está relacionada

a proporção de enzimas proteolíticas no intestino que podem ser suprimidas pelo inibidor. No presente estudo, constatamos que embora ambos os insetos sejam generalistas, *C. cephalonica* respondeu ao CFPI com um aumento na produção de tripsinas sensíveis ou não ao inibidor e de quimotripsinas insensíveis ao CFPI, enquanto *A. kuehniella* produziu uma nova peptidase insensível ao CFPI. Esta isoenzima, entretanto, não foi capaz de sobrepor os efeitos deletérios causados pelo inibidor, pois o perfil enzimático geral de *A. kuehniella*, no 4° instar, permaneceu inibido. Larvas de *A. kuehniella* do 4° instar também produziram uma nova banda de tripsina (com cerca de 26 kDa) quando se alimentaram de dieta contendo ApTI (inibidor de tripsina de *Adenanthera pavonina*) (MACEDO *et al.*, 2010). Todavia, o ApTI manteve sua ação inibitória sobre o inseto e consequentemente prejudicou seu desenvolvimento larval, conforme o observado com CFPI.

V. CONCLUSÕES

- *In vitro*, CFPI inibiu significativamente as tripsinas de *A. kuehniella*, *D. saccharalis* e *H. virescens*;
- *In vivo*, o inibidor revelou um efeito substancial sobre o peso, emergência e sobrevivência de larvas de *A. kuehniella* da geração F_0;
- O inibidor foi mais efetivo para larvas de 4° instar de *A. kuehniella* que para *C. cephalonica*;
- Mudanças na fisiologia larval de *A. kuehniella* e *C. cephalonica*, foram observadas, incluindo efeitos negativos sobre parâmetros nutricionais;
- Em *A. kuehniella*, a ingestão de CFPI inibiu as peptidases digestivas e ao mesmo tempo induziu a produção de uma enzima insensível ao inibidor;
- Em larvas de 4° instar de *C. cephalonica*, CFPI causou a superprodução das enzimas digestivas;
- O inibidor teve um efeito inseticida significante para larvas de *A. kuehniella* do 4° instar.

CAPÍTULO 5

EFEITO DA INGESTÃO AGUDA E CRÔNICA DE CFPI SOBRE *A. KUEHNIELLA*

I. OBJETIVOS

- Verificar a resposta de *A. kuehniella* em relação a ingestão aguda do inibidor;

- Determinar possíveis mecanismos de adaptação deste inseto mediante a ingestão crônica de CFPI;

- Proceder com a purificação parcial das enzimas digestivas das larvas de segunda geração de *A. kuehniella,* no 4° instar, a fim de analisar mais detalhadamente a resposta enzimática do inseto.

II. MATERIAIS E MÉTODOS

1. Efeito da ingestão aguda de CFPI sobre as enzimas digestivas de A. kuehniella

a) Ingestão aguda de CFPI (3 a 24hs)

Larvas de *A. kuehniella* no 4° instar foram transferidas de uma dieta artificial controle para uma dieta contendo CFPI a 1% (n=30), na qual permaneceram durante 3, 6, 12 e 24 horas até serem dissecadas e o conteúdo do IM ser removido. Para cada intervalo em estudo, houve um grupo controle correspondente. O IM foi homogeneizado e utilizado para quantificar as enzimas tripsina e quimotripsina. O perfil das peptidases digestivas foi verificado por eletroforese PAGE-SDS 10% com caseína 1%.

b) Ingestão aguda de CFPI (72 a 144hs)

Outro ensaio foi realizado objetivando analisar a resposta enzimática do inseto em relação a ingestão aguda do inibidor após 72 horas, comparando com a atividade das peptidases dos insetos que retornam à dieta controle. Para isso, larvas de *A. kuehniella* no 4° instar, foram separadas em quatro grupos:

C1- Larvas alimentadas por 72 hs em dieta controle;

T1- Larvas alimentadas por 72 hs em dieta contendo 1% de CFPI;

C2- Larvas alimentadas por 144 hs em dieta controle;

T2- Larvas alimentadas por 72 hs em dieta contendo 1% de CFPI, e logo após transferidas para dieta controle por mais 72 hs, totalizando 144 hs de incorporação.

Cada grupo continha 6 potes com 10 larvas por tubo (n=60). Todas as larvas foram pesadas ao início e término do experimento. Após o período de 72 e 144 horas, as larvas foram dissecadas e o IM foi removido e armazenado -20 °C ou imediatamente homogeneizado. Com o homogenato, realizou-se os seguintes ensaios:

b.1. Atividade da tripsina e quimotripsina:

As atividades das referidas enzimas foram analisadas conforme descrito no Capítulo 4, Materiais e Métodos 3.c.

b.2. Perfil enzimático a partir de eletroforese PAGE-SDS 9% com 0,1% gelatina.

Eletroforese em PAGE–SDS (9%) contendo gelatina 0,1% foi realizada para a análise da atividade enzimática do IM. Em um dos géis (B), as amostras foram inicialmente incubadas com CFPI por 10 minutos à 37 °C para verificar a sensibilidade de cada IM ao inibidor. Para analisar a atividade das enzimas do tipo tripsina, amostras foram pré-incubadas por 30 minutos à 37 ºC com o inibidor específico TLCK. A corrida ocorreu à 5 ºC, e em seguida, o gel foi lavado com solução 2,5 % de Triton X-100 por 30 minutos sob agitação

constante para remover o SDS. Após isso, o gel foi incubado em tampão Tris 50 mM pH 8,0 por 1 hora para atividade enzimática. O corante Coomassie brilliant blue R-250 foi utilizado para corar o gel. As bandas de atividade proteolítica apareceram como zonas claras em um fundo azul.

b.3. Parâmetros cinéticos das enzimas tripsina e quimotripsina:

O homogenato do IM (2 µg) foi inicialmente incubado à 37 °C por 10 minutos com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. Posteriormente, adicionou-se quantidades crescentes de substrato (0 - 0,1 - 0,15 - 0,2 - 0,25 - 0,5 - 1,0 mM) num volume total de 200 µL para o BApNA e 20 µL para o SAAPFpNA. A hidrólise do substrato foi acompanhada em leitor de microplaca a 410 nm, num período de 30 min para o BApNA e 5 min para o SAAPFpNA. As absorbâncias obtidas foram utilizadas para calcular a atividade das enzimas, em nM/min. Esses resultados foram utilizados para fazer o gráfico de Lineweaver-Burk pelo SigmaPlot 12.0. Os parâmetros cinéticos de velocidade máxima (V_{max}) e a constante de Michaellis-Menten (K_m) foram calculados para ambas as enzimas digestivas, a partir do gráfico de Lineweaver-Burk, no qual a intersecção das retas no eixo y corresponde à V_{max} e a intersecção no eixo x corresponde ao K_m aparente.

b.4. Digestão in vitro de CFPI por ação das peptidases digestivas de A. kuehniella:

O homogenato do IM dos grupos larvais C1-72h, T1-72h, C2-144h, T2-144h foi incubado com CFPI em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. A proporção de CFPI/IM foi de 1:5 (w/w). A digestão do inibidor foi realizada à 37 °C durante 1, 3, 6, 10, 12 e 24 horas.

Posteriormente, a digestão foi paralisada em água fervente por 2 min. A degradação de soro albumina bovina (BSA) foi utilizada como controle positivo para a atividade da peptidase. Os resultados foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% na presença de SDS.

2. Efeito da ingestão crônica de CFPI sobre A. kuehniella de 1ª. e 2ª. geração

2.1. Ingestão crônica de CFPI em relação ao desenvolvimento de A. kuehniella de 1ª. geração

Com o objetivo de avaliar se a presença do inibidor alterou o desenvolvimento e viabilidade dos insetos, dietas contendo inibidor bem como dietas sem a presença deste foram utilizadas, e foram avaliados os seguintes parâmetros: (1) Viabilidade larval, (2) Duração da fase larval, (3) Viabilidade Pupal, (4) Duração da fase pupal (5) Duração da fase adulta e (6) Adultos sobreviventes. O índice de Howe´s foi calculado dividindo o $\log_{10}$ do percentual de adultos sobreviventes (%S) pelo tempo médio de desenvolvimento total (TDT). Este último parâmetro (TDT) foi determinado a partir da contagem de tempo iniciando com a eclosão da larva até o momento em que os adultos morreram.

2.2. Ingestão crônica de CFPI em relação às enzimas digestivas e ao peso de A. kuehniella da 2ª. geração

As larvas sobreviventes da geração F_0 continuaram a receber a dieta com inibidor até a formação de pupa e emergência dos adultos. Estes foram devidamente acondicionados e

alimentados até a obtenção das posturas. Os ovos da segunda geração, denominada F_1, foram individualizados em potes plásticos para se iniciar um novo tratamento constituído por 4 grupos (n=30):

C1. Grupo controle: proveniente de larvas controle da primeira geração, denominada F_0, que continuaram mantidas em dieta controle em F_1;

T1. Grupo tratado: proveniente de larvas controle da geração F_0 que passaram a receber o CFPI a 1% na dieta durante a geração F_1;

C2. Grupo controle/CFPI: proveniente de larvas que receberam uma dieta contendo o inibidor em F_0, mas na geração F_1 passam para uma dieta controle;

T2. Grupo tratado: as larvas receberam uma dieta com CFPI 1% tanto em F_0 quanto em F_1.

a) Efeito de CFPI sobre o peso médio larval

Ao atingirem o 4° instar de desenvolvimento, o efeito da alimentação contendo CFPI a 1% em larvas F_1 de *A. kuehniella* foi avaliado a partir da determinação do seu peso médio.

b) Purificação parcial das enzimas digestivas de A. kuehniella

O homogenato do IM (300 µg de proteína em volume final de 100 µL) das larvas de geração F_1 e do 4° instar foi centrifugado a 10.000 rpm à 4° C durante 5 minutos e posteriormente injetado em seringa com filtro para se proceder com a aplicação em coluna de gel filtração Superdex 75 acoplada ao sistema AKTA Purifier, previamente equilibrada com tampão fosfato 20 mM, pH 7,2 e com fluxo de 48 mL/h. O sistema AKTA foi programado

para coletar frações de 1mL durante 45 minutos e também registrar o perfil do conteúdo proteico das frações coletadas a 280 nm. O perfil das enzimas do IM das larvas tratadas com CFPI e controle foi traçado em triplicata. Das frações coletadas, foram dosadas a atividade da tripsina e quimotripsina com BApNA e SAAPFpNA, respectivamente. Todas as frações foram liofilizadas para os ensaios posteriores.

c) Sensibilidade ao CFPI das enzimas tripsina e quimotripsina semi-purificadas de A. kuehniella

A atividade das enzimas tripsina e quimotripsina semi-purificadas foi ensaiada posteriormente a incubação com CFPI (3 µg) durante 10 minutos à 37 °C, com o intuito de analisar a sensibilidade das frações enzimáticas ao inibidor.

III. RESULTADOS

1. Efeito da ingestão aguda de CFPI sobre as enzimas digestivas de A. kuehniella

a) Ingestão aguda de CFPI (3 a 24hs)

A ingestão de CFPI durante 3 horas causou uma considerável inibição das tripsinas de *A. kuehniella*, as quais reduziram sua atividade em 46,5% quando comparado com as larvas mantidas em dieta controle pelo mesmo período de tempo (Figura 37). Interessante notar que, após 6 horas de alimentação com o inibidor, as tripsinas dessas larvas sobrepuseram em 18,5% a atividade das larvas em dieta controle. A ingestão de CFPI por 12 horas causou um aumento não significante na atividade das tripsinas de 8%. As larvas que consumiram o inibidor durante 12 e 24 horas mantiveram a atividade das tripsinas em níveis semelhantes, por volta de 0,60 nM BApNA/min. Similarmente, as quimotripsinas das larvas que se alimentaram com CFPI durante 3 horas apresentaram redução de 40% na atividade, quando comparadas com as larvas mantidas em dieta controle (Figura 38). Todavia, diferente das tripsinas que aumentaram sua atividade após 6 hs de ingestão de dieta com inibidor, a atividade das quimotripsinas manteve valores semelhantes durante todos os intervalos de tempo dosados.

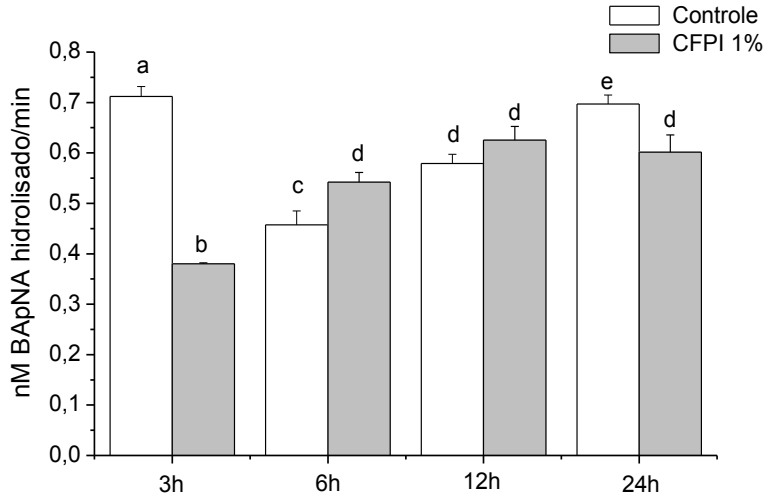

Figura 37. Atividade das enzimas do tipo tripsina do intestino médio de larvas de *A. kuehniella* do 4° instar alimentadas em uma dieta artificial controle ou em uma dieta contendo CFPI a 1% (w/w) em diversos intervalos de tempo. A atividade residual da tripsina foi determinada pela hidrólise do substrato BApNA, utilizando 3 μg de proteína do IM. Barras representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (ANOVA, p<0,01).

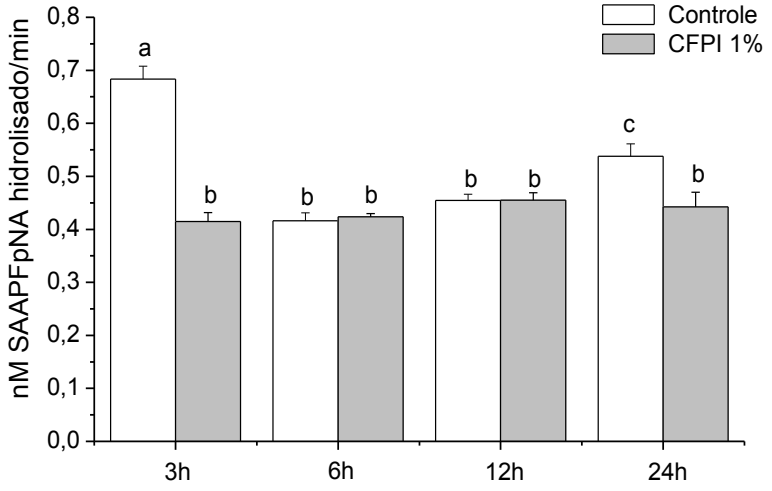

Figura 38. Atividade das enzimas do tipo quimotripsina do intestino médio de larvas de *A. kuehniella* do 4° instar alimentadas em uma dieta artificial controle ou em uma dieta contendo CFPI a 1% (w/w) em diversos intervalos de tempo. A atividade residual da quimotripsina foi determinada pela hidrólise do substrato SAAPFpNA, utilizando 3 μg de proteína do IM. Barras representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (ANOVA, p<0,01).

A análise do perfil proteolítico das enzimas digestivas em gel PAGE-SDS 10% com caseína 1% revelou a presença de uma banda por volta de 21,5 kDa, aparentemente insensível ao TLCK, que foi inibida após tratamento com CFPI em todos os intervalos testados (Figura 39 B). Em 3 horas de alimentação com inibidor (linha 1), ocorreu também uma discreta diminuição da banda proteolítica insensível ao TLCK e com peso molecular por volta de 20 kDa, cuja redução na atividade não foi observada nos demais tempos de tratamentos. Verificou-se em todos os intervalos de tratamento uma pequena redução na banda sensível ao TLCK e com cerca de 25 kDa, quando comparamos o perfil enzimático das larvas tratadas com CFPI (Figura 39 B) e as controles (Figura 39 A). Entretanto, podemos observar um aumento na atividade da banda com aproximadamente 31 kDa após ingestão de inibidor em todos os intervalos de tempo, a qual não foi inibida após incubação com TLCK. Constatou-se também um aumento na atividade das bandas acima de 66 kDa, em relação à atividade das enzimas das larvas controles, para todos os tempos de tratamento.

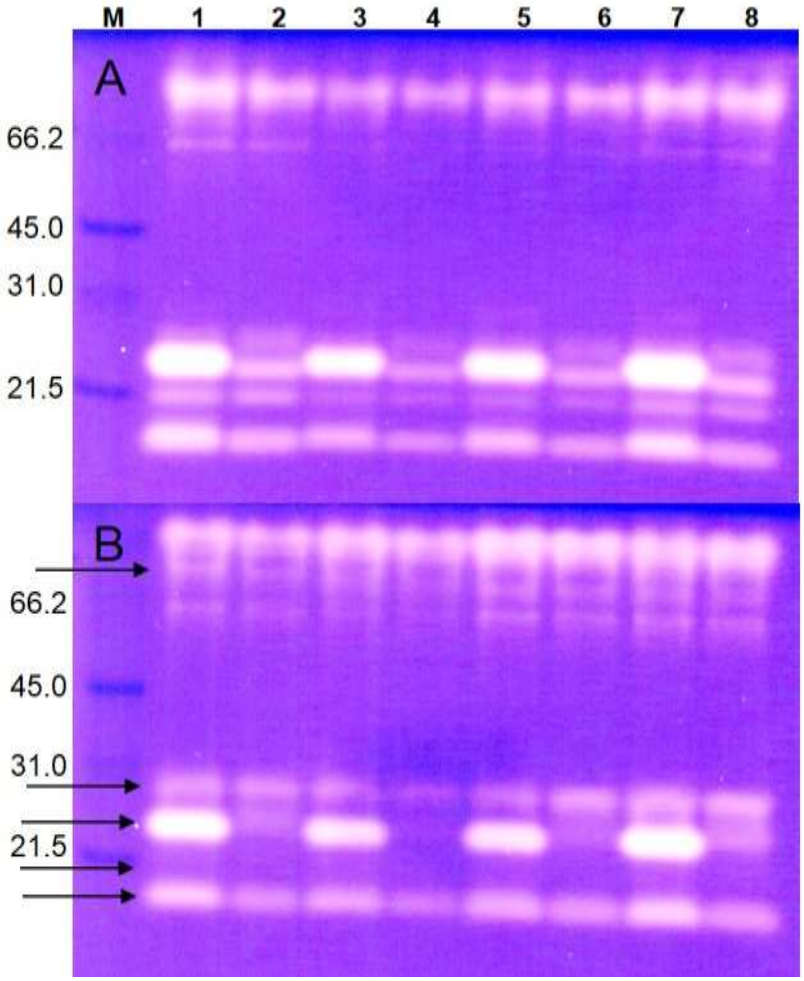

Figura 39. Eletroforese em PAGE-SDS 10% contendo caseína 1%. A) Atividade proteolítica das peptidases do IM de larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dieta controle. B) Atividade proteolítica das peptidases do IM de larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dieta contendo CFPI 1%. Em ambos os géis temos os seguintes intervalos de alimentação: 1. Larvas alimentadas por 3 hs ; 2. Larvas alimentadas por 3 hs e incubação com TLCK; 3. Larvas alimentadas por 6 hs; 4. Larvas alimentadas por 6 hs e incubação com TLCK; 5. Larvas alimentadas por 12 hs; 6. Larvas alimentadas por 12 hs e incubação com TLCK; 7. Larvas alimentadas por 24 hs; 8. Larvas alimentadas por 24 hs e incubação com TLCK. M. marcadores de massa molecular. Utilizou-se 3 μg de homogenato de IM para cada amostra. Setas indicam alterações no perfil proteolítico do tratado em relação ao controle.

b) Ingestão aguda de CFPI (72 a 144hs)

b.1. Peso larval e atividade das proteases digestivas

A ingestão aguda de CFPI 1% pelas larvas de *A. kuehniella* durante 72 horas (T1) causou uma redução significativa de 12% em seu peso médio, o qual passou de 19,6 mg das larvas submetidas a dieta controle (C1), para 17,2 mg nas larvas T1, conforme observado na Figura 40. As larvas que se alimentaram em dieta contendo CFPI durante 72 horas e depois retornaram à dieta controle por mais 72 horas (T2) também apresentaram o peso médio 14% menor que os das larvas que alimentaram somente de dieta controle por 144 horas (C2).

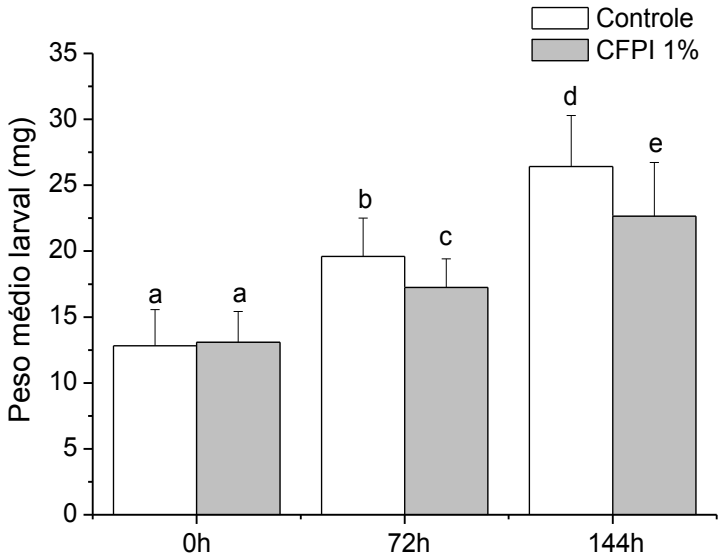

Figura 40. Efeito da ingestão aguda de CFPI durante 72-144hs sobre o peso médio das larvas de 4° instar de *A. kuehniella*. Barras representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (ANOVA, $p<0,05$).

As tripsinas (Figura 41) e quimotripsinas (Figura 42) do IM de *A. kuehniella* apresentaram um comportamento semelhante quando tratadas com CFPI por 72 horas e posteriormente transferidas à dieta controle. Observou-se uma diminuição na atividade das tripsinas e quimotripsinas em 37% e 32%, respectivamente, das larvas T1 em comparação com as larvas C1. Porém, as larvas T2 apresentaram a mesma atividade enzimática que as larvas C2.

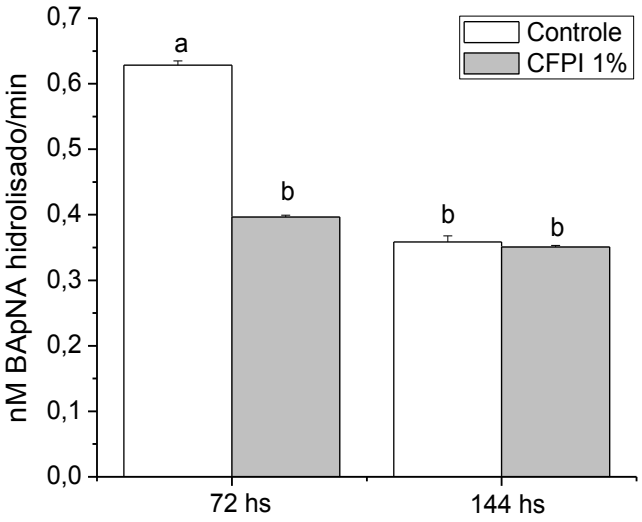

Figura 41. Atividade das tripsinas do intestino médio das larvas de 4° instar de *A. kuehniella* alimentadas ou não com CFPI durante 72-144hs. A atividade residual da tripsina foi determinada pela hidrólise do substrato BApNA, utilizando 3 μg de proteína do IM. Barras representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (ANOVA, $p<0,01$).

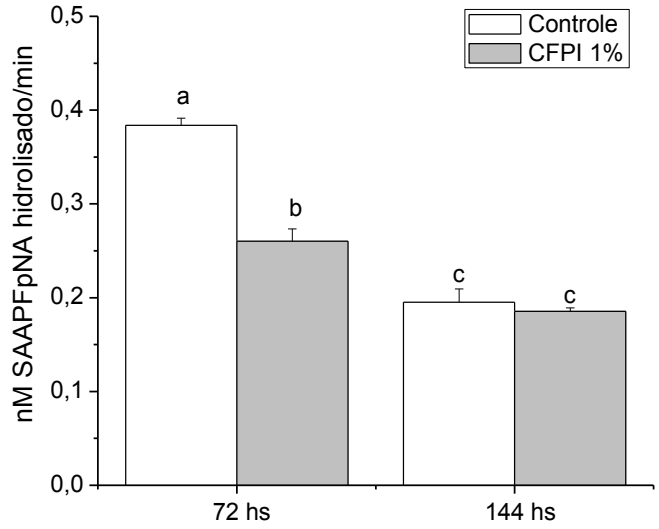

Figura 42. Atividade das quimotripsinas (ensaiada com SAAPFpNA) do intestino médio das larvas de 4° instar de *A. kuehniella* alimentadas ou não com CFPI durante 72-144hs. A atividade residual da quimotripsina foi determinada pela hidrólise do substrato SAAPFpNA, utilizando 3 μg de proteína do IM. Barras representam a média ± desvio padrão. Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (ANOVA, $p<0,01$).

b.2. Perfil enzimático a partir de eletroforese PAGE-SDS 9% com 0,1% gelatina.

A partir da análise do zimograma da Figura 43 (A), notamos uma nítida redução na atividade proteolítica das enzimas digestivas com peso molecular em torno de 30 kDa das larvas T1 (Linha 3), quando comparado com o perfil proteolítico apresentado pelas larvas C1 (Linha 1). As proteases com peso maior de 66 kDa apresentaram uma discreta redução na atividade enzimática das larvas T1 (Linha 4) em relação as larvas C1 (Linha 2). De forma a corroborar com os ensaios enzimáticos anteriores, não houve alteração significativa no perfil proteolítico das enzimas digestivas das larvas T2 em comparação com as larvas C2 (Linhas 5 a 8).

Observamos que as proteases digestivas das larvas de *A. kuehniella* mostraram-se sensíveis a ação do inibidor ao analisarmos o perfil proteolítico obtido na Figura 43 (B) em relação ao da Figura 43 (A). Notou-se a inibição das bandas de proteólise com peso de 21 e 30 kDa, assim como uma redução nas peptidases com 66kDa. O perfil proteolítico das larvas que receberam inibidor na dieta foi mais afetado após incubação com CFPI (Linhas 3 e 7) do que as larvas da dieta controle, sugerindo que o perfil proteolítico geral permaneceu sensível ao CFPI.

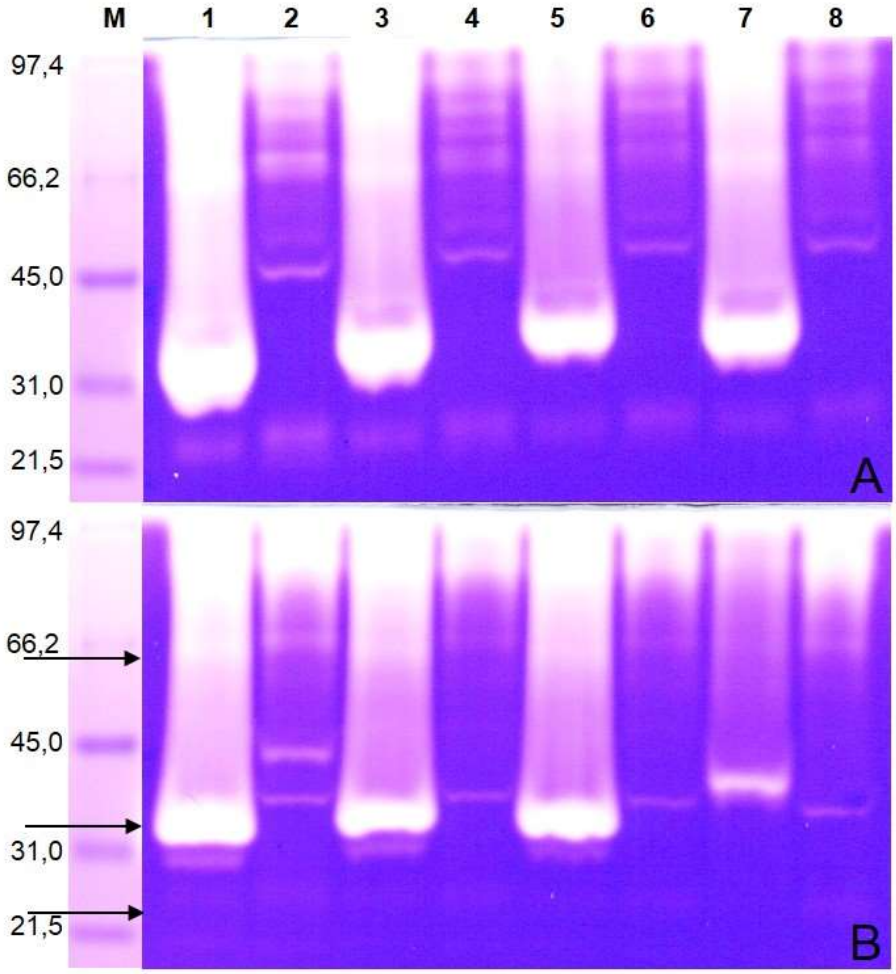

Figura 43. Eletroforese em PAGE-SDS 9% contendo gelatina 0,1%. A) Atividade proteolítica das peptidases do IM de larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dieta controle ou contendo CFPI 1%. B) Atividade proteolítica das peptidases do IM de larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dieta controle ou CFPI 1% após incubação prévia com CFPI (1µg) por 10 minutos. Em ambos os géis temos os seguintes intervalos de alimentação: 1. Larvas C1-72 hs; 2. Larvas C1 e incubação com TLCK; 3. Larvas T1-72 hs (T1); 4. Larvas T1 e incubação com TLCK; 5. Larvas C2-144 hs; 6. Larvas C2 e incubação com TLCK; 7. Larvas T2-144hs; 8. Larvas T2 e incubação com TLCK. M. marcadores de massa molecular. Utilizou-se 1,0 µg de homogenato de IM para cada amostra. Setas indicam alterações no perfil proteolítico das amostras incubadas com CFPI (B) em relação ao controle (A).

b.3. Parâmetros cinéticos das enzimas tripsina e quimotripsina

As larvas C1 tiveram V_{max} semelhante ao das larvas T1, por volta de 1nM BAPNA/min (Tabela 6). Ao compararmos os valores de K_m para esses grupos de larvas, notamos que o grupo que recebeu CFPI na dieta (T1) teve um aumento significativo de 40% em seu K_m aparente, que passou de 0,216 mM para 0,303 mM após ingestão de inibidor. O grupo de larvas alimentadas com CFPI 1% que retornou à dieta controle por mais 72 horas (T2), apresentou valores de V_{max} e K_m próximos de C2, indicando que a enzima conseguiu se desligar do inibidor e retornar à sua atividade normal.

O inibidor interagiu competitivamente com as enzimas do tipo quimotripsina (Tabela 7) da mesma forma como se ligou às tripsinas. Esse resultado pode ser verificado pelo valor semelhante de V_{max} (0,89 nM BAPNA/min) das larvas C1, comparado com o obtido para as larvas T1. O K_m para as quimotripsinas das larvas T1 foi 17% maior (0,507 mM) que o obtido para as larvas C1 (0,431 mM). Analogamente ao ocorrido para as tripsinas de *A. kuehniella*, o grupo de larvas T2 apresentou valores de V_{max} e K_m próximos do controle (C2).

Tabela 6. Parâmetros cinéticos (Média ± DP) das enzimas tripsinas (ensaiado com BApNA) do IM de larvas de *A. kuehniella*.*

Grupos	V_{max} (nM BApNA/min)	K_m (mM)	Intervalo de confiança para K_m
C1-72 hs	1,09 ± 0,07a	0,216 ± 0,04a	0,134 a 0,298
T1-72 hs	1,13 ± 0,08a	0,303 ± 0,05b	0,220 a 0,412
C2-144 hs	0,53 ± 0,05b	0,184 ± 0,04c	0,098 a 0,269
T2-144 hs	0,52 ± 0,03b	0,197 ± 0,03c	0,133 a 0,262

*V_{max} = Velocidade máxima; K_m = constante de Michaellis-Menten. Letras diferentes entre os grupos denotam diferenças estatísticas, de acordo com o intervalo de confiança.

Tabela 7. Parâmetros cinéticos (Média ± DP) das enzimas quimotripsinas (ensaiado com SAAPFpNA) do IM de larvas de *A. kuehniella*.*

Grupos	V_{max} (nM SAAPFpNA/min)	K_m (mM)	Intervalo de confiança para K_m
C1-72 hs	0,89 ± 0,02a	0,431 ± 0,03a	0,300 a 0,492
T1-72 hs	0,89 ± 0,03a	0,507 ± 0,05b	0,404 a 0,610
C2-144 hs	0,58 ± 0,01b	0,335 ± 0,02c	0,290 a 0,381
T2-144 hs	0,58 ± 0,02b	0,340 ± 0,05c	0,310 a 0,391

*V_{max} = Velocidade máxima; K_m = constante de Michaellis-Menten. Letras diferentes entre os grupos denotam diferenças estatísticas, de acordo com o intervalo de confiança.

b.4. Digestão in vitro de CFPI por ação das peptidases digestivas de A. kuehniella:

A partir do ensaio de digestibilidade do inibidor com o homogenato do IM das larvas de *A. kuehniella* que ingeriram CFPI de forma aguda ou das larvas mantidas em dieta controle, nós observamos que nos grupos larvais C1 (Figura 44 A) e T1 (Figura 44 B) o inibidor aparentemente resistiu a digestão enzimática pelas proteases por até 24 horas. Nas larvas

C2, visualizadas na Figura 44 (C), a banda de CFPI está visível em até 12 horas, indicando que o inibidor não foi digerido até este período. Já nas larvas T2 (Figura 44 D), o inibidor resistiu à proteólise das enzimas digestivas por até 10 horas, e portanto, CFPI foi digerido mais rapidamente por T2 que pelos outros grupos larvais.

Na Figura 45, verifica-se a atividade dos IM dos grupos larvais a partir da digestão da proteína padrão BSA. Nas larvas C1 e T1, o BSA foi totalmente digerido em 5 horas, conforme podemos observar nas Figuras 45 (A, B), respectivamente. As larvas C2 e T2 mostraram maior atividade de suas enzimas proteolíticas, pois digeriram o BSA em 4 horas (Figuras 45 C,D).

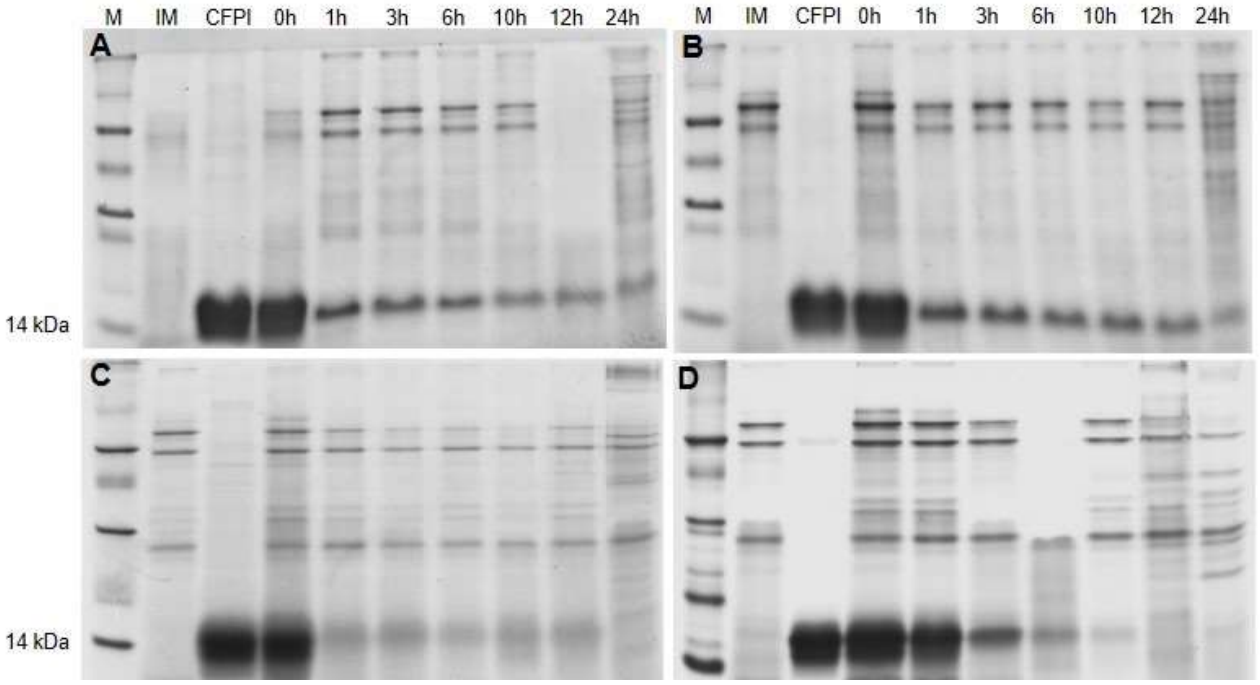

Figura 44. Eletroforese em Page-SDS 12,5% de CFPI submetido a digestão por homogenatos do IM de larvas de *A. kuehniella*. Incubou-se à 37 °C o inibidor com o IM na proporção de 1:5 para cada intervalo ensaiado. A. Larvas C1-72hs; B. Larvas T1-72 hs; C. C2-144hs; D. T2-144hs.

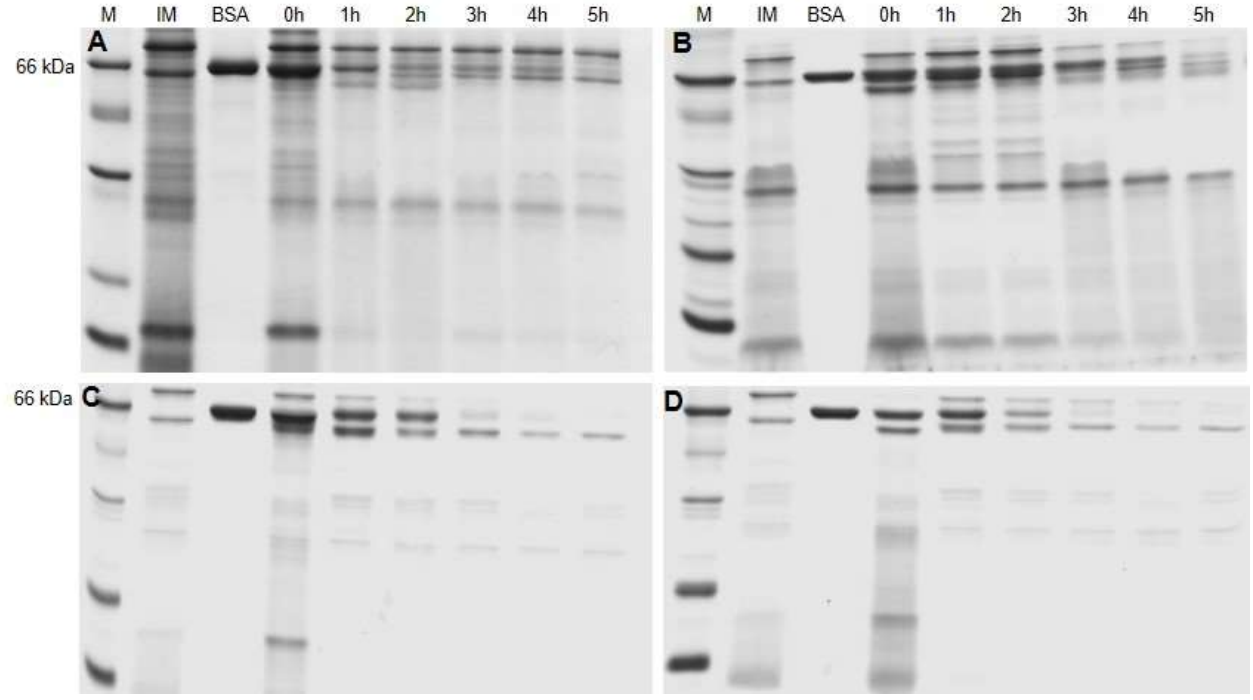

Figura 45. Eletroforese em Page-SDS 12,5% de BSA submetido a digestão por homogenatos do IM de larvas de *A. kuehniella*. Incubou-se à 37 °C o inibidor com BSA na proporção de 1:5 para cada intervalo ensaiado. A. Larvas C1-72hs; B. Larvas T1-72 hs; C. C2-144hs; D. T2-144hs.

2. Efeito da ingestão crônica de CFPI sobre A. kuehniella de 1ª. e 2ª. geração

2.1. Ingestão crônica de CFPI em relação ao desenvolvimento de A. kuehniella de 1ª. geração

A partir da análise da Tabela 8, observamos que a ingestão crônica de CFPI a 1% causou uma redução significativa de 13% na viabilidade larval e prolongou sua duração em 5 dias. Analogamente, a viabilidade pupal sofreu um decréscimo de 12,5% após ingestão de CFPI. O inibidor causou um atraso considerável de até 7 dias nos períodos larval e pupal e resultou em um período prolongado de desenvolvimento de larva a adulto, como podemos verificar no TDT 4 dias maior (Tabela 9). Como consequência, a taxa de mortalidade aumentou em 27% com o consumo crônico de CFPI, quando comparado com os insetos controles. CFPI a 1% causou uma redução notável no valor de GI em cerca de 15%.

Tabela 8. Efeito de CFPI sobre a sobrevivência e o crescimento de *A. kuehniella**

Grupos	Larval		Pupal		Adulto	
	Duração (Dias ± DP)	Viabilidade (%)	Duração (Dias ± DP)	Viabilidade (%)	Duração (Dias ± DP)	Sobreviventes (%)
Controle	28 ± 1,4a	96,43 ± 3,4a	9 ± 1,06a	89,2 ± 3,5a	14 ± 2,3a	92,6 ± 3,2a
CFPI 1%	33 ± 2,6b	83,33 ± 4,2b	11 ± 1,14a	76,7 ± 2,5b	9,1 ± 2,4b	66,7 ± 4,5b

* Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (Tukey, $p<0,05$)

Tabela 9. Efeito de CFPI (1% na dieta) sobre o desenvolvimento de *A. kuehniella**

Grupos	%S[a]	TDT[b]	GI[c]
Controle	93 ± 3,2a	49 ± 2,7a	0,0402a
CFPI 1%	66 ± 4,5b	53 ± 1,2b	0,0343b

*Valores são a média ± DP. Letras diferentes mostram diferenças estatísticas significantes (Tukey, $p<0.05$).

[a] Sobrevivência durante o estágio adulto.

[b] TDT – tempo de desenvolvimento total (média do tempo de desenvolvimento por inseto em dias)

[c] GI – índice de crescimento [(log %S)/TDT]

2.2. Ingestão crônica de CFPI em relação às enzimas digestivas e ao peso de A. kuehniella da 2ª. geração

a) Efeito de CFPI sobre o peso médio larval

Na Figura 46, observa-se o efeito da ingestão de CFPI na 2ª. geração (F_1) de larvas de *A. kuehniella*. O grupo controle C2, que recebeu dieta com CFPI na 1ª. geração (F_0) e foi transferido para uma dieta controle na geração F_1, aparentemente conseguiu sobrepor a inibição de suas enzimas digestivas por CFPI, uma vez que apresentou um peso médio larval (9,1 mg) muito próximo do apresentado pela larvas C1 (10,4 mg), as quais somente se alimentaram de dieta controle, tanto em F_0 quanto em F_1. As larvas T1, que receberam dieta com CFPI apenas durante a geração F_1, mostraram um peso médio (4,9 mg) semelhante ao observado para as larvas T2 (4,1 mg), as quais se alimentaram com dieta contendo CFPI nas gerações F_0 e F_1. Em adição, as larvas T1 apresentaram uma redução de peso de 52% e 46% em relação aos grupos C1 e C2, respectivamente. As larvas T2 tiveram o peso reduzido em 60% e 54% em comparação com as larvas C1 e C2, respectivamente.

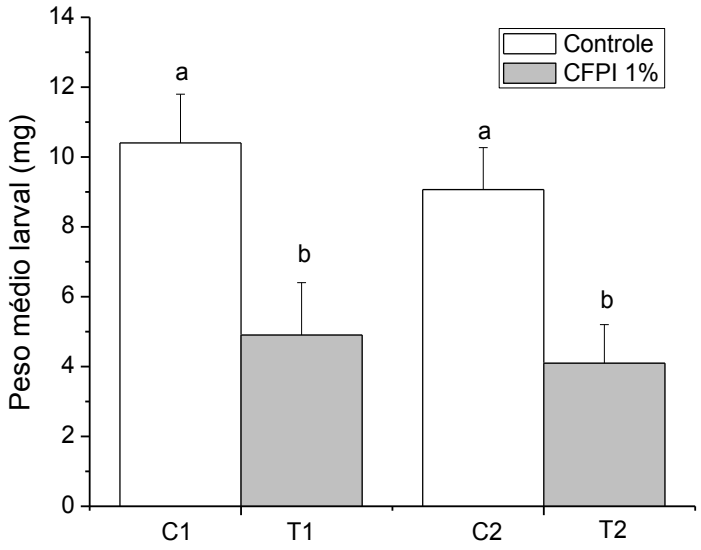

Figura 46. Peso médio de larvas de *A. kuehniella* da segunda geração (4° instar) alimentadas em uma dieta artificial controle ou em uma dieta contendo CFPI (w/w). Letras diferentes entre os tratamentos denotam diferenças estatísticas (ANOVA, $p<0,01$).

b) Purificação parcial das enzimas digestivas de A. kuehniella

De forma geral, o perfil de separação das proteínas detectadas a 280 nm se manteve uniforme em todos os grupos analisados (Figura 47 A-D). Em contraste, a quantidade de proteína em cada pico, medida a partir da absorbância a 280 nm, foi reduzindo gradativamente entre os grupos que receberam CFPI na dieta. Nós observamos uma redução de 62% na absorbância de proteínas de alta e intermediária massa molecular, localizadas entre as frações 10 a 12, das larvas T1 (Figura 47 B), quando comparado com o perfil proteico dosado das larvas C1 que somente se alimentaram de dieta controle (Figura 47 A). O grupo controle C2 (Figura 47 C), mostrou quantidades de proteínas de baixas massas moleculares (frações 20 a 40) similares aos grupos C1 e T1. Entretanto, as proteínas com alta e intermediária massa molecular (frações 10 a 12) de C2 foram consideravelmente

reduzidas a 70% e 53%, respectivamente, em relação aos grupos C1 e T1. Já o grupo T2, que se alimentou com dieta contendo CFPI durante F_0 e F_1 (Figura 47 D), apresentou uma redução drástica em todo o seu conteúdo proteico.

Das frações coletadas em gel filtração do homogenato do IM dos grupos larvais C1, T1, C2, T2 de *A. kuehniella*, verificamos que os picos majoritários com atividade para a tripsina ou quimotripsina foram os de alta e intermediária massa molecular (Figura 47 A-D). As larvas C1 (Figura 47 A) apresentaram três picos maiores de tripsina nas frações 8, 11 e 13, detectadas com BApNA. Nos demais grupos (Figuras 47 B-D), todavia, foram detectados apenas dois picos localizados nas frações 8 e 13, indicando que a dieta com CFPI alterou esse padrão de atividade enzimática, fazendo com que a tripsina da fração 11 em C1 deixasse de ser expressa quando em presença do inibidor nos grupos T1, C2 e T2. Além disso, o grupo C1 apresentou também uma atividade significante em tripsinas de massa molecular baixa, observada nas frações 15 a 20, que não foi verificada nos demais grupos. Nas larvas T1 (Figura 47 B), as tripsinas das frações 8 e 13 foram marcadamente inibidas por CFPI em 25% e 20%, respectivamente, quando comparadas com as larvas C1. É interessante notar que houve um aumento na atividade das tripsinas de baixa massa molecular nesse grupo T1 que não foi observado nos demais grupos. Nas larvas C2 e T2 ocorreu uma redução drástica na atividade das tripsinas, sendo que o efeito inibitório foi mais evidente em T2. A presença de CFPI na dieta causou uma inibição de aproximadamente 72% nas frações 8 e 13 das larvas C2 (Figura 47 C) em comparação com as larvas controle C1. No grupo T2 (Figura 47 D), ocorreu uma forte inibição de 90% e 82% nas frações trípticas 8 e 13, respectivamente, em relação às larvas C1.

Aparentemente, as quimotripsinas das larvas de *A. kuehniella*, determinadas com SAAPFpNA, foram menos suscetíveis ao tratamento com inibidor que as tripsinas. Todos os

grupos larvais apresentaram dois picos majoritários com atividade para a quimotripsina localizados nas frações 10 e 15. Entretanto, diferente ao observado para as enzimas tripsinas, as larvas T1 (Figura 47 B) mostraram uma discreta inibição na fração 10 de 6% e um aumento na atividade quimotríptica da fração 15 de 12%, quando comparado com as larvas C1. As larvas C2 (Figura 47 C) mostraram um aumento de atividade da quimotripsina nas frações 10 e 15 de 13% e 32%, respectivamente, em relação às larvas C1. Além disso, foi observado um aumento significativo na atividade das quimotripsinas de baixa massa molecular nas larvas C2 que não foi verificado nos demais grupos. Diferente das larvas C1, T1 e C2, o grupo larval T2 (Figura 47 D) mostrou inibição significativa de 25% na fração 10 e 37% na fração 15, em relação às quimotripsinas das larvas C1.

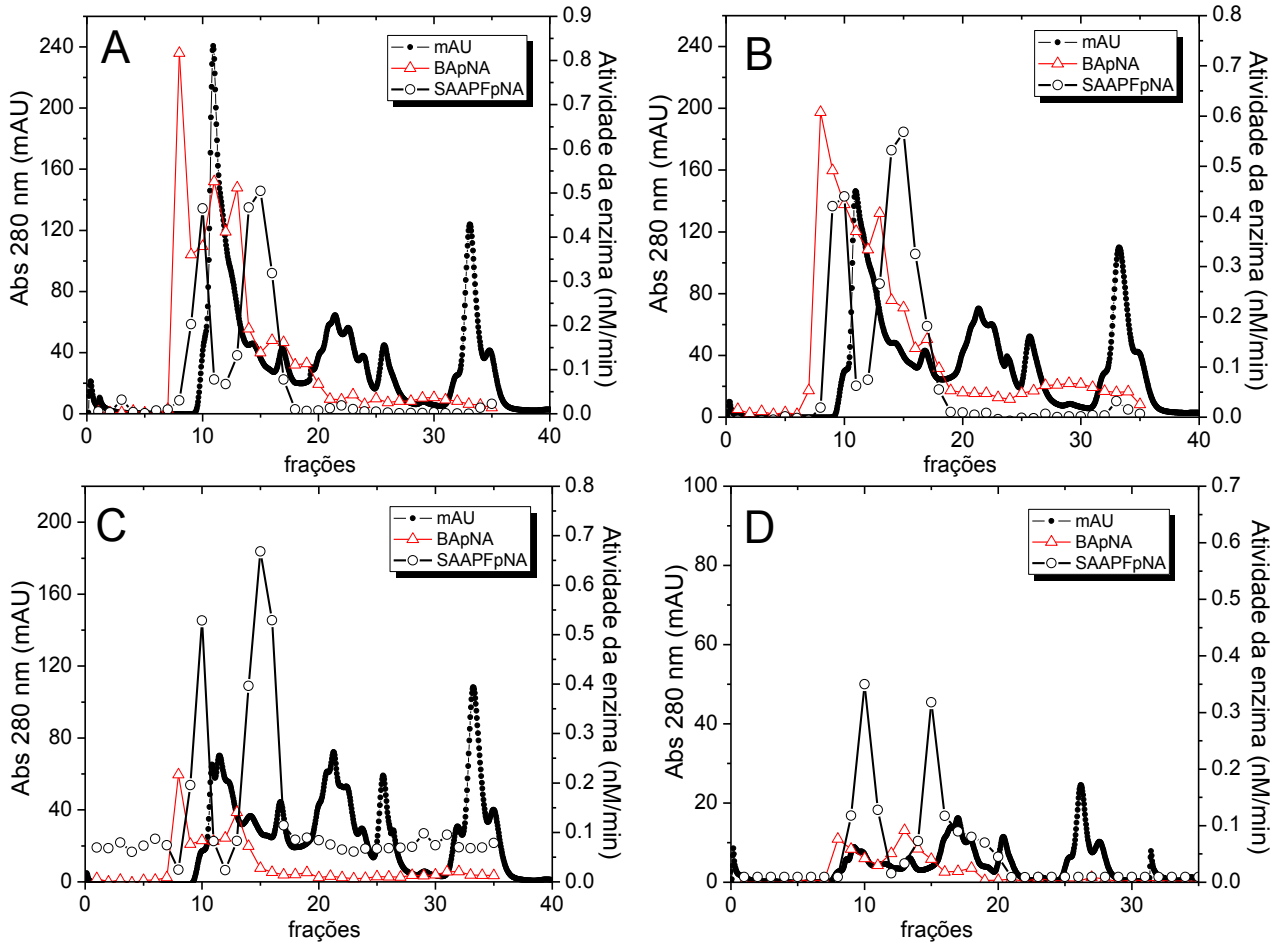

Figura 47. Gel filtração da fração solúvel de homogenatos do IM (300 μg de proteína) de larvas de 2ª. geração de *A. kuehniella* dividida nos seguintes grupos: A) Controle-C1; B) CFPI-T1; C) Controle 2ª. geração-C2; D) CFPI 1ª. e 2ª. geração-T2. A Superdex 75 foi equilibrada e eluída com tampão fosfato 20 mM, pH 7,2. O perfil proteico das frações coletadas (1mL/min) foi acompanhado a 280 nm. O conteúdo enzimático de cada fração foi dosado a 410 nm com BApNA (tripsina) e SAAPFpNA (quimotripsina). Este perfil é representativo de dois experimentos.

A partir da equação da reta produzida com o gráfico de curva de calibração da Superdex 75, calculou-se os seguintes valores aproximados de massa molecular relativa para as frações de tripsinas: fração 8 (>66 kDa), fração 11 (41 kDa), fração 13 (15 kDa).

Para as quimotripsinas, as massas moleculares relativas, foram: fração 10 (>66 kDa) e fração 15 (< 8 kDa).

c) Sensibilidade ao CFPI das enzimas tripsina e quimotripsina semi-purificadas de A. kuehniella

A atividade das frações de tripsina separadas por gel filtração, que foram previamente incubadas *in vitro* com o inibidor, revelou que as larvas C2 (Figura 48 C) se mostraram mais sensíveis ao inibidor que os outros grupos (Figura 48 A, B, D). Nas larvas C2, a fração 8 foi inibida em 35% e a fração 13 em 38% após incubação com CFPI. Apesar das larvas T2 apresentarem uma baixa atividade de suas tripsinas, essas se mostraram resistentes a inibição *in vitro* por CFPI (Figura 48 D).

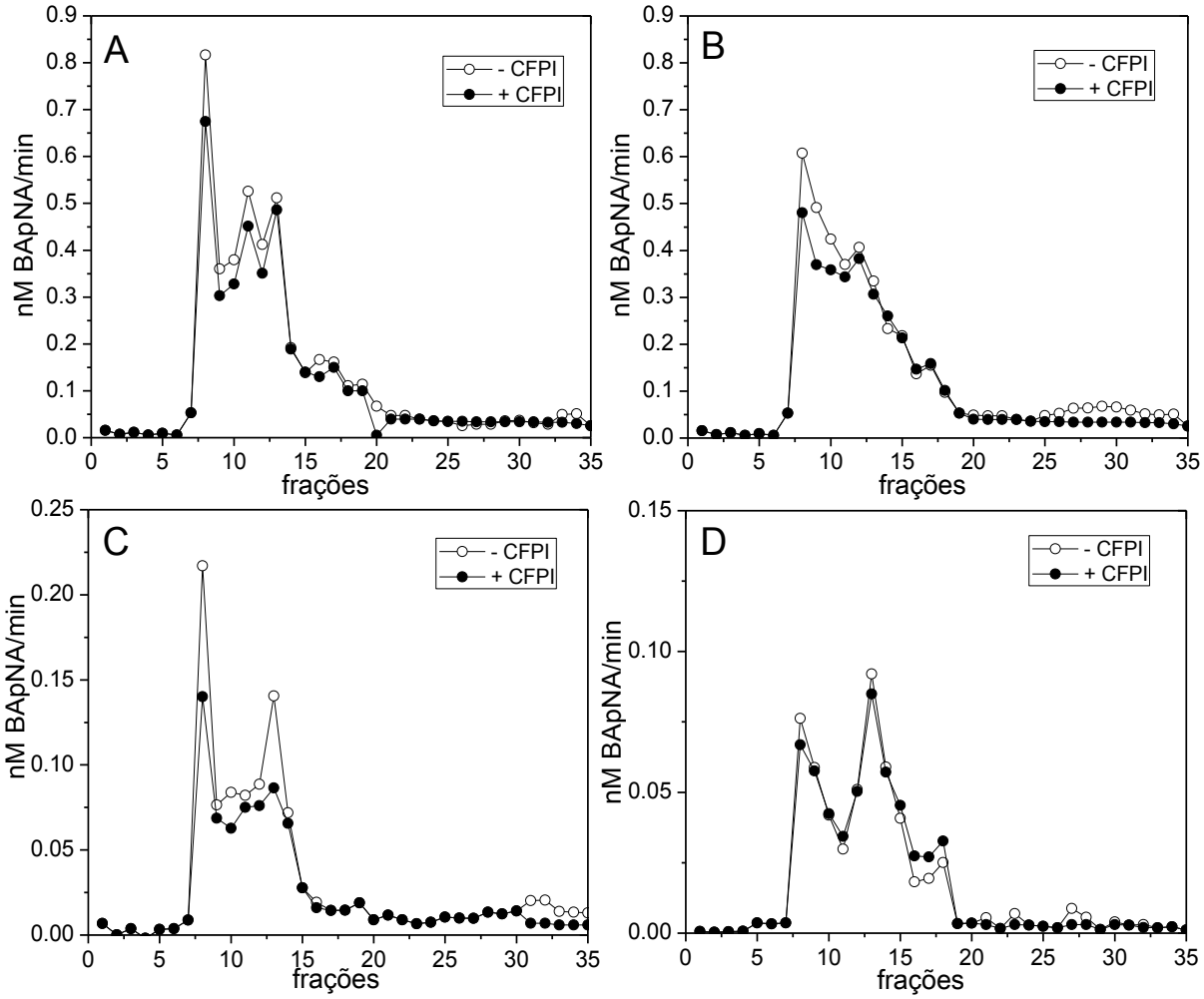

Figura 48. Perfil das tripsinas do IM (300 μg de proteína) de larvas de 2ª. geração de *A. kuehniella* após gel filtração (○) ou posteriormente a incubação *in vitro* com CFPI das frações trípticas obtidas na gel filtração (●). Cada figura corresponde aos seguintes grupos: A) Controle-C1; B) CFPI-T1; C) Controle 2ª. geração-C2; D) CFPI 1ª. e 2ª. geração-T2. A atividade das tripsinas foi determinada a 410 nm utilizando o substrato BApNA. Este perfil é representativo de dois experimentos.

Comparando a atividade das frações quimotrípticas coletadas na gel filtração com as mesmas após incubação *in vitro* com o inibidor, podemos observar que a quimotripsina da fração 15 mostrou-se resistente a inibição por CFPI em todos os grupos larvais (Figura 49 A-D). Em contraste, a atividade da quimotripsina da fração 10 foi inibida após incubação com

CFPI em todos os grupos larvais, mostrando uma redução de 25%, 39%, 56% e 53% em C1, T1, C2, T2, respectivamente.

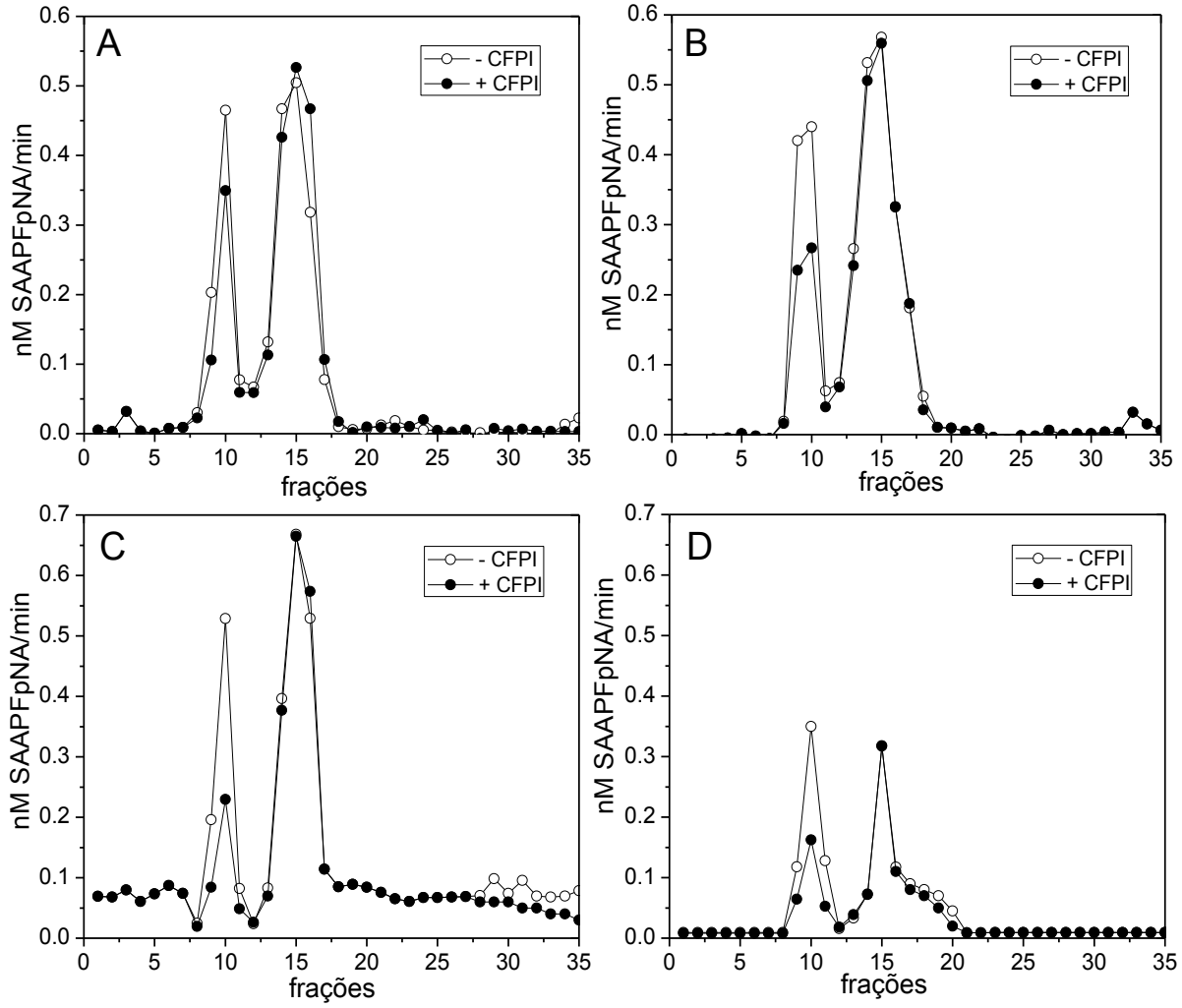

Figura 49. Perfil das quimotripsinas do IM (300 μg de proteína) de larvas de 2ª. geração de *A. kuehniella* após gel filtração (○) ou posteriormente a incubação *in vitro* com CFPI das frações trípticas obtidas na gel filtração (●). Cada figura corresponde aos seguintes grupos: A) Controle-C1; B) CFPI-T1; C) Controle 2ª. geração-C2; D) CFPI 1ª. e 2ª. geração-T2. A atividade das quimotripsinas foi determinada a 410 nm utilizando o substrato SAAPFpNA. Este perfil é representativo de dois experimentos.

IV. DISCUSSÃO

1. Efeito da ingestão aguda de CFPI sobre as enzimas digestivas de A. kuehniella

a) Ingestão aguda de CFPI (3 a 24hs)

A ingestão aguda de CFPI por larvas de *A. kuehniella* do 4° instar, inicialmente causou uma redução na atividade das tripsinas e quimotripsinas, o que sugere que as enzimas sensíveis ao CFPI foram inibidas. Entretanto, após um período de 6 horas, houve um aumento na atividade das tripsinas, indicando maior síntese dessas enzimas. Os níveis de tripsina foram similares por até 24 horas, sugerindo que a quantidade de enzima produzida estava suficiente para o processo de digestão, e nesse caso, um provável mecanismo de feedback foi acionado para que as peptidases permanecessem com a mesma atividade. Já as quimotripsinas, apesar de ter sua atividade diminuída durante as três primeira horas de ingestão do CFPI, manteve os mesmos níveis dessa peptidase ao longo de 24 horas, o que indica que essas quimotripsinas são pouco afetadas por CFPI. Bown *et al.* (2004) analisou a complexa resposta dos insetos polífagos aos IPs, relacionado ao tempo de ingestão, e concluiu que esta é dividida em 3 fases: uma fase inicial, na qual todos os RNA mensageiros que codificam proteases são aumentados e ocorre durante as primeiras 12 hs em contato com o inibidor. Uma segunda fase envolve a supressão de sequências de proteases sensíveis, ocorrendo entre 12 e 24 hs e é seguida pela terceira fase, na qual as diferenças nos níveis de RNA mensageiros são mantidas em relação às larvas alimentadas controles.

O zimograma das larvas alimentadas com CFPI durante os vários intervalos de tempo mostra nitidamente a inibição da peptidase de 21,5 kDa e o aumento na atividade da banda proteolítica de aproximadamente 31 kDa, em concordância com os resultados observados no zimograma das larvas que ingeriram CFPI cronicamente até o 4° instar. A banda de 21,5 kDa provavelmente seja uma tripsina, embora aparentemente não tenha sido inibida por TLCK porque este foi incubado em concentração muito baixa com o intestino. Essa hipótese é sustentada pelo fato de que, no zimograma das larvas de 4° instar alimentadas cronicamente com CFPI, a banda de 21,5 kDa é inibida por TLCK. Dessa forma, ocorre desde os primeiros momentos de ingestão do inibidor, uma inibição das tripsinas de 25 e 21,5 kDa, uma discreta redução na quimotripsina de 20 kDa e um aumento na quimotripsina de 31 kDa, além de um aumento nas peptidases de 66 kDa ou mais.

O TLCK é um inibidor irreversível da tripsina que alquila o resíduo de His-57 que está presente no seu sítio ativo. Como as peptidases de 66 kDa podem ser oligômeros de tripsinas ou quimotripsinas menores e estes oligômeros geralmente possuem o sítio ativo com difícil acesso, então esses podem não ser inibidos por TLCK, mesmo se tratando de tripsinas. Machado *et al.* (2013) observaram no gel de eletroforese com gelatina do IM de larvas de *A. kuehniella,* do 3° ao 5° instar, 5 bandas de atividade proteolítica: 2 com massa molecular de 66 kDa ou mais, 1 de 34 kDa, 1 com aproximadamente 30 kDa e a menor com cerca de 18 kDa, sendo as massas próximas das encontradas com o gel de caseína realizado em nosso estudo.

b) Ingestão aguda de CFPI (72 a 144 hs)

A ingestão aguda de CFPI por 72 horas, contrariamente aos intervalos de 6 a 24 horas, mostra uma redução na atividade das tripsinas e quimotripsinas em relação à larvas tratadas durante esses tempos, ou ainda comparado às larvas alimentadas por 72 horas em dieta controle. Todavia, quando metade das larvas alimentadas com CFPI são transferidas para uma dieta controle por mais 72 horas, a atividade das tripsinas e quimotripsinas se restabelecem aos níveis das larvas controle. Esses resultados indicam que a redução na atividade enzimática, durante este intervalo de 72 a 144 horas, foi causada pela presença de CFPI na dieta, uma vez que as larvas T2, quando foram transferidas para uma dieta controle, apresentaram atividade enzimática semelhante às larvas C2.

Uma observação importante é que as larvas de 4° instar mantidas em dieta por 144 horas estão muito próximas do 5° instar que precede o estágio pupal. Assim sendo, a atividade das peptidases digestivas costuma reduzir, em relação ao 4° instar, e essas enzimas tendem a ser mais resistentes ao inibidor que as presentes nos instares anteriores. Outros trabalhos também observaram que *A. kuehniella* no 5° instar larval apresenta maior resistência aos inibidores, sugerindo que a mudança na sensibilidade das enzimas digestivas somente ocorre no instar final (MACHADO *et al.*, 2013).

Apesar da atividade das enzimas digestivas ter restabelecido aos níveis controle quando as larvas T2 foram transferidas para uma dieta sem inibidor, o peso médio dessas foi menor em relação às larvas controles. Esse resultado sugere um grande gasto energético e

um desvio dos aminoácidos obtidos na alimentação para a síntese de peptidases digestivas pelas larvas T2, prejudicando o seu ganho de peso.

O zimograma corrobora com os resultados de dosagens enzimáticas, pois apresenta inibição das peptidases de 66 e 30 kDa após alimentação das larvas com CFPI por 72 horas. Além disso, a atividade proteolítica geral das larvas T2 foi similar às larvas controles.

Parâmetros cinéticos como o K_m aparente evidenciam que as enzimas digestivas de *A. kuehniella* das larvas C2 e T2 aumentaram a afinidade pelos substratos no intervalo de 144 horas. Esse comportamento contribuiu para reduzir a ação do inibidor e aumentar a competição com o substrato pelo sítio ativo das enzimas. Similar aos nossos resultados, CPTI (inibidor de tripsina de feijão de corda) e LBTI (inibidor de tripsina de feijão lima) inibiram as enzimas intestinais de *Helicoverpa armigera* competitivamente (JOHNSTON *et al*., 1991).

Os ensaios de digestão do inibidor por peptidases digestivas também estão de acordo com os resultados anteriormente mostrados, uma vez que apontaram uma maior atividade enzimática nas larvas C2 e principalmente em T2. Assim sendo, podemos considerar que o inibidor incubado com C1 e T1 resistiu a digestão por até 24 hs. Todavia, CFPI incubado com C2 e T2 não foi degradado por até 12 e 10 hs, respectivamente. O fato de que CFPI não incubado com intestino exibiu uma banda maior que posteriormente a incubação por 1 hora, pode indicar que uma parte do inibidor desfez-se de sua forma dimérica quando em presença das proteases digestivas. A resistência de CFPI a digestão por peptidases de *A. kuehniella* em até 24 horas mostra que o inibidor é suficientemente estável para causar efeitos negativos no processo digestivo desse inseto. Estudos anteriores observaram que após 24 horas de incubação à 30 °C, intestinos controles de *A. kuehniella* perdem naturalmente a atividade enzimática (MACHADO *et al*., 2013), explicando o fato do ensaio ser conduzido até

esse ponto. Portanto, podemos considerar que CFPI pode exercer efeito deletério ao inseto porque resistiu a digestão por pelo menos 10 horas, tempo no qual o intestino controle já perdeu grande parte de sua atividade, conforme Machado *et al.* (2013).

2. Efeito da ingestão crônica de CFPI sobre A. kuehniella de 1ª. e 2ª. geração

2.1. Ingestão crônica de CFPI em relação ao desenvolvimento de A. kuehniella de 1ª. geração

Para analisar se o inibidor afetou o desenvolvimento de *A. kuehniella*, o consumo crônico de CFPI foi avaliado em relação aos seus diferentes estágios de vida, assim como a sobrevivência dos adultos e o tempo de desenvolvimento total do inseto. CFPI a 1% causou um atraso considerável de até 7 dias nos períodos larval e pupal e estendeu o período de desenvolvimento de larva a adulto. A ingestão crônica de CFPI causou a inibição de parte das enzimas proteolíticas do intestino do inseto e, dessa forma, alterou o processo de digestão larval. A ausência de aminoácidos causada por uma digestão deficiente prejudicou o desenvolvimento larval e, consequentemente, resultou em um aumento na mortalidade dos adultos de 27%.

O índice de crescimento (GI) mede os efeitos do alimento sobre a sobrevivência e o tempo de desenvolvimento do inseto (HOWE, 1971). Assim sendo, um alimento impróprio pode prolongar o período de desenvolvimento do indivíduo e reduzir sua taxa de sobrevivência, o que resulta em um valor de GI baixo. As larvas que se alimentaram com dieta contendo CFPI a 1% apresentaram uma redução significante em GI de cerca de 15%,

assegurando um atraso no tempo de desenvolvimento total do inseto por afetar o seu crescimento e sobrevivência.

Alguns IPs que são efetivos contra peptidases intestinais, apresentam pouco efeito sobre o crescimento ou o desenvolvimento do inseto quando incorporado em uma dieta. Por exemplo, o inibidor de *C. cajan* mostrou efeito moderado sobre o crescimento e desenvolvimento de *Manduca sexta* quando comparado à forte atividade inibitória contra peptidases do intestino (PRASAD, E.R. *et al.*, 2010). Outros IPs apresentaram redução no peso larval, mas não tiveram efeito sobre a mortalidade larval para insetos polífagos (BROADWAY, 1996; PETEK *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2013). Tratamento de *S. frugiperda* com EATI (inibidor de tripsina de *Entada acaciifolia*) reduziu a massa larval e estendeu seu estágio de desenvolvimento, todavia, não foi capaz de afetar os períodos pupal e adulto (OLIVEIRA *et al.*, 2013). O inibidor do presente estudo foi efetivo contra o polífago *A. kuehniella*, considerando que ele alterou o crescimento e o desenvolvimento do inseto.

2.2. Ingestão crônica de CFPI em relação às enzimas digestivas e ao peso de A. kuehniella da 2ª. geração

Para uma análise ainda mais detalhada da ação de CFPI sobre este inseto polífago, demonstramos os efeitos do inibidor sobre a geração F_1. A maioria dos estudos publicados associando a resposta de insetos-praga aos compostos de defesa de plantas são realizados em um curto período de tempo, como por exemplo, com a geração F_0 e até um certo instar (FALCO e SILVA-FILHO, 2003; MURICKEN e GOWDA, 2010). Todavia, experimentos conduzidos em mais que uma geração podem revelar diferenças nas respostas entre gerações (RAHBÉ *et al.*, 2003; AZZOUZ *et al.*, 2005; CACCIALUPI *et al.*, 2010).

Verificamos que o peso médio das larvas da geração F_1 tratadas com CFPI a 1% (T1 e T2) apresentou maior redução em relação aos grupos controles (C1 e C2) do que o peso das larvas tratadas da geração F_0 comparadas com seu respectivo controle. Enquanto as larvas T1 e T2 mostraram uma redução de cerca de 50% em seu peso médio, comparadas com as larvas C1 e C2, respectivamente, na geração F_0 houve uma diminuição de 36% no peso das larvas tratadas até o 4° instar. Esses resultados sugerem uma efetividade maior do inibidor na geração F_1 do que na geração F_0. Todavia, devemos também considerar que o número de larvas e repetições (2 repetições) desse experimento foi menor em relação ao da geração F_0 (4 repetições), o que significa que os resultados aqui apresentados poderiam se aproximar mais dos obtidos na primeira geração se fossem repetidos mais vezes.

No processo de purificação parcial das enzimas digestivas de *A. kuehniella* da geração F_1, identificamos 3 picos majoritários de tripsina com massas moleculares aproximadas maiores que 66kDa, de 41 kDa e 15 kDa para as larvas C1. Já nas larvas que tiveram contato com o inibidor, somente dois picos de tripsina foram observados, sendo que o de 41 kDa foi inibido. Para as quimotripsinas, foram observados 2 picos majoritários, sendo o primeiro maior que 66 kDa e o outro menor que 8 kDa. Embora a maioria das tripsinas e quimotripsinas descritas na literatura possuem massa molecular em torno de 20 a 35 kDa (TERRA e FERREIRA, 2005), a presença de peptidases com massa de 66 kDa ou maior pode indicar um processo de oligomerização. Substituições de resíduos de aminoácidos podem alterar a hidrofobicidade de proteases resistentes, e as peptidases hidrofóbicas possuem maior tendência a formar oligômeros, o que acaba dificultando o acesso dos IPs de plantas ao sítio ativo enzimático (BRITO *et al.*, 2001).

Constatamos que a medida que as larvas foram permanecendo maior tempo em contato com a dieta contendo CFPI, maior foi o seu efeito inibitório sobre o conteúdo

enzimático e proteico. Desse modo, as larvas T2 que se alimentaram com CFPI durante F_0 e F_1, mostraram reduções drásticas de conteúdo proteico e forte inibição enzimática, principalmente para as tripsinas. Interessante notar que as tripsinas remanescentes em T2 mostraram insensibilidade ao inibidor e houve a síntese de uma tripsina induzida na fração 18. As larvas C2 que se alimentaram com CFPI somente em F_0, apresentaram o perfil de proteínas próximo das não tratadas (C1) e restabeleceram a atividade das quimotripsinas, mostrando um aumento no pico de 8 kDa, insensível ao CFPI, como efeito compensatório à baixa atividade das tripsinas. As larvas T1, tratadas com CFPI na geração F_1, também mostraram aumento na produção das quimotripsinas de 8kDa, além de uma redução das tripsinas e conteúdo proteico menor que nas larvas C1.

Em geral, observamos que CFPI continuou sendo efetivo para larvas de *A. kuehniella* da geração F_1 e constatamos que o inseto tentou sobrepor os efeitos negativos do inibidor desviando parte do seu conteúdo proteico para a síntese de peptidases insensíveis, principalmente quimotripsinas.

V. CONCLUSÕES

- Em larvas de *A. kuehniella* da geração F1, também houve a inibição das peptidases digestivas, concomitante ao aumento de quimotripsinas insensíveis;

- CFPI causou um efeito antinutricional sobre *A. kuehniella* significante, em dieta artificial, até a geração F_1.

CAPÍTULO 6

PERSPECTIVAS FUTURAS

Pretendemos investigar outras funções biológicas para o inibidor, como por exemplo, ação anti-fúngica e anti-bacteriana, efeito anti-carcinogênico, efeito na coagulação sanguínea e etc.

Outro estudo refere-se ao efeito sinérgico do inibidor com outra proteína de defesa em larvas de *Helicoverpa armigera*, uma praga exótica com grande poder de destruição, que causa prejuízos às lavouras de milho, soja e algodão.

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.,** v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ARRUDA, L. H. **Caracterização estrutural da interação de serino proteinases de Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae) e inibidores de proteinases de plantas.** . 2011. (Doutor). Genética e Melhoramento de Plantas, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP Piracicaba

AZARKAN, M.; DIBIANI, R.; GOORMAGHTIGH, E.; RAUSSENS, V.; BAEYENS-VOLANT, D. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β-sheet glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics,** v. 1764, n. 6, p. 1063-1072, 2006.

AZZOUZ, H.; CHERQUI, A.; CAMPAN, E. D. M.; RAHBÉ, Y.; DUPORT, G.; JOUANIN, L.; KAISER, L.; GIORDANENGO, P. Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman–Birk inhibitor, on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera, Aphididae) and its parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphelinidae). **J. Insect Physiol.,** v. 51, n. 1, p. 75-86, 2005.

BALDWIN, I. T. An Ecologically Motivated Analysis of Plant-Herbivore Interactions in Native Tobacco. **Plant Physiology,** v. 127, n. 4, p. 1449-1458, 2001.

BARBOSA, J. A. R. G.; SILVA, L. P.; TELES, R. C. L.; ESTEVES, G. F.; AZEVEDO, R. B.; VENTURA, M. M.; DE FREITAS, S. M. Crystal Structure of the Bowman-Birk Inhibitor from *Vigna unguiculata* Seeds in Complex with β-Trypsin at 1.55 Å Resolution and Its Structural Properties in Association with Proteinases. **Biophys. J.,** v. 92, n. 5, p. 1638-1650, 2007.

BARRETT, K. L.; TOXICOLOGY, S. O. E.; EUROPE, C.; SETAC-EUROPE; EUROPE, C. O.; EUROPEAN; ORGANISATION, M. P. P.; GROUP, B. A. R. T.; BIOLOGICAL, I. O. F.; ANIMALS, I. C. O. N.; PLANTS. **Guidance Document on Regulatory Testing Procedures for Pesticides and Non-target Arthropods: From the ESCORT Workshop (European Standard Characteristics Of Beneficials Regulatory Testing) : a Joint BART, EPPO/CoE and IOBC Workshop Organised in Conjunction with SETAC-Europe and Funded by the EC : Held at IAC Wageningen, the Netherlands : 28-30 March 1994**. SETAC, 1994. ISBN 9780952253525.

BEHMER, S. T.; LLOYD, C. M.; RAUBENHEIMER, D.; STEWART-CLARK, J.; KNIGHT, J.; LEIGHTON, R. S.; HARPER, F. A.; SMITH, J. A. C. Metal hyperaccumulation in plants: mechanisms of defence against insect herbivores. **Functional Ecology,** v. 19, n. 1, p. 55-66, 2005.

BELITZ, H. D.; WEDER, J. K. P. Protein inhibitors of hydrolases in plant foodstuffs. **Food Reviews International,** v. 6, n. 2, p. 151-211, 1990.

BENTO, J. M. S. Perdas por insetos na agricultura. **Ação Ambiental,** v. 4, p. 19-21, 1999.

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, 2009.

BIJINA, B.; CHELLAPPAN, S.; BASHEER, S. M.; ELYAS, K. K.; BAHKALI, A. H.; CHANDRASEKARAN, M. Protease inhibitor from *Moringa oleifera* leaves: Isolation, purification, and characterization. **Process Biochemistry,** v. 46, n. 12, p. 2291-2300, 2011.

BIRK, Y. Protein proteinase inhibitors in legume seeds--overview. **Arch Latinoam Nutr,** v. 44 (4 Suppl 1), p. 26S-30S, 1996.

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

BOLTER, C.; JONGSMA, M. A. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **J Insect Physiol,** v. 43(10), n. 1879-1611 (Electronic), p. 885-895, 20030528 1997.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. **Physiol. Entomol.,** v. 29, n. 3, p. 278-290, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.,** v. 72, p. 248-54, May 1976.

BRIOSCHI, D.; NADALINI, L. D.; BENGTSON, M. H.; SOGAYAR, M. C.; MOURA, D. S.; SILVA-FILHO, M. C. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. **Insect Biochem. Mol. Biol.,** v. 37, n. 12, p. 1283-1290, 2007.

BRITO, L. O.; LOPES, A. R.; PARRA, J. R. P.; TERRA, W. R.; SILVA-FILHO, M. C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology B Biochemistry & Molecular Biology,** v. 128, n. 2, p. 365-375, 2001.

BROADWAY, R. M. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Arch. Insect Biochem. Physiol.,** v. 32, n. 1, p. 39-53, 1996.

BROWN, W. E.; TAKIO, K.; TITANI, K.; RYAN, C. A. Wound-induced trypsin inhibitor in alfalfa leaves: Identity as a member of the Bowman-Birk inhibitor family. **Biochemistry,** v. 24, n. 9, p. 2105-2108, 1985.

BUENO, N. R.; FRITZ, H.; AUERSWALD, E. A.; MENTELE, R.; SAMPAIO, M.; SAMPAIO, C. A. M.; OLIVA, M. L. Primary structure of *Dioclea glabra* trypsin inhibitor, DgTI, a Bowman-Birk inhibitor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.,** v. 261 (3), p. 838-843, 1999.

CACCIALUPI, P.; CECI, L. R.; SICILIANO, R. A.; PIGNONE, D.; CLEMENTE, A.; SONNANTE, G. Bowman-Birk inhibitors in lentil: Heterologous expression, functional characterisation and anti-proliferative properties in human colon cancer cells. **Food Chemistry,** v. 120, n. 4, p. 1058-1066, 2010.

CAPALDI, S.; PERDUCA, M.; FAGGION, B.; CARRIZO, M. E.; TAVA, A.; RAGONA, L.; MONACO, H. L. Crystal structure of the anticarcinogenic Bowman–Birk inhibitor from snail medic (Medicago scutellata) seeds complexed with bovine trypsin. **Journal of Structural Biology,** v. 158, n. 1, p. 71-79, 2007.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon,** v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002.

CHRISTELLER, J. T., FARLEY, P.C., RAMSAY, R.J., SULLIVAN, P.A., & LAING, W.A. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. **European journal of biochemistry / FEBS,** v. 254, p. 160-7, 1998.

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.

COELHO, M.; MACEDO, M.; MARANGONI, S.; SILVA, D.; CESARINO, I.; MAZZAFERA, P. Purification of legumin-like proteins from *Coffea arabica* and *Coffea racemosa* seeds and their insecticidal properties toward cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) (Coleoptera: Bruchidae). **J Agric Food Chem,** v. 58, n. 5, p. 3050-5, Mar 2010.

COELHO, M.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and the rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol,** v. 146, n. 3, p. 406-14, Sep 2007.

CORRÊA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **Academic Journals,** v. 3 (5), p. 164-173, 2009.

CRUZ, A. C. B.; MASSENA, F. S.; MIGLIOLO, L.; MACEDO, L. L. P.; MONTEIRO, N. K. V.; OLIVEIRA, A. S.; MACEDO, F. P.; UCHOA, A. F.; GROSSI DE SÁ, M. F.; VASCONCELOS, I. M.; MURAD, A. M.; FRANCO, O. L.; SANTOS, E. A. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from Catanduva (Piptadenia moniliformis) seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, n. 0, 2013.

DE PAOLA, D.; BLANCO, E.; PIERRI, C. L.; SONNANTE, G. Isolation and characterization of novel variants of BBI coding genes from the legume *Lathyrus sativus*. **Plant Physiol. Biochem.,** v. 57, n. 0, p. 45-53, 2012.

DELMAR, E. G.; LARGMAN, C.; BRODRICK, J. W.; GEOKAS, M. C. A sensitive new substrate for chymotrypsin. **Anal. Biochem.,** v. 99, n. 2, p. 316-320, 1979.

DOMONEY, C.; WELHAM, T.; SIDEBOTTOM, C.; FIRMIN, J. L. Multiple isoforms of *Pisum* trypsin inhibitors result from modification of two primary gene products. **FEBS Lett.,** v. 360 (1), p. 15-20, 1995.

DUARTE AGUILAR, J. A.; ARTHUR, V. Dose letal de radiação gama para ovos de Corcyra cephalonica (Stainton, 1865) (Lepidoptera: Pyralidae), traça do arroz. **Scientia Agricola,** v. 51, p. 191-194, 1994.

ELANGER, B.; NOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.,** v. 95, p. 271-278, 1961.

FALCO, M. C.; MARBACH, P. A. S.; POMPERMAYER, P.; LOPES, F. C. C.; SILVA-FILHO, M. C. Mechanisms of sugarcane response to herbivory. **Genet. Mol. Biol.,** v. 24, p. 113-122, 2001.

FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiol. Biochem.,** v. 41, n. 8, p. 761-766, 2003.

FANG, E. F.; HASSANIEN, A. A.; WONG, J. H. B.; BAH, C. S. F.; SOLIMAN, S. S.; NG, T. B. Isolation of a new trypsin inhibitor from the Faba bean (*Vicia faba* cv. Giza 843) with potential medicinal applications. **Protein Pept. Lett.,** v. 18, p. 64-72, 2011.

FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. **Curr Opin Biotechnol.,** v. 15 (2), p. 155-61, 2004.

FRANCO, O. L.; DOS SANTOS, R. C.; BATISTA, J. A.; MENDES, A. C.; DE ARAUJO, M. A.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SA, M. F.; DE FREITAS, S. M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of Anthonomus grandis. **Phytochemistry,** v. 63(3), p. 343-9, 2003.

FRIZZAS, M. R.; OLIVEIRA, C. M. Plantas transgênicas resistentes a insetos e organismos não-alvo: predadores, parasitóides e polinizadores. **Universitas: Ciências da Saúde,** v. 4, p. 63-82, 2006.

GATEHOUSE, A. M. R.; BOULTER, D. Assessment of the antimetabolic effects of trypsin inhibitors from cowpea (Vigna unguiculata) and other legumes on development of the bruchid beetle Callosobruchus maculatus. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** v. 34, n. 4, p. 345-350, 1983.

GOODAY, G. W. Aggressive and defensive roles for chitinases. **EXS,** v. 87, n. 1023-294X (Print), p. 157-69, 20000816 DCOM- 20000816 1999.

GOVIND, G.; MITTAPALLI, O.; GRIEBEL, T.; ALLMANN, S.; BÖCKER, S.; BALDWIN, I. T. Unbiased Transcriptional Comparisons of Generalist and Specialist Herbivores Feeding on Progressively Defenseless *Nicotiana attenuata* Plants. **PLoS ONE,** v. 5, n. 1, p. e8735, 2010.

HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Archives of Biochemistry and Biophysics,** v. 431, n. 1, p. 145-159, 2004.

HARUTA, M.; MAJOR, I. T.; CHRISTOPHER, M. E.; PATTON, J. J.; CONSTABEL, C. P. A Kunitz trypsin inhibitor gene family from trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.): cloning, functional expression, and induction by wounding and herbivory. **Plant Molecular Biology,** v. 46, n. 3, p. 347-359, 2001.

HILKER, M.; MEINERS, T. How do plants "notice" attack by herbivorous arthropods? **Biological Reviews,** v. 85, n. 2, p. 267-280, 2010.

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

HOWE, R. A parameter for expressing the suitability of an environment for insect development. **J. Stored Prod. Res.,** v. 7, n. 1, p. 63-65, 1971.

JAMES, M. N. G. Handbook of proteolytic enzymes, edited by A. J. Barrett, N. D. Rawlings, and J. F. Woessner. 1998. London: Academic Press. 1666 pp. $250.00. $90.00 for the CD-ROM. **Protein Science,** v. 8, n. 3, p. 693-694, 1999.

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.

JOHNSTON, K. A.; LEE, M. J.; GATEHOUSE, J. A.; ANSTEE, J. H. The partial purification and characterisation of serine protease activity in midgut of larval Helicoverpa armigera. **Insect Biochemistry,** v. 21, n. 4, p. 389-397, 1991.

JOSÉ, M. O. M. A. **Inibidores de proteinase do tipo Bowman-Birk: evolução molecular, expressão na superfície de fagos filamentosos e seu papel na interação planta-inseto**. 2002. 108 Doutorado (Doutor). ESALQ-USP

KAMEL, A. H. E.; ALI, M. A.; EL-BISHLAWAY, H. M. Effect of flour constituents on certain biological aspects of rice moth, Corcyra cephalonica (Stainton) (Lep. Galleridae). **Bulletin de la Societe Entomologique d'Egipte,** v. 61, p. 137-142, 1977.

KRAUCHENCO, S.; NAGEM, R. A. P.; DA SILVA, J. A.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Three-dimensional structure of an unusual Kunitz (STI) type trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorffii*. **Biochimie,** v. 86, n. 3, p. 167-172, 2004.

KRISHNA, P. N.; AYYAR, B. A. A very destructive pest of stored product in South India, Corcyra cephalonica Stainton (Lepidoptera). **Bulletin of Entomological Research,** v. 25, p. 155-169, 1934.

KUMAR, P.; RAO, A. G. A.; HARIHARAPUTRAN, S.; CHANDRA, N.; GOWDA, L. R. Molecular Mechanism of Dimerization of Bowman-Birk Inhibitors: pivotal role of Asp76 in the dimerization. **J. Biol. Chem.,** v. 279, n. 29, p. 30425-30432, 2004.

KUMAR, P.; SREERAMA, Y. N.; GOWDA, L. R. Formation of Bowman-Birk inhibitors during the germination of horsegram (*Dolichos biflorus*). **Phytochemistry,** v. 60 (6), p. 581-8, 2002.

LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature,** v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 1970.

LASKOWSKI, M.; KATO, I. Protein Inhibitors of Proteinases. **Annu. Rev. Biochem.,** v. 49, n. 1, p. 593-626, 1980.

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

LEE, M. J.; ANSTEE, J. H. Endoproteases from the midgut of larval Spodoptera littoralis include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. **Insect Biochemistry and Molecular Biology,** v. 25, n. 1, p. 49-61, 1995.

LIBANTOVÁ, J.; KÄMÄRÄINEN, T.; MORAVČÍKOVÁ, J.; MATUŠÍKOVÁ, I.; SALAJ, J. Detection of chitinolytic enzymes with different substrate specificity in tissues of intact sundew (Drosera rotundifolia L.). **Molecular Biology Reports,** v. 36, n. 5, p. 851-856, 2009.

LIOI, L.; GALASSO, I.; DAMINATI, M.; PIERGIOVANNI, A. Inhibitory properties and binding loop polymorphism in Bowman-Birk inhibitors from Phaseolus species. **Genet. Resour. Crop. Ev.,** v. 57, n. 4, p. 533-542, 2010.

LOPES, A. R. **Serina endopeptidases de insetos e a interação inseto-planta**. 2004. 168 Doutorado (Doutorado). Universidade de São Paulo

LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. **Arch. Insect Biochem. Physiol.,** v. 55, n. 3, p. 140-152, 2004.

LOPES, A. R.; SATO, P. M.; TERRA, W. R. Insect chymotrypsins: chloromethyl ketone inactivation and substrate specificity relative to possible coevolutional adaptation of insects and plants. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology,** v. 70, n. 3, p. 188-203, 2009.

MACEDO, M.; PANDO, S.; CHEVREUIL, L.; 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 Peptide Lett,** v. 16, n. 12, p. 1459-65, 2009.

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

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; CABRINI, E. C.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biochim. Biophys. Acta,** v. 1621, n. 2, p. 170-182, 2003.

MACEDO, M. L. R.; MELLO, G. C.; FREIRE, M. D. G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; DE MATOS, D. G. G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. **Plant Physiol. Biochem.,** v. 40, n. 10, p. 891-898, 2002.

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). **J. Agric. Food Chem.,** v. 61, n. 10, p. 2469-2478, 2013.

MAEDER, D. L.; SUNDE, M.; BOTES, D. P. Design and inhibitory properties of synthetic Bowman-Birk loops. **International Journal of Peptide and Protein Research,** v. 40, n. 2, p. 97-102, 1992.

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.

MCBRIDE, J. D.; WATSON, E. M.; BRAUER, A. B. E.; JAULENT, A. M.; LEATHERBARROW, R. J. Peptide mimics of the Bowman-Birk inhibitor reactive site loop. **Biopolymers,** v. 66 (2), n. 0006-3525 (Print), p. 79-92, 20020926 DCOM-20021120 2002.

MELLO, G. C. **Estudo dos papéis biológicos dos inibidores de Kunitz isolados de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth: atividade inseticida e inflamatória**. 2005. 158 (Doutor). Depto. Bioquímica, UNICAMP, Instituto de Biologia.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Brazilian Journal of Plant Physiology,** v. 14, p. 71-81, 2002.

MELLO, M. O.; TANAKA, A. S.; SILVA-FILHO, M. C. Molecular evolution of Bowman–Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. **Mol. Phylogenet. Evol.,** v. 27, n. 1, p. 103-112, 2003.

MOHAN BABU, R.; SAJEENA, A.; SEETHARAMAN, K.; REDDY, M. S. Advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management—an over view. **Crop Protection,** v. 22, n. 9, p. 1071-1086, 2003.

MURICKEN, D. G.; GOWDA, L. R. Functional expression of horsegram (Dolichos biflorus) Bowman–Birk inhibitor and its self-association. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics,** v. 1804, n. 7, p. 1413-1423, 2010.

NISHIDA, R. SEQUESTRATION OF DEFENSIVE SUBSTANCES FROM PLANTS BY LEPIDOPTERA. **Annual Review of Entomology,** v. 47, n. 1, p. 57-92, 2002.

ODANI, S.; IKENAKA, T. Scission of Soybean Bowman-Birk Proteinase Inhibitor into Two Small Fragments Having Either Trypsin or Chymotrypsin Inhibitory Activity. **Journal of Biochemistry,** v. 74, n. 4, p. 857-860, 1973.

ODANI, S.; KOIDE, T.; ONO, T. Wheat germ trypsin inhibitors. Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of the Bowman-Birk type. **J Biochem,** v. 100 (4), p. 975-983, 1986.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science,** v. 144, p. 31-43, 2005.

OLIVEIRA, A. S.; MIGLIOLO, L.; AQUINO, R. O.; RIBEIRO, J. K. C.; MACEDO, L. L. P.; ANDRADE, L. B. S.; BEMQUERER, M. P.; SANTOS, E. A.; KIYOTA, S.; DE SALES, M. P. Purification and characterization of a trypsin–papain inhibitor from Pithecelobium dumosum seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. **Plant Physiology and Biochemistry,** v. 45, n. 10–11, p. 858-865, 2007.

OLIVEIRA, C. F. R. **Aspectos funcionais e estruturais do inibidor de tripsina de Entada acaciifolia**. 2011. 111 (Mestrado). Depto. Bioquímica, UNICAMP, Instituto de Biologia.

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. **Comp. Biochem. Physiol. B,** 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. D. 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.

PAIVA, P. M. G.; SANTANA, G. M. S.; SOUZA, I. F. A. C.; ALBUQUERQUE, L. P.; AGRA-NETO, A. C.; ALBUQUERQUE, A. C.; LUZ, L. A.; NAPOLEÃO, T. H.; COELHO, L. C. B. B. Effect of lectins from Opuntia ficus indica cladodes and Moringa oleifera seeds on survival of Nasutitermes corniger. **International Biodeterioration and Biodegradation,** v. 65, n. 7, p. 982-989, 2011.

PAOLETTI, M.; PIMENTEL, D. Environmental Risks of Pesticides Versus Genetic Engineering for Agricultural Pest Control. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics,** v. 12, n. 3, p. 279-303, 2000.

PARK, E. Y.; KIM, J.-A.; KIM, H.-W.; KIM, Y. S.; SONG, H. K. Crystal Structure of the Bowman–Birk Inhibitor from Barley Seeds in Ternary Complex with Porcine Trypsin. **Journal of Molecular Biology,** v. 343, n. 1, p. 173-186, 2004.

PARRA, J. R. P. **Técnicas de criação de insetos para programas de controle biológico**. ESALQ/FEALQ, 1999.

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.; LOPES, A. R.; CRISTOFOLETTI, P. T.; PARRA, J. R.; TERRA, W. R.; SILVA-FILHO, M. C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **J Econ Entomol,** v. 93, n. 3, p. 892-6, Jun 2000.

PEREIRA, R. A.; VALENCIA-JIMENEZ, A.; MAGALHAES, C. A.; PRATES, M. V.; MELO, J. A. T.; DE LIMA, L. M.; DE SALES, M. P.; NAKASU, E. Y. T.; DA SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SA, M. F. Effect of a Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Phaseolus coccineus* on *Hypothenemus hampei* gut proteinases in vitro. **J. Agric. Food Chem.**, 2007.

PETEK, M.; TURNŠEK, N.; GAŠPARIČ, M. B.; NOVAK, M. P.; GRUDEN, K.; SLAPAR, N.; POPOVIČ, T.; ŠTRUKELJ, B.; JONGSMA, M. A. A Complex of genes involved in adaptation of *Leptinotarsa decemlineata* larvae to induced potato defense. **Arch. Insect Biochem. Physiol.,** v. 79, n. 3, p. 153-181, 2012.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A. R.; TERRA, W. R.; PARRA, J. R. P.; FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomol. Exp. Appl.,** v. 99, n. 1, p. 79-85, 2001.

PRAKASH, B.; MURTHY, M. R. N.; SREERAMA, Y. N.; RAO, D. R.; GOWDA, L. Studies on simultaneous inhibition of trypsin and chymotrypsin by horsegram Bowman-Birk inhibitor. **J. Biosci.,** v. 22, n. 5, p. 545-554, 1997.

PRAKASH, B.; SELVARAJ, S.; MURTHY, M. R.; SREERAMA, Y. N.; RAO, D. R.; GOWDA, L. R. Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors. **J. Mol. Evol.,** v. 42 (5), n. 0022-2844 (Print), p. 560-9, 19960826 DCOM- 19960826 1996.

PRASAD, E. R.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Insecticidal potential of Bowman–Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pests. **Pestic. Biochem. Physiol.,** v. 98, n. 1, p. 80-88, 2010a.

PRASAD, E. R.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Purification and characterization of a Bowman-Birk proteinase inhibitor from the seeds of black gram (*Vigna mungo*). **Phytochemistry,** v. 71, n. 4, p. 363-372, 2010b.

PRASAD, E. R.; MERZENDORFER, H.; MADHURAREKHA, C.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Cajanus cajan* seeds: purification, characterization, and insecticidal properties. **J. Agric. Food Chem.,** v. 58, n. 1520-5118 (Electronic), p. 2838-2847, 20100303 DCOM- 20100719 2010.

PYTELKOVÁ, J.; HUBERT, J.; LEPSÍK, M.; SOBOTNÍK, J.; SINDELKA, R.; KRÍZKOVÁ, I.; HORN, M.; MARES, M. Digestive α-amylases of the flour moth Ephestia kuehniella– adaptation to alkaline environment and plant inhibitors. **FEBS Journal,** v. 276, n. 13, p. 3531-3546, 2009.

RAGG, E. M.; GALBUSERA, V.; SCARAFONI, A.; NEGRI, A.; TEDESCHI, G.; CONSONNI, A.; SESSA, F.; DURANTI, M. Inhibitory properties and solution structure of a potent Bowman-Birk protease inhibitor from lentil (*Lens culinaris*, L) seeds. **FEBS Lett.,** v. 17, p. 4024-39, 2006.

RAHBÉ, Y.; FERRASSON, E.; RABESONA, H.; QUILLIEN, L. Toxicity to the pea aphid *Acyrthosiphon pisum* of anti-chymotrypsin isoforms and fragments of Bowman–Birk protease inhibitors from pea seeds. **Insect Biochem. Mol. Biol.,** v. 33, n. 3, p. 299-306, 2003.

RAJ, S. S. S.; KIBUSHI, E.; KURASAWA, T.; SUZUKI, A.; YAMANE, T.; ODANI, S.; IWASAKI, Y.; YAMANE, T.; ASHIDA, T. Crystal Structure of Bovine Trypsin and Wheat Germ Trypsin Inhibitor (I-2b) Complex (2:1) at 2.3 Å Resolution. **Journal of Biochemistry,** v. 132, n. 6, p. 927-933, 2002.

RAKWAL, R.; KUMAR AGRAWAL, G.; JWA, N.-S. Characterization of a rice (Oryza sativa L.) Bowman–Birk proteinase inhibitor: tightly light regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. **Gene,** v. 263, n. 1–2, p. 189-198, 2001.

RAMASARMA, P. R.; RAO, A. G. A.; RAO, D. R. Kinetic and structural studies on the interaction of proteinase inhibitor from *Dolichos biflorus* (horse gram). **J. Agric. Food Chem.,** v. 42, n. 10, p. 2139-2146, 1994.

RAMOS, V. S.; FREIRE, M. G.; PARRA, J. R.; MACEDO, M. L. R. Regulatory effects of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). **Comp. Biochem. Physiol., A: Comp. Physiol.,** v. 152, n. 2, p. 255-61, Feb 2009.

RAMOS, V. S.; SILVA, G. S.; FREIRE, M. G.; MACHADO, O. L.; PARRA, J. R.; MACEDO, M. L. R. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds. **J. Agric. Food Chem.,** v. 56, n. 23, p. 11348-55, Dec 2008.

RAO, K. N.; SURESH, C. G. Bowman–Birk protease inhibitor from the seeds of *Vigna unguiculata* forms a highly stable dimeric structure. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics,** v. 1774, n. 10, p. 1264-1273, 2007.

RAWLINGS, N. D.; WALLER, M.; BARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. . **Nucleic Acids Res,** v. 42, n. 05-04-2014, p. D503-D509, 2014.

RUFINO, F. P. S.; PEDROSO, V. M. A.; ARAUJO, J. N.; FRANÇA, A. F. J.; RABÊLO, L. M. A.; MIGLIOLO, L.; KIYOTA, S.; SANTOS, E. A.; FRANCO, O. L.; OLIVEIRA, A. S. Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from Pithecellobium dumosum (Benth) seeds against insect-pests' digestive proteinases. **Plant Physiology and Biochemistry,** v. 63, n. 0, p. 70-76, 2013.

RYAN, C. A. Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors in Plants. **Annual Review of Plant Physiology,** v. 24, n. 1, p. 173-196, 1973.

SAKAL, E.; APPLEBAUM, S. W.; BIRK, Y. Purification and characterization of Locusta migratoria chymotrypsin. **International Journal of Peptide and Protein Research,** v. 32, n. 6, p. 590-598, 1988.

SAMPAIO, C. A.; OLIVA, M. L.; SAMPAIO, M. U.; BATISTA, I. F.; BUENO, N. R.; TANAKA, A. S.; AUERSWALD, E. A.; FRITZ, H. Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes. **Immunopharmacology,** v. 32 (1-3), n. 0162-3109 (Print), p. 62-66, 19970214 DCOM- 19970214 1996.

SAMPAIO, C. A. M.; OLIVA, M. L. V.; SAMPAIO, M. U.; BATISTA, I. F. C.; BUENO, N. R.; TANAKA, A. S.; AUERSWALD, E. A.; FRITZ, H. Plant serine proteinase inhibitors. Structure and biochemical applications on plasma kallikrein and related enzymes. **Immunopharmacology,** v. 32, n. 1-3, p. 62-66, 1996.

SCARAFONI, A.; CONSONNI, A.; GALBUSERA, V.; NEGRI, A.; TEDESCHI, G.; RASMUSSEN, P.; MAGNI, C.; DURANTI, M. Identification and characterization of a Bowman–Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in Lupinus albus seeds. **Phytochemistry,** v. 69, n. 9, p. 1820-1825, 2008.

SCHECHTER, I.; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. **Biochem. Bioph. Res. Co. ,** v. 27 (2), n. 0006-291X (Print), p. 157-62, 19671014 DCOM- 19671014 1967.

SCIENCES, N. A. O. El desarme de un virus mortal: las proteases y sus inhibidores. http://www7.nationalacademies.org/spanishbeyonddiscovery/bio_008233-01.html, 2013. Acesso em: 17-10-2013.

SILVA, C. P.; SAMUELS, R. I. Plant Defense Proteins That Inhibit Insect Peptidases. In: (Ed.). **Ecological Aspects of Nitrogen Metabolism in Plants**: John Wiley & Sons, Inc., 2011. p.280-307. ISBN 9780470959404.

SINDAG. Uso de defensivos é intensificado no Brasil. 2012. Disponível em: < http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2278 >. Acesso em: 15-10-2013.

SINGH, R. R.; APPU RAO, A. G. Reductive unfolding and oxidative refolding of a Bowman–Birk inhibitor from horsegram seeds (*Dolichos biflorus*): evidence for 'hyperreactive' disulfide bonds and rate-limiting nature of disulfide isomerization in folding. **Biochim. Biophys. Acta,** v. 1597, n. 2, p. 280-291, 2002.

SMITH, J. L.; DE MORAES, C. M.; MESCHER, M. C. Jasmonate- and salicylate-mediated plant defense responses to insect herbivores, pathogens and parasitic plants. **Pest Manag Sci,** v. 65(5), p. 497-503, 2009.

SREERAMA, Y. N.; GOWDA, L. R. Bowman−Birk Type Proteinase Inhibitor Profiles of Horse Gram (*Dolichos biflorus*) during Germination and Seed Development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 46, n. 7, p. 2596-2600, 1998.

SUMIKAWA, J.; BRITO, M.; MACEDO, M.; UCHOA, A.; MIRANDA, A.; ARAUJO, A.; SILVA-LUCCA, R.; SAMPAIO, M.; OLIVA, M. The defensive functions of plant inhibitors are not restricted to insect enzyme inhibition. **Phytochemistry,** v. 71, n. 2-3, p. 214-20, Feb 2010.

TABATABAEI, P. R.; HOSSEININAVEH, V.; GOLDANSAZ, S. H.; TALEBI, K. Biochemical characterization of digestive proteases and carbohydrases of the carob moth, Ectomyelois ceratoniae (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Asia-Pacific Entomology,** v. 14, n. 2, p. 187-194, 2011.

TAMAKI, F. K. **Serino proteinases digestivas de insetos-modelo**. 2011. 160 Doutorado (Doutor). Depto. Bioquímica, Universidade de São Paulo USP

TECNIGRAN. Pragas: Anagasta kuehniella (traça da farinha). 2013. Disponível em: < http://www.tecnigran.com.br/index.php/pragas/41 >. Acesso em: 24-10-2013.

TEIMOURI, N.; SENDI, J. J.; ZIBAEE, A.; KHOSRAVI, R. Feeding indices and enzymatic activities of carob moth *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: pyrallidae) on two commercial pistachio cultivars and an artificial diet. **J. Saudi Society Agri. Science**, n. 0, 2013.

TERRA, W.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol., B: Comp. Biochem.,** v. 109, n. 1, p. 1-62, 1994.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. 4.5 - Biochemistry of Digestion. In: EDITORS-IN-CHIEF: LAWRENCE, I. G.;KOSTAS, I.*, et al* (Ed.). **Comprehensive Molecular Insect Science**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p.171-224. ISBN 978-0-444-51924-5.

TIAN, D.; TOOKER, J.; PEIFFER, M.; CHUNG, S. H.; FELTON, G. W. Role of trichomes in defense against herbivores: comparison of herbivore response to woolly and hairless trichome mutants in tomato (Solanum lycopersicum). **Plant** v. 236(4), p. 1053-66, 2012.

TREVISAN, H.; DE NADAI, J.; LUNZ, A. M.; CARVALHO, A. G. D. Consumo foliar e aspectos biológicos de Urbanus acawoios (Lep.: Hesperiidae) alimentado com folíolos de *Clitoria fairchildiana* (Leguminosae: Faboideae) em três níveis de maturidade. **Ciência Rural,** v. 34, p. 1-4, 2004.

VAZQUEZ-PADRON, R. I.; MORENO-FIERROS, L.; NERI-BAZAN, L.; DE LA RIVA, G. A.; LOPEZ-REVILLA, R. Intragastric and intraperitoneal administration of Cry1Ac protoxin from Bacillus thuringiensis induces systemic and mucosal antibody responses in mice. **Life Sci,** v. 64, p. 1897-1912, 1999.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry 4th Edition**. New York: John Wiley & Sons Inc., 2010.

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.

WALDBAUER, G. P. The Consumption and Utilization of Food by Insects. In: J.W.L. BEAMENT, J. E. T. e WIGGLESWORTH, V. B. (Ed.). **Adv. Insect Physiol.** : Academic Press, v.Volume 5, 1968. p.229-288. ISBN 0065-2806.

WHITWORTH, S. T.; BLUM, M. S.; TRAVIS, J. Proteolytic Enzymes from Larvae of the Fire Ant, Solenopsis invicta : ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF FOUR SERINE ENDOPEPTIDASES. **Journal of Biological Chemistry,** v. 273, n. 23, p. 14430-14434, June 5, 1998 1998.

WILSON, C.; TISDELL, C. Why farmers continue to use pesticides despite environmental, health and sustainability costs. **Ecological Economics,** v. 39, n. 3, p. 449-462, 2001.

WILSON, K. A.; CHEN, J. C. Amino Acid Sequence of Mung Bean Trypsin Inhibitor and Its Modified Forms Appearing during Germination. **Plant Physiol.,** v. 71, p. 341-349, 1983.

YE, X. Y.; NG, T. B.; RAO, P. F. A Bowman–Birk-Type Trypsin-Chymotrypsin Inhibitor from Broad Beans. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 289, n. 1, p. 91-96, 2001.

YOSHIDA, C.; YOSHIKAWA, M. Purification and characterization of proteinase inhibitors from adzuki beans (*Phaseolus angularis*). **J. Biochem. ,** v. 78 (5), p. 935-945, 1975.

YOUNG, N. D.; DEBELLÉ, F.; OLDROYD, G. E. D.; GEURTS, R.; CANNON, S. B.; UDVARDI, M. K. The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. **Nature**, 2011.

ZHOU, J.-Y.; LIAO, H.; ZHANG, N.-H.; TANG, L.; XU, Y.; CHEN, F. Identification of a Kunitz inhibitor from Albizzia kalkora and its inhibitory effect against pest midgut proteases. **Biotechnology Letters,** v. 30, n. 8, p. 1495-1499, 2008.

ZHU-SALZMAN, K.; ZENG, R. S. Molecular mechanisms of insect adaptation to plant defense: Lessons learned from a Bruchid beetle. **Insect Science,** v. 15, n. 6, p. 477-481, 2008.