

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
MATO GROSSO DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

SUZY WIDER MACHADO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DO  
TIPO KUNITZ DE SEMENTES DE *Acacia polyphylla* DC. E SEU  
POTENCIAL BIOINSETICIDA CONTRA *Anagasta kuehniella*  
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

Orientador: Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo

Co-orientador: Profa. Dra. Susana Elisa Moreno

UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
MATO GROSSO DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

SUZY WIDER MACHADO

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE UM INIBIDOR DO  
TIPO KUNITZ DE SEMENTES DE *Acacia polyphylla* DC. E SEU  
POTENCIAL BIOINSETICIDA CONTRA *Anagasta kuehniella*  
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

Dissertação apresentada como  
um dos requisitos para  
obtenção do grau de Mestre  
em Biologia Vegetal junto ao  
Centro de Ciências Biológicas  
e da Saúde

CAMPO GRANDE

2013

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora, Profa. Dra. Maria Lígia Rodrigues Macedo, pela dedicação na orientação e pelas lições dentro e fora do laboratório através de seu exemplo de disciplina, liderança e amor à ciência.

Aos meus colegas do LPPFB pela amizade, companheirismo e pela paciência em me auxiliar sempre que necessário, um verdadeiro grupo de trabalho e de apoio.

Aos meus colegas de república que aguentaram bravamente algumas mudanças de humor ao longo desse período.

Ao meu companheiro Eder, pelo seu amor, dedicação e carinho.

## RESUMO

As plantas sintetizam uma variedade de moléculas de defesa contra ataques de herbívoros, dentre essas moléculas encontram-se os inibidores de proteinases. Esse estudo descreve a purificação e caracterização de um novo inibidor de tripsina do tipo Kunitz, presente em sementes de *Acacia polyphylla*. A purificação foi realizada através de métodos cromatográficos em coluna de filtração em gel, coluna de afinidade e RP-HPLC. O efeito inseticida do inibidor purificado foi testado contra *Anagasta kuehniella* (traça da farinha), um inseto-praga polígafo, pertencente a ordem Lepidoptera, predador de uma variedade de grãos e produtos armazenados, responsável por prejuízos econômicos no mundo todo. O inibidor isolado, denominado AcKI (*Acacia polyphylla* Kunitz Inhibitor), apresenta duas cadeias polipeptídicas, com aproximadamente 20 kDa, e através da análise em RP-HPLC foi possível identificar quatro isoformas dessa proteína. O AcKI possui alta estabilidade à variações de temperatura e pH e não é digerido pelas enzimas digestivas de *A. kuehniella*. O efeito inseticida do AcKI *in vivo* foi testado sobre larvas de terceiro, quarto e quinto ínstar, as quais com uma concentração de 0,5% de AcKI na dieta, apresentaram redução de cerca de 50% do peso e alterações nos parâmetros nutricionais, tais como aumento do custo metabólico e menor porcentagem de conversão do alimento ingerido em biomassa. Quanto as alterações bioquímicas, no último estágio larval houve aumento na síntese de tripsinas e quimotripsinas nativas, bem como a síntese de isoformas dessas enzimas insensíveis ao AcKI. No entanto apesar da resposta adaptativa de *A. kuehniella*, o inseto foi suscetível. O AcKI mostrou efeito antinutricional sobre as larvas de *A. kuehniella* e aparenta ser uma proteína promissora para a biotecnologia de plantas resistentes a inseto-praga.

## ABSTRACT

Plants synthesize a variety of defense molecules against herbivore attacks, including proteinase inhibitors. This study describes the purification of a new kunitz-type trypsin inhibitor from *Acacia polyphylla* seeds by chromatographic methods in gel filtration column, affinity column and RP-HPLC; as well as their characterization and insecticidal properties against *Anagasta kuehniella* (mediterranean flour moth), a polyphagous insect pest, predator of a variety of grains and stored products, that have caused economic losses worldwide. The inhibitor isolated in this work, called AcKI (*Acacia polyphylla* Kunitz Inhibitor), presents two polypeptide chains, with approximated molecular mass of 20 kDa and by HPLC analysis was possible to identify four isoforms of this protein. Stability study showed that the AcKI is highly stable to changes in temperature and pH and it is not digested by digestive enzymes of *A. kuehniella*. Insecticidal effect of AcKI *in vivo* was tested on third, fourth and fifth-instar larvae, and at a concentration of AcKI 0,5%, showed a reduction of approximately 50% in weight and a changes on nutritional parameters, such as increase in metabolic cost and reducing of a percentage of ingested food converted into biomass. Regarding the biochemical changes, in the last larval stage, there was increase in the synthesis of native trypsin and chymotrypsin, as well as the synthesis of isoforms of these enzymes insensitive to AcKI. However despite the adaptive response of *A. kuehniella*, the insect was susceptible. Thus, AcKI has an anti-nutritional effect of *A. kuehniella* and appears to be a protein promising for biotech plants resistant to insect pest.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

<b>FIGURA 1 – ESQUEMA DA ESTRUTURA PRIMÁRIA DE INIBIDORES KUNITZ .....</b>	<b>20</b>
<b>FIGURA 2 – <i>Anagasta kuehniella</i> (Zeller) .....</b>	<b>24</b>
<b>FIGURA 2 – <i>Acacia polyphylla</i> DC.....</b>	<b>25</b>

### ARTIGO

<b>FIGURA 1 – ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DO AcKI .....</b>	<b>69</b>
<b>FIGURA 2 – ESTABILIDADE TÉRMICA E AO pH.....</b>	<b>70</b>
<b>FIGURA 3 – POTENCIAL INIBITÓRIO DO AcKI SOBRE AS ENZIMAS DIGESTIVAS .....</b>	<b>71</b>
<b>FIGURA 4 – COMPARAÇÃO DA INIBIÇÃO ENTRE O AcKI, TLCK e TPCK.....</b>	<b>71</b>
<b>FIGURA 5 – EFEITO DO AcKI SOBRE AS LARVAS DE <i>A. kuehniella</i> .....</b>	<b>72</b>
<b>FIGURA 6 – ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA TRIPSINA .....</b>	<b>73</b>
<b>FIGURA 7 – ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DA QUIMOTRIPSINA .....</b>	<b>73</b>
<b>FIGURA 8 – ZIMOGRAMA DAS ENZIMAS DO INTESTINO MÉDIO .....</b>	<b>74</b>
<b>FIGURA 9 – SENSIBILIDADE DAS ENZIMAS DO INTESTINO MÉDIO AO AcKI .....</b>	<b>75</b>
<b>FIGURA 10 – DIGESTÃO DO AcKI .....</b>	<b>76</b>

## **LISTA DE TABELAS**

### **ARTIGO**

<b>TABELA 1 – ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA AMINO -TERMINAL .....</b>	<b>68</b>
<b>TABELA 2 – PARÂMETROS NUTRICIONAIS .....</b>	<b>68</b>

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

<b>TABELA 1 – PLANTAS TRANSGÊNICAS EXPRESSANDO GENES DE IPs .....</b>	<b>79</b>
---	-----------

## ÍNDICE

I	INTRODUÇÃO GERAL .....	10
1	INSETOS-PRAGA .....	10
2	PROTEÍNAS TÓXICAS DE PLANTAS .....	11
3	LECTINAS .....	11
4	PROTEÍNAS INATIVADORAS DE RIBOSSOMOS.....	13
5	INIBIDORES DE $\alpha$ - AMILASE .....	15
6	ARCELINAS .....	16
7	CANATOXINAS .....	16
8	INIBIDORES DE PROTEINASES.....	17
9	PROTEASES DO INTESTINO DE INSETOS LEPIDOPTERA.....	21
10	ADAPTAÇÃO DOS INSETOS AOS INIBIDORES DE PROTEASES .....	22
11	<i>Anagasta kuehniella</i> (ZELLER).....	23
12	<i>Acacia polyphylla</i> DC. ....	24
II	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
III	RESUMO.....	42
IV	INTRODUÇÃO .....	43
V	MATERIAL E MÉTODOS .....	44
1	MATERIAIS .....	44
2	INSETOS.....	45
3	PURIFICAÇÃO DO AcKI.....	45
4	ANÁLISE EM RP-HPLC DO AcKI PURIFICADO .....	46
5	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS .....	46
6	ENSAIO DE ATIVIDADE INIBITÓRIA.....	46
7	ELETROFORESE E FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA .....	46
8	ESTABILIDADE TÉRMICA E AO pH .....	47



9 SEQUENCIAMENTO AMINO -TERMINAL .....	47
10 PREPARAÇÃO DO INTESTINO MÉDIO .....	48
11 ATIVIDADE INIBITÓRIA DO AcKI, TLCK E TPCK SOBRE ENZIMAS DIGESTIVAS.....	48
12 EFEITO DO ACKI SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE <i>A. kuehniella</i> .....	48
13 PARÂMETROS NUTRICIONAIS .....	49
14 ZIMOGRAFIA DAS PROTEASES DO INTESTINO MÉDIO .....	49
15 EFEITO DO AcKI SOBRE AS PROTEASES DO INTESTINO MÉDIO.....	50
16 DIGESTÃO DO AcKI .....	50
17 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	51
VI RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	51
1 PURIFICAÇÃO DO AcKI.....	51
2 ESTABILIDADE TÉRMICA E AO pH .....	52
3 SEQUENCIAMENTO AMINO - TERMINAL .....	52
4 ATIVIDADE INIBITÓRIA DO AcKI .....	53
5 EFEITO DO AcKI SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE <i>A. kuehniella</i> .....	54
6 EFEITO DO AcKI SOBRE AS ENZIMAS DIGESTIVAS .....	56
7 DIGESTÃO DO AcKI .....	57
VII ABREVIACÕES.....	58
VIII AGRADECIMENTOS.....	59
IX LITERATURA CITADA .....	60
X CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
XI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80

## **I - INTRODUÇÃO GERAL**

A agricultura moderna enfrenta diversos desafios no tocante à qualidade e produção de alimentos no planeta. Segundo a FAO (Food and Agriculture Organization), em 2050, é estimada que a população humana seja 35% maior do que a atual, exigindo da agricultura mundial uma maior produção, em um cenário com menos recursos, mais pragas e com pressões ambientais e climáticas cada vez maiores.

Desse modo torna-se necessário a busca por alternativas que venham contribuir para o desenvolvimento da agricultura de maneira sustentável, auxiliando na otimização da produção, através do fornecimento de ferramentas que possibilitem a superação dos problemas encontrados no cenário atual.

O aumento da população implica em uma maior demanda por grãos para suprir as necessidades humanas e animais. Da mesma forma, aumenta a demanda no uso de biocombustíveis onde se utiliza matéria-prima vegetal, que é igualmente atacada por pragas.

Dentre os obstáculos encontrados na produção agrícola, destacam-se as perdas causadas por ataques de uma variedade de pragas, como nematóides, vírus, bactérias e insetos, que podem chegar até 45% (OERKE *et al.*, 1994). Devido a isso, pesquisadores e empresas têm unido esforços para encontrar alternativas sustentáveis no controle dessas pragas.

### **1. Insetos-praga**

O número de espécies de insetos descritas é de aproximadamente um milhão, das quais 10% são pragas (GALLO *et al.*, 2002). Os danos causados por insetos são variáveis, podendo ser observados em todos os órgãos da planta. Podem causar danos diretos, quando atacam o produto a ser comercializado, ou indiretos quando atacam estruturas vegetais não comercializadas, mas que alteram os processos fisiológicos, provocando reflexos na produção.

Os insetos são responsáveis pela maior parte da perda na produção agrícola, podendo chegar até 20% nas maiores culturas (FERRY *et al.*, 2004), além de alimentarem-se da planta, podem atuar injetando substâncias tóxicas durante o

processo alimentar ou ainda causar injúrias que facilitam a instalação de patógenos que induzem doenças (CARLINI e GROSSI DE SÁ, 2002).

As maiores culturas e grãos armazenados sofrem ataques principalmente por insetos da ordem Lepidoptera, seguidos pela ordem Coleoptera (GALLO *et al.*, 2002).

Inseticidas convencionais para combater tal problema, são bastante utilizados. Entretanto é um método altamente danoso ao meio ambiente. O uso desses agroquímicos geram resíduos tóxicos, prejudicando o meio ambiente, poluindo terras, lençóis freáticos, podendo causar danos à saúde humana e a animais quando utilizados de maneira incorreta ou excessiva (OERKE *et al.*, 1994).

## **2. Proteínas Tóxicas de Plantas**

As plantas possuem proteínas tóxicas inseticidas, que estão envolvidas no seu mecanismo natural de defesa, contribuindo para melhores chances de sobrevivência da espécie (READ e HAAS, 1938). As proteínas inseticidas estão localizadas geralmente em sementes e órgãos de reserva, mas podem ser encontradas em outros órgãos da planta, como, raiz, caule e folha (RICHARDSON, 1991).

Essas proteínas conferem determinados graus de resistência à planta contra insetos herbívoros, nematóides e microrganismos, como bactérias, fungos e vírus. Podem ser constitutivas da planta, ou induzidas cuja síntese é desencadeada em consequência a alguma injúria (BOWLES, 1990).

As proteínas envolvidas no mecanismo de defesa de plantas mais estudadas são as lectinas (CHRISPEELS e RAIKHEL, 1991; PEUMANS e VAN DAMME, 1995), proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs) (BARBIERI *et al.*, 1993), inibidores de  $\alpha$  - amilase (ISHIMOTO e KITAMURA, 1989), arcelinas (OSBORN *et al.*, 1988), canatoxinas (CARLINI *et al.*, 1997) e os inibidores de proteinases (RYAN, 1990 e KOIWA *et al.*, 1997) estes com destaque pela natureza do presente trabalho.

## **3. Lectinas**

As Lectinas são uma classe de proteínas não imunes, com ao menos um domínio não catalítico que se liga de forma específica e reversível a mono ou

oligossacarídeos, são tipicamente multivalentes, daí a sua capacidade de aglutinar as células (VIJAYAN e CHANDRA, 1999). O termo lectina (do latim, *legere*, relativo ao verbo selecionar) foi dado por Boyd, em 1949, para enfatizar a capacidade de algumas hemaglutininas de discriminar células sanguíneas contidas no sistema sanguíneo ABO (BOYD e REGUERA, 1949). As moléculas de lectinas podem se apresentar constitutivamente na planta, ou ter a sua síntese induzida (MICHIELS *et al.*, 2010; VAN DAMME *et al.*, 2008).

As lectinas têm afinidade por açúcares, formando glicoconjugados, interagindo em soluções ou através de marcadores localizados na superfície celular dessas moléculas. Essa propriedade promove a essas proteínas uma variedade de aplicações na biotecnologia de plantas e no campo das ciências biomédicas (VAN DRIESCHE *et al.*, 1996).

Lectinas são bastante encontradas na natureza, e um grande número de moléculas já tem sido isolado. Sementes, particularmente de leguminosas, são ricas fontes de lectinas. Cerca de 40% das estruturas tridimensionais de lectinas depositadas no banco de dados [www.cermav.cnrs.fr/databank/lectine](http://www.cermav.cnrs.fr/databank/lectine), foram isoladas a partir de sementes de leguminosas (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002). No entanto, lectinas também foram encontradas em outras partes da planta, e sua presença abundante sugere que essas proteínas possuem funções importantes. Uma possível função fisiológica que tem sido discutida é o papel de defesa, através da ligação com carboidratos, contra microrganismos, insetos fitófagos e animais herbívoros (HARPER *et al.*, 1995; GATEHOUSE *et al.*, 1995). Além disso, foi reportada propriedade citotóxica, fungitóxica, inseticida e nematicida *in vitro* e *in vivo*, bem como toxicidade a animais superiores (OLIVEIRA *et al.*, 1994; PEUMANS e VAN DAMME, 1995; OKA *et al.*, 1997; RIPOLL *et al.*, 2003; VASCONCELLOS e OLIVEIRA, 2004).

O modo de ação da atividade inseticida de lectinas ainda não foi completamente elucidado (HAMSHOU *et al.*, 2009). Sabe-se que essas proteínas se ligam à membrana peritrófica e/ou estruturas quitinosas na região do intestino médio dos insetos, dificultando o trânsito de moléculas e o mecanismo de reciclagem de enzimas entre os compartimentos endo e ectoperitróficos (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). As lectinas por se ligarem a enzimas e outras proteínas glicosiladas, causam a inibição da absorção de nutrientes e/ou ruptura das células intestinais

(Macedo *et al.*, 2007; MACEDO *et al.*, 2010). Várias lectinas de plantas têm mostrado efeitos entomotóxicos quando ingeridas por insetos da ordem Coleoptera, Homoptera e Lepidoptera (CZAPLA e LANG, 1990; GATEHOUSE *et al.*, 1991; HABIBI *et al.*, 1998; ZHU-SALZMAN *et al.*, 1998; GATEHOUSE *et al.*, 1999)

Na área das ciências médicas, as lectinas têm aplicações não menos importantes, como o uso em processos diagnósticos, estudos de funções do sistema imune, como indução da proliferação de linfócitos e produção de interferon/citocina, asma e inflamação (VAN DRIESSCHE *et al.*, 1996).

Algumas lectinas são bastante tóxicas para mamíferos, pois não são digeridas na passagem pelo intestino e provocam uma variedade de efeitos sistêmicos. Dentre essas, estão as lectinas de feijão comum *Phaseolus vulgaris*, de soja *Glycine max*, de trigo *Triticum vulgaris* e concavalina A, a lectina presente no feijão-de-porco *Canavalia ensiformis* (PUSZTAI *et al.*, 1993; BARDOCZ *et al.*, 1995; UDEDIBIE e CARLINI, 1998; KORDAS *et al.*, 2000).

Apesar da grande oferta de lectinas na natureza e o grande potencial inseticida dessa proteína, sua aplicabilidade ainda é limitada devido aos efeitos adversos provocados em mamíferos e animais não alvos (VASCONCELOS e OLIVEIRA, 2004). No entanto é interessante o estudo aprofundado dessa proteína a fim de que se descubram maneiras de minimizar seus efeitos indesejáveis.

#### **4. Proteínas Inativadoras de Ribossomos (RIPs)**

As proteínas inativadoras de ribossomos impedem a síntese proteica, através da inativação da subunidade 60S do ribossomo (BARBIERI *et al.*, 1993). Os primeiros estudos envolvendo esse tipo de proteína datam de mais de um século, com *Ricinus communis* e *Abrus precatorius* (STILLMARK, 1888); as proteínas tóxicas encontradas nas sementes dessas espécies eram descritas como “hemaglutininas tóxicas”. Estudos mais recentes, detectaram a natureza precisa da atividade inibitória da síntese proteica, através do estudo aprofundado da abrina (OLSNES *et al.*, 1974) e da ricina (ENDO *et al.*, 1987), cuja compreensão da estrutura tridimensional possibilitou compreender melhor o mecanismo da inativação do ribossomo e conseqüentemente a inibição da síntese proteica em células eucarióticas (MONTFORT *et al.*, 1987).

Em razão da heterogeneidade desse tipo de proteínas, foi necessário estabelecer uma classificação para as RIPs. Estas são comumente divididas em três grupos, RIPs I, II e III, com base nas suas propriedades físicas e estruturais (STIRPE e BATTELLI, 2006).

As RIPs do tipo I, possuem apenas uma cadeia polipeptídica de aproximadamente 30 kDa (GIRBES *et al.*, 2004). No entanto, recentemente foram isoladas RIPs do tipo I a partir de espécies da família Curcumbitaceae, com menor peso molecular, entre 7 – 11 kDa, aproximadamente (JOLMA *et al.*, 2010). Esse grupo apresenta atividade específica RNA *N*-glicosilase. Inibe a síntese proteica eficientemente *in vitro*, porém tem baixo efeito tóxico *in vivo* (REYS, 2011). A saporina extraída de *Saponaria officinalis* (BAGGA *et al.*, 2003), a PAP extraída de *Phytolacca americana*, que possui atividade antiviral (LIN *et al.*, 1991), a trichossanthina ( $\alpha$ -TCS), extraída de *Trichosanthes kirilowii*, com atividade anti-HIV (CHOW *et al.*, 1990), são as RIPs do tipo I, mais conhecidas.

As RIPs do tipo II são formadas por duas cadeias polipeptídicas (cadeia A e cadeia B), de aproximadamente 30 kDa cada uma. As cadeias A e B possuem estruturas e funções diferentes. A cadeia A é semelhante a uma RIP do tipo I, com atividade específica RNA *N*-glicosilase, que é ligada a cadeia B, através de pontes dissulfeto (STIRPE *et al.*, 1992). A cadeia B possui as propriedades de uma lectina, com afinidade por açúcares, geralmente D-galactose. Essa porção pode se ligar a glicoproteínas ou glicolípídeos de membrana, permitindo a entrada da toxina no meio intracelular (BARBIERI *et al.*, 1993). Uma vez dentro da célula, essa proteína danifica a subunidade 60S do ribossomo, impedindo a síntese proteica levando a morte celular. Essa estratégia garante às RIPs do tipo II uma maior toxicidade em relação às demais (BEAUMELLE, 1993). Nesse grupo encontram-se a ricina e a abrina, bem como outras proteínas conhecidas, isoladas posteriormente, como a modicina (OLSNES *et al.*, 1978), a viscumina, a volkensina (STIRPE *et al.*, 1980) e a cinnamomina (LING *et al.*, 1995).

As RIPs do tipo III são moléculas inicialmente inativas, que precisam sofrer proteólise para eliminação do peptídeo ativo interno, um exemplo desse tipo de molécula é a proteína RIP b-32, isolada a partir de sementes de milho (BASS *et al.*, 1992). A RIP do tipo III também pode ser apresentar na forma de uma quimerotoxina, que consiste em uma RIP do tipo I, associada a uma segunda cadeia

polipeptídica, ainda de função desconhecida, um exemplo é a JIP60, isolada a partir de cevada (WALSH *et al.*, 1991).

## 5. Inibidores de $\alpha$ - Amilase

As enzimas  $\alpha$ -1,4-glucan-4-gucanohidrolases ou simplesmente  $\alpha$ -amilases são uma classe de enzimas hidrolíticas que catalisam a clivagem inicial de ligações  $\alpha$ -1,4 em polímeros de açúcar, como amido e glicogênio, em oligossacarídeos curtos (ISHIMOTO e KITAMURA, 1989). Essa clivagem é necessária para que os polímeros de açúcar sejam transformados em unidade menores passíveis de serem assimiladas pelos organismos. Essas enzimas estão presentes tanto em plantas, como em microrganismos e animais, sendo uma das mais importantes enzimas digestivas em um grande número de insetos que se alimentam exclusivamente de sementes durante a fase larval ou na vida adulta (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Inibidores de  $\alpha$ -amilase são bastante encontrados em plantas, principalmente em cereais e legumes. Têm sido reportadas com bastante frequência em espécies do gênero *Phaseolus* e têm mostrado efeito tóxico em vários insetos praga (ISHIMOTO e KITAMURA, 1989; GROSSI-DE-SÁ *et al.*, 1997; SUZUKI e ISHIMOTO, 1999; KLUH *et al.*, 2005). Quando a  $\alpha$ -amilase é inibida, a nutrição do inseto é prejudicada, devido a não assimilação de carboidrato, provocando déficit de energia para os processos vitais e supressão do crescimento larval (PUEYO *et al.*, 1995; ISHIMOTO e CHRISPELS, 1996; CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Plantas transgênicas envolvendo inibidores de  $\alpha$ -amilase também têm sido propostas como uma alternativa para o desenvolvimento de plantas resistentes a praga. Por exemplo, ervilha transgênica expressando o inibidor de  $\alpha$ -amilase  $\alpha$ -AI-1 apresentou resistência contra os bruquídeos, *Bruchus pisorum* e *Calosobruchus maculatus*; e feijão azuki apresentando o mesmo inibidor transgênico mostrou-se resistente a *C. chinensis* (SCHROEDER *et al.*, 1995; ISHIMOTO *et al.*, 1996; MORTON *et al.*, 2000).

## 6. Arcelinas

As arcelinas estão profundamente relacionadas com a família de lectinas de feijão e de inibidores de  $\alpha$ -amilase, de acordo com a comparação entre a sequência de aminoácidos (CHRISPEELS e RAIKHEL, 1991). Apesar dessa similaridade estrutural, as propriedades bioquímicas, padrões de glicosilação, estrutura quaternária e especificidade de ligação a açúcares são distintas (FABRE *et al.*, 1998; MOUREY *et al.*, 1998).

O mecanismo de ação tóxico da arcelina ainda não é muito bem compreendido. Entretanto é sabido que as arcelinas podem ter efeito tóxico (OSBORN *et al.*, 1988) ou apenas antinutricional, induzindo a estagnação no desenvolvimento larval (MINNEY *et al.*, 1990). Uma hipótese sobre o mecanismo de toxicidade da arcelina, é que ela causa o rompimento das células epiteliais do intestino de insetos (PAES *et al.*, 2000), levando-o a morte. Enquanto outros autores sugerem que o efeito tóxico é devido à glicosilação do intestino (FABRE *et al.*, 1998; MOUREY *et al.*, 1998) ou por fornecer ao inseto uma fonte de proteína pouco digestiva (MINNEY *et al.*, 1990; JANARTHANAN *et al.*, 2008).

Arcelinas têm efeito inseticida conhecido contra bruquídeos, seu efeito tóxico é bastante conhecido em *Zabrotes subfasciatus*, uma das pragas mais importantes de feijão armazenado, inibindo o desenvolvimento larval desse inseto (OSBORN *et al.*, 1988; CARDONA *et al.*, 1990). São encontradas em feijão comum nativo (OSBORN *et al.*, 1986). A presença dessa proteína de reserva tem sido correlacionada com o baixo conteúdo de faseolina, outra proteína de reserva encontrada em sementes de feijão; quanto menor a concentração de faseolina, mais provável a presença de altos níveis de arcelinas (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002).

## 7. Canatoxinas

A canatoxina é uma proteína encontrada em sementes de *C. ensiformes* (feijão-de-porco). Esta espécie é conhecida por ser livre de ataques de pragas e doenças (KAY, 1979). Essa proteína consiste em um dímero ligado não-covalentemente de uma cadeia polipeptídica de 95 kDa que representa cerca de 0,5% do peso seco da semente de feijão-de-porco (CARLINI e GUIMARÃES, 1981).



As canatoxinas apresentam muitas similaridades com a urease (FOLLMER *et al.*, 2001). A comparação de partes da sequência interna de peptídeos tem mostrado grande homologia com essa enzima (EC 3.5.1.5) (DIXON *et al.*, 1976). Além disso, análise de clones de cDNA de tecidos de *C. ensiformes* apresenta alta similaridade com pelo menos três genes homólogos de urease, com cerca de 85% de identidade de nucleotídeos (FREITAS-SILVA *et al.*, 2000). Estudos indicam que a canatoxina é uma forma variante da urease, porém com propriedades biológicas, características estruturais ou de domínios, distintas (CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2000).

O papel da canatoxina em *C. ensiformes* ainda está sendo investigado, porém sabe-se que está relacionado à defesa da planta. A fim de testar esta hipótese, alguns insetos foram submetidos à dieta contendo canatoxina e esta se mostrou letal a *C. maculatus* (Coleoptera) e *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) enquanto os hemípteros *Nezara viridula* e *Dysdercus peruvianus* foram altamente suscetíveis (CARLINI *et al.*, 1997).

O efeito entomotóxico da canatoxina se deve a peptídeos contidos no interior da proteína, estes precisam sofrer ativação proteolítica pelas enzimas digestivas do inseto. As catepsinas B e D estão envolvidas nesse processamento da canatoxina que liberam um ou mais peptídeos entomotóxicos (FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2000).

Esse mecanismo de ação inseticida é semelhante ao efeito entomotóxico da bactéria *Bacillus thuringiensis*, cuja proteína inseticida é inicialmente uma protoxina que necessita ser processada pelas enzimas do intestino médio dos insetos para se tornarem ativas (HAIDER *et al.*, 1996).

Devido ao grande potencial bioinseticida dessa proteína, há a necessidade de estudos mais aprofundados para se compreender melhor o seu mecanismo de ação, podendo-se assim utilizar com segurança esse recurso na biotecnologia de plantas

## **8. Inibidores de Proteinases**

Os inibidores de proteinases são proteínas ou peptídeos encontrados em vários tecidos da planta, porém com maior frequência em sementes e órgãos de

reserva em uma grande variedade de plantas (RICHARDSON, 1991), sendo particularmente abundantes em espécies da família Leguminosae.

Essas proteínas são importantes metabólitos primários, capazes de interagir com enzimas proteolíticas de maneira específica e reversível, inibindo a clivagem de ligações peptídicas entre proteínas, através da competição pelo sítio ativo da enzima (BODE e HUBER, 2000; LINGARAJU e GOWDA, 2008). São moléculas altamente estáveis à variação de temperatura e pH, e bastante resistentes a proteólise por proteinases. Tal estabilidade pode ser atribuída à presença de pontes dissulfeto e outras ligações não covalentes (BIRK, 2003).

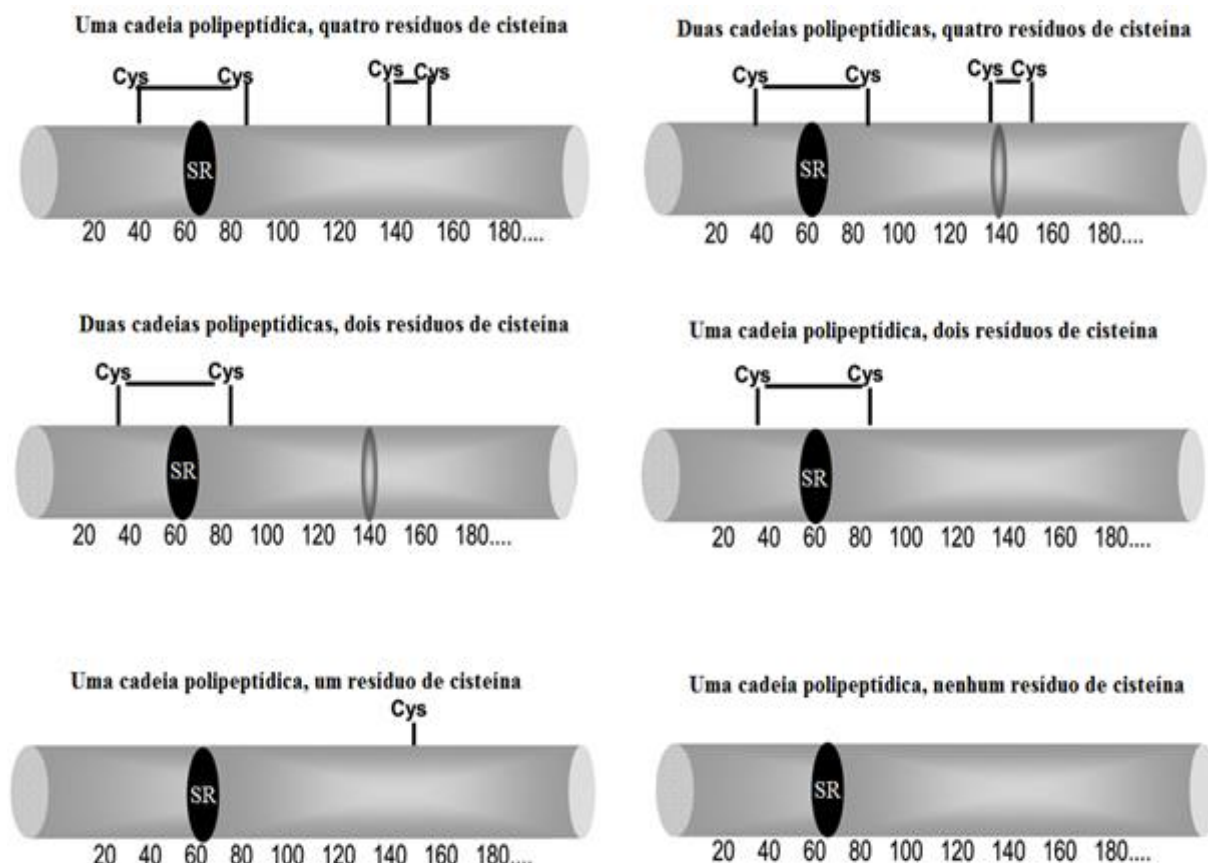
O papel fisiológico dos IPs na planta tem sido relacionado ao mecanismo de defesa contra insetos e patógenos, porém atuam como fonte de aminoácidos sulfurados na regulação de proteinases endógenas, como molécula de sinalização em resposta às condições ambientais e tem participação em muitos processos no desenvolvimento da planta, como na programação de morte celular (SOLOMON *et al.*, 1999; BHATTACHARYYA *et al.*, 2006; RAMESHWARAM & NADIMPALLI, 2008; KONAREV *et al.*, 2008). Da mesma forma que outras proteínas de defesa mencionadas anteriormente, os inibidores de proteinases podem ser sintetizados constitutivamente na planta ou induzidos em resposta a fatores externos, como ataque de insetos ou patógenos (RYAN, 1990; RYAN e PEARCE, 1998).

As enzimas proteolíticas são classificadas de acordo com o seu mecanismo de catálise e grupo reativo presente no centro ativo, dessa forma são classificadas em serinoproteinases, com uma serina e uma histidina; cisteíno-proteinases, com uma cisteína; asparticoproteinases com um grupo aspartato e metaloproteinases com um íon metálico  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$  (NEURATH, 1984; RICHARDSON, 1991; TREMACOLDI e PASCHOLATI, 2004). Inibidores de serinoproteinases e cisteíno-proteinases frequentemente mostram efeitos deletérios quando ingeridos por insetos das ordens Lepidoptera e Coleoptera, os quais incluem redução da fecundidade, redução de peso, aumento da mortalidade e deformações morfológicas (KURODA *et al.*, 1996; GRUDEN *et al.* 1997, ELDEN, 2000).

Os inibidores em plantas estão divididos famílias, tais como Kunitz, Bowman-Birk, Batata I, Batata II, Abóbora, Superfamília cereal, Ragi 1-2 e Taumatina-proteínas relacionadas à patogênese. A classificação dessas famílias está ligada a homologia na estrutura primária, massa molecular, conteúdo e localização das

cisteínas, posição do sítio reativo e especificidade inibitória (Birk, 2003). As duas famílias mais comuns e melhores caracterizadas são Bowman-Birk e Kunitz que atuam sobre as proteinases serínicas e são de ocorrência frequente em várias espécies de plantas e em diferentes tecidos, principalmente em Mimosoideae, Cesalpinioideae e Papilionoideae, subfamílias de Leguminosae (MACEDO *et al.*, 2002).

Os inibidores de proteinases do tipo Kunitz compreendem proteínas vegetais com atividade inibitória sobre várias enzimas proteolíticas, principalmente tripsina e quimiotripsina. São encontrados largamente em Leguminosae e já foram reportados em outras famílias como Solanaceae, Sapindaceae e Gramineae (MOSOLOV e VALUEVA, 2005, MACEDO *et al.*, 2010). Proteinases serínicas, cisteínicas e aspárticas são comumente inibidas por essa família de inibidores, entretanto a inibição de metaloproteinases não tem sido reportada (KOIDE *et al.*, 1973; LEHLE *et al.*, 1994; ZHOU *et al.*, 2008). Oliva *et al.* (2011) elaboraram uma recente revisão a respeito de inibidores da família Kunitz, onde é possível verificar que essa família possui um padrão estrutural com uma única cadeia polipeptídica ou duas cadeias somando cerca de 20 kDa, apresentando comumente duas pontes dissulfeto e um único sítio reativo. A maioria possui quatro resíduos conservados de cisteína (Cys) formando duas pontes dissulfeto, porém alguns mostram uma variação entre um, dois ou mesmo nenhum resíduo Cys em sua estrutura.



**Figura 1.** Esquema da estrutura primária de inibidores do tipo Kunitz de plantas, baseado no número de pontes dissulfeto. SR: Sítio reativo; Cys: resíduo de cisteína. Adaptado de Oliva *et al.*, 2010.

Os inibidores pertencentes à família Bowman-Birk são polipeptídeos pequenos, com cerca de 8-10 kDa, encontrado tipicamente em Leguminosae, mas também reportados em Gramineae, Compositae e Aliaceae (RICHARDSON, 1991; MOSOLOV e VALUEVA, 2005). Esse tipo de proteína apresenta geralmente sete pontes dissulfeto, 14 resíduos de cisteína e dois sítios reativos, com capacidade de inibir simultaneamente e independentemente duas moléculas de proteinase, sendo que um domínio tem atividade inibitória sobre proteinase do tipo tripsina e o outro com capacidade inibitória sobre tripsina, quimotripsina ou elastase, localizados em extremos opostos da molécula (BODE e HUBER, 1992; GARIANI e LEATHERBARROW, 1997; CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002). Em monocotiledôneas esses inibidores apresentam uma variação quanto ao peso molecular, podendo chegar a 20 kDa, e a quantidade de resíduos de cisteína, podendo chegar a 26 resíduos em uma mesma molécula.

Os inibidores de proteinases do tipo Bowman-Birk a princípio, eram conhecidos apenas em sementes (HAMMOND *et al.*, 1984), porém estudos posteriores em milho, alfafa e arroz mostraram que esses inibidores eram expressos em outras partes da planta, como raiz, caule e folha, quando estes órgãos eram submetidos à injúrias (ROHRMEIER e LEHLE, 1993; MCGURL *et al.*, 1995; RAKWAL *et al.*, 2001).

Inibidores de proteinases não são considerados diretamente tóxicos para herbívoros, porém são antinutricionais, pois diminuem a eficiência digestiva em insetos, provocando danos ao seu desenvolvimento e fisiologia (MACEDO *et al.*, 2010).

Genes de inibidores de plantas são particularmente promissores. Nos últimos anos, genes codificando diferentes inibidores de proteinases têm sido incorporados no genoma de plantas economicamente importantes, como cereais, tabaco, soja e batata a fim de se obter proteção contra insetos-praga e fitonematóides (LEPLE *et al.*, 1995; URWIN *et al.*, 1995; KOIWA *et al.*, 1997; SCHULER *et al.*, 1998; USSUF *et al.*, 2001; VOLPICELLA *et al.*, 2003).

## **9. Proteases do Intestino de Insetos Lepidópteros**

As proteases, encontradas geralmente na região do intestino médio do trato digestivo dos insetos, têm a função de catalisar a hidrólise de moléculas de proteínas ingeridas através da dieta em subunidades menores, os aminoácidos.

As proteases são subdivididas em endopeptidases (proteinases) e exopeptidases, as quais diferem quanto ao local de clivagem na molécula de proteína. As endopeptidases atuam nas regiões internas da cadeia polipeptídica, enquanto as exopeptidases hidrolisam aminoácidos na extremidade C ou N terminal da cadeia (JONGSMA e BOLTER, 1997).

Como já mencionado anteriormente, essas enzimas são classificadas de acordo com o seu mecanismo de catálise e aminoácido presente no sítio ativo, que podem ser serinoproteinases, cisteínoproteinases, asparticoproteinases e metaloproteinases (NEURATH, 1984; RICHARDSON, 1991; TREMACOLDI e PASCHOLATI, 2004).

Diferentes insetos dependem de diversas classes de proteinases para sua digestão, dependendo do pH do intestino (TERRA e FERREIRA, 1994). Os lepidópteros são conhecidos por terem pH intestinal com níveis variando de 8 a 11 e desse modo empregam principalmente serino endopeptidases para a digestão. Durante muito tempo, acreditava-se encontrar apenas serinoproteinases (tripsina e quimotripsina) e aspartatoproteinase (pepsina) responsáveis pela digestão de proteínas em insetos (MCFARLANE, 1985). Atualmente sabe-se que algumas ordens de insetos usualmente sequer usam serinoproteinases para digerir proteínas, como Diptera, Homoptera e Hemiptera (WOLFSON e MURDOCK, 1990; CHRISTELLER *et al.*, 1992; CARLINI e GROSSI-DE-SÁ, 2002).

Em larvas de Lepidópteros, o complexo de enzimas digestivas no intestino médio com função de digerir proteínas, incluem tripsinas, quimotripsinas, elastases, catepsinas B, aminopeptidase e carboxipeptidase. As serinoproteinases são conhecidas por dominar a digestão de proteínas e contribuir com cerca de 95% do total da atividade digestiva de proteínas nesses insetos (GATEHOUSE *et al.*, 1997). Apesar desse complexo de proteases digestivas, usualmente encontram-se diversas isoformas dessas proteases, por exemplo, em *Helicoverpa armigera* é possível encontrar cerca de 20 tipos de isoformas de serinoproteinases ativas no intestino (BOWN *et al.*, 1997; PATANKAR *et al.*, 2001).

## **10. Adaptação dos insetos aos Inibidores de Proteinases**

Assim como as plantas tentam garantir a continuidade da espécie através de mecanismos de defesa contra a predação, os insetos por sua vez têm buscado maneiras para se adaptarem aos inibidores de proteinases, desenvolvendo um elaborado mecanismo de resposta geralmente bastante eficiente.

Dentro desse mecanismo de resposta, o inseto promove, por exemplo, a síntese de uma grande diversidade de isoformas de enzimas digestivas. Essas isoformas a primeira vista podem parecer desnecessárias, já que apenas algumas enzimas contribuem de forma significativa para a digestão. Entretanto acredita-se que são elas que promovem vantagens evolutivas, garantindo a sobrevivência da espécie ao proporcionar ao inseto a capacidade de lidar com a ampla gama de proteínas de diversas plantas, incluindo as tóxicas. Algumas larvas possuem essa

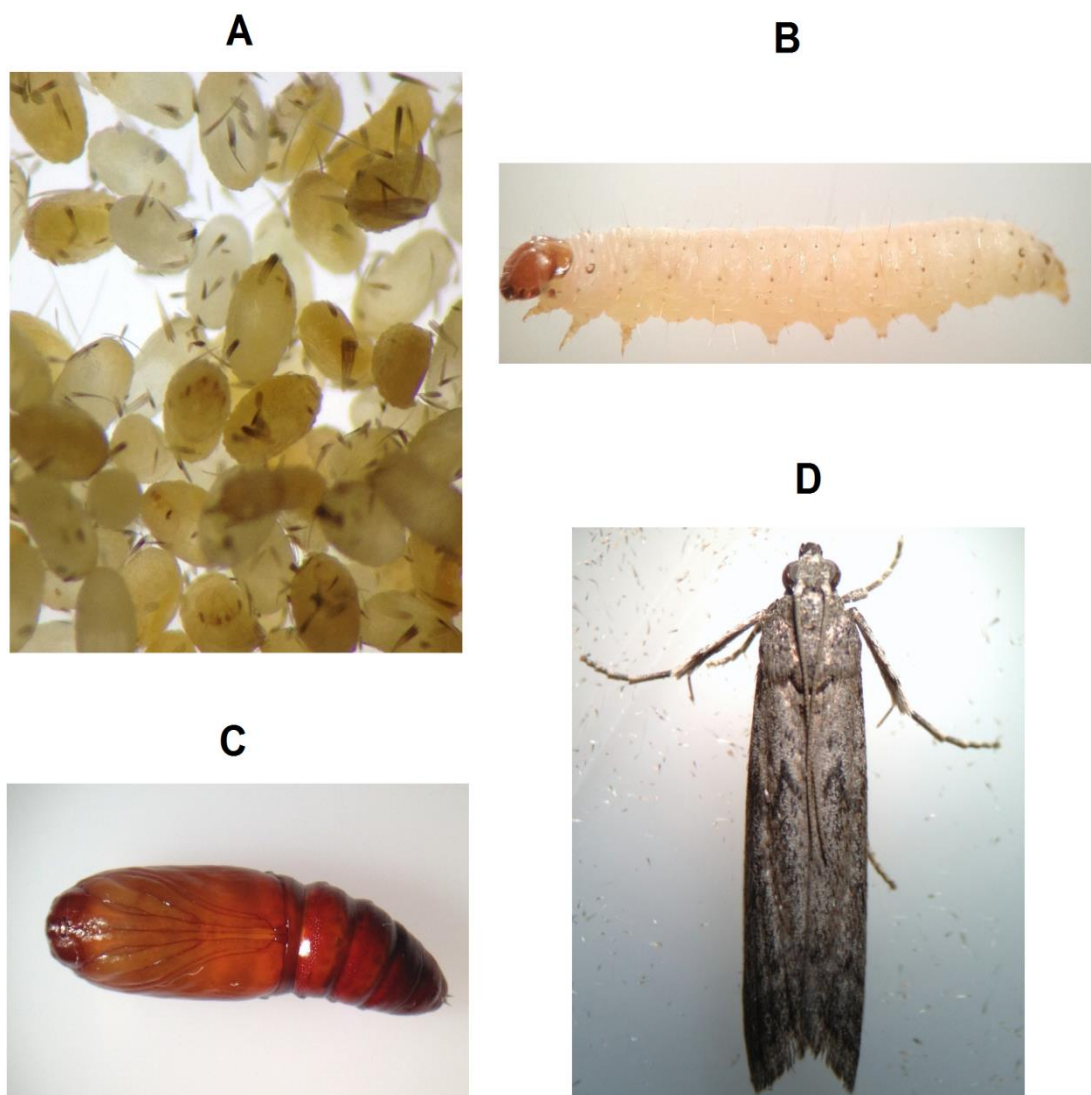
invejável capacidade de alterar o seu *pool* de proteases complementares em resposta a qualidade da dieta (JONGSMA *et al.*, 1995; SRINIVASAN *et al.*, 2006).

Além dessa diversidade de enzimas, que têm um papel fundamental na adaptação, outra estratégia utilizada pelos insetos em resposta a inibidores de proteinases é superprodução das proteinases que estão sendo inibidas (BROADWAY, 1997; GATEHOUSE *et al.*, 1997) ou pela inativação proteolítica da proteína tóxica através das proteinases presentes no intestino médio dos insetos (GIRI *et al.*, 1998; MAZUNDAR-LEIGHTON e BROADWAY, 2001). Esse último caso não têm funcionado muito bem contra inibidores de proteinases, já que são proteínas altamente estáveis e de difícil degradação por enzimas proteolíticas.

O mecanismo molecular da resposta adaptativa de insetos a inibidores de proteinases de plantas ainda deixa muitas dúvidas e entender melhor as vias de respostas do inseto é fundamental para que se possa utilizar os inibidores de proteinases na engenharia de plantas transgênicas resistentes a insetos-praga.

#### **11. *Anagasta kuehniella* (Zeller)**

*Anagasta kuehniella* é um inseto da ordem Lepidoptera (Pyralidae), conhecida como traça da farinha. Atacam inúmeros produtos armazenados, como trigo, milho, arroz, amendoim, farinhas, fubás e outros produtos, deixando-os, na maioria, imprestáveis para o consumo (GALLO *et al.*, 2002). Os adultos são mariposas de coloração parda, com aproximadamente 20 mm de envergadura. As lagartas possuem coloração esbranquiçada com cabeça e apêndices castanhos, quando completamente desenvolvidas atingem até 15 mm de comprimento. Uma fêmea põe usualmente, entre 200 e 300 ovos, porém dependendo das condições de temperatura e umidade, podem chegar a 600 ovos. As lagartas tecem um casulo, dentro dos quais se transformam em pupas. O ciclo completo é de aproximadamente 60 dias (COELHO *et al.*, 2007).



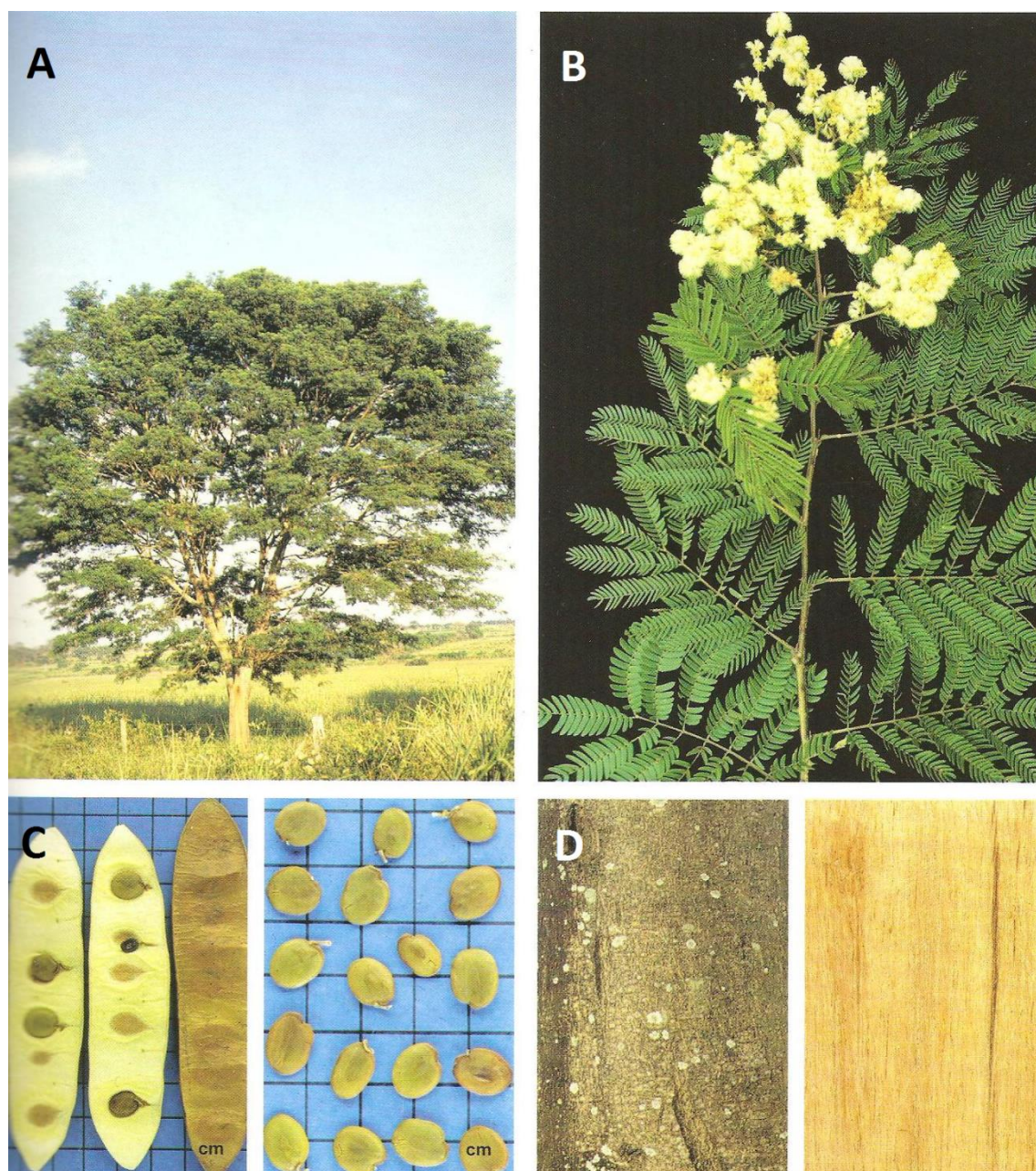
**Figura 2.** *Anagasta kuehniella*. (A) Ovos; (B) larva; (C) pupa; (D) inseto adulto.

## **12. *Acacia polyphylla* DC.**

*Acacia polyphylla* DC., popularmente conhecida como monjoleiro, é uma espécie arbórea de médio porte (15 a 20 m de altura), pertencente à família Fabaceae (Mimosoideae), e que ocorre naturalmente desde a região amazônica até o Paraná, em florestas latifoliada semidecídua. É particularmente frequente nos estados do Mato Grosso do Sul, São Paulo e Paraná. A árvore possui copa frondosa, proporcionando boa sombra, além de ser ornamental quando em flor. É utilizada em arborização urbana e rural. Sua madeira é apropriada para marcenaria,



torno e obras internas, e a casca serve para curtir o couro. É uma espécie rústica e recomendada para recuperação de áreas de preservação permanente. Esta espécie floresce durante os meses de dezembro a março. A maturação dos frutos ocorre no período de agosto a setembro com a planta praticamente despida de sua folhagem (LORENZI, 2002).



**Figura 3.** Espécie *Acacia polyphylla* DC. (A) árvore; (B) Flores; (C) fruto e semente; (D) madeira. Fonte: Lorenzi (2002).

## II - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAGGA, S.; SETH, D.; BATRA, K. The citotoxic activity of ribosome inactivating-proteins saporin-6 attributed to its rRNA N-glicosidase and internucleosomal DNA fragmentation activities. *The Journal Biological Chemistry*, v. 278, p. 4813-4820. 2003.

BARBIERI, L.; BATELLI, M. G.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins from plants. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1154, p. 237-282. 1993.

BARDOCZ, S.; GRANT, G.; EWER, S. W.; DUGRID, T. J., BROWN, D. S.; ENGLYST, K.; PUSZTAI, A. Reversible effect of phytohemagglutinin on the growth and metabolism of rat gastrointestinal tract. *Gut*, v. 37, p. 353-360. 1995.

BASS, H. W.; WEBSTER, C.; OBRIAN, G. R.; ROBERTS, J. K. M.; BOSTON, R. S. A maize ribosome inactivating-protein is controlled by transcriptional activator opaque-2. *The Plant Cell*, v. 4, p. 225-234. 1992.

BEAUMELLE, B.; ALAMI, M.; HOPKINS, C. R. ATP-dependent translocation of ricin across the membrane of purified endosomes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, p. 23661-23669. 1993.

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

BIRK, Y. Plant protease inhibitor: significance in nutrition, plant protection, cancer prevention and genetic engineering. New York: Springer, p. 170, 2003.

BODE, W.; HUBER, R. Structural basis of the endoproteinase protein inhibitor interaction. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1477, p. 241-252. 2000.

BOWLES, D. J. Defense-related proteins in high plants. *Annual Review of Biochemistry*, v. 59, p. 873-907. 1990.

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

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

BOYD, W. C.; REGUERA, R. M. Studies on haemagglutinins present in seeds of some representatives of the family Leguminosae. The Journal of Immunology, v. 62, p. 333-339. 1949.

CARDONA, C.; KORNEGAY, J.; POSSO, C. E.; MORALES, F.; RAMIREZ, H. Comparative value of four arcelin variants in the development of dry bean lines resistant to the Mexican bean weevil. Entomology Experience Applied, v. 56, p. 197-206. 1990.

CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. Toxicon, v. 40, p. 1515-153. 2002

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. Toxicon, v. 19, p. 667-676. 1981.

CARLINI, C. R.; OLIVEIRA, A. E. A.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J.; WELLS, M. A. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. Journal of Economic Entomology, v. 90, p. 340-348. 1997.

CARLINI, C. R.; OLIVEIRA, A. E.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J.; WELLS, M. A. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. Journal of Economic Entomology, v. 90, p. 340-348. 1997.

CENTRE DE RECHERCHES SUR LES MACROMOLÉCULES VÉGÉTALES (CERMAV). France, 1966. Disponível em: <[www.cermav.cnrs.fr/databank/lectine](http://www.cermav.cnrs.fr/databank/lectine)>. Acesso em: 10 jan. 2013

CHOW, T. P.; FELDMAN, R. A.; LOVETT, M.; PIATAK, M. Isolation and DNA-sequence of a gene encoding Alpha-Trichosanthin, a type-I ribosome inactivation-protein. The Journal of Biological Chemistry, v. 265, p. 8670-8674. 1990.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *The Plant Cell*, v. 3, p. 1-9. 1991.

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

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

COHEN, E. Chitin synthesis and degradation as targets for pesticide action. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 22, p. 245-261. 1993.

CZAPLA, T. H.; LANG, B. A. Effect of plant lectins on the larval development of European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) and southern corn rootworm (Coleoptera: Crysomelidae). *The Journal of Economic Entomology*, v. 83, p. 2480-2485. 1990.

DIXON, N.E.; GAZOLLA, C.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Metal ions in enzymes using ammonia or ammidates. *Science*, v.141, p. 1144-1150. 1976.

ELDEN, T. C. Influence of a cysteine proteinase inhibitor on alfalfa weevil (Coleoptera: Curculionidae) growth and development over successive generations. *Journal of Entomological Science*, v. 35, p. 70-76. 2000.

ENDO, Y.; TSURUGI, K. RNA N-glycosidase activity of ricin Achain. Mechanism of action of the toxic lectin ricin on eukaryotic ribosomes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 262, p. 8128-8130. 1987.

FABRE, C.; CAUSSE, H.; MOUREY, L.; KONINKW, J.; RIVIERE, M.; HENDRKS, H.; PUZO, G.; SAMAMA, J. P.; ROUGÉ, P. Characterization and sugar-binding properties of arcelin-1, an insecticidal lectin-like protein isolated from kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. RAZ-2) seeds. *Biochemical Journal*, v. 329, p. 551-560. 1998.

FERREIRA-DASILVA, C. T.; GOMBAROVITZ, M. E. C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C. M., CARLINI, C. R. Proteolytic activation of Canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, v. 44, p. 162-171. 2000.

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

FOLLMER, C.; BARCELLOS, G. B. S.; ZINGALI, R. B.; MACHADO, O. L. T.; ALVES, E. W.; BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J. A.; CARLINI, C. R. Canatoxin, a toxic protein of jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5). Biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochemistrical Journal*, v. 360, p. 217-224. 2001.

FREITAS-SILVA, M. A.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; CARLINI, C. R.; MORAIS, M. G. The Urease gene family from jackbean: gene expression and characterization of cDNA clones. *Proceedings of the VI International Symposium of Plant Molecular Biology*, Quebec, Canada. 2000.

GALLO, D.; NAKANO, O.; NETO, S. S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; FILHO, E. B.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIM, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. *Entomologia Agrícola*, Piracicaba, SP: FEALQ, 2002.

GARIANI, T.; LEATHERBARROW, R. J. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by preteases. *Journal of Peptide Research*, v. 49, p 467-475. 1997.

GATEHOUSE, A. M. R.; HOWE, D. S.; FLEMMING, J. E.; HILDER, V. A., GATEHOUSE, J. A. Biochemical basis of insect resistance in winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus* ) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 55, p. 63-74. 1991.

GATEHOUSE, A. M. R.; POWER, K. S.; VAN DAMME, E. J. M.; PEUMANS, W. J.; GATEHOUSE, J. A. Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant

protection. In: Lectins: Biomedical Perspectives, Ed. Pustzai, A., Bardocz, S. London: Taylor and Francis, p. 35-58, 1995.

GATEHOUSE, A. M.; DAVIDSON, G. M.; STEWART, J. N.; GATEHOUSE, L. N.; KUMAR, A.; GEOGHEGAN, I. E.; BIRCH, A. N. E.; GATEHOUSE, J. A. Concanavalin A inhibits development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) when expressed in transgenic potato plants. Molecular Breeding, v. 5, p. 153-165. 1999.

GATEHOUSE, L. N.; SHANNON, A. L.; BURGESS, E. P. J.; CHRISTELLER, J. T. Characterization of major midgut proteinase cDNAs from *Helicoverpa armigera* larvae and changes in gene expression in response to four proteinase inhibitors in the diet. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 27, p. 929- 944. 1997.

GIRBES, T.; FERRERAS, J. A.; ARIAS, F. J.; STIRPE, F. Description, distribution, activity and phylogenetic relationship of ribosome inactivating-proteins in plants, fungi and bacteria. Mini-reviews in Medical Chemistry, v. 4, p. 461-476. 2004.

GROSSI-DE-SÁ, M. F.; MIRKOV, T. E.; ISHIMOTO, M.; COLUCCI, G.; BATEMAN, K. S.; CHRISPEELS, M. J. Molecular characterization of a bean  $\alpha$ -amylase inhibitor that inhibits the  $\alpha$ -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. Planta, v. 203, p. 295-303. 1997.

GRUDEN, K.; STRUKELJ, B.; POPOVIC, T.; LENARCIC, B.; BEVEC, T.; BRZIN, J.; KREGAR, I.; HERZOG-VELIKONJA, J.; STIEKEMA, W. J., BOSH, D.; JONGSMA, M. A. The cysteine protease activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. Insect Biochemistry and Molecular Biology, v. 28, p. 549-560. 1998.

HABIBI, J.; BACKUS, E. A.; CZAPLA, T. H. Subcellular effects and localization of binding sites of phytohemagglutinin in the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Insecta: Homoptera: Cicadellidae). Cell Tissue Research, 294, P. 561-571. 1998.

HAIDER, M. Z.; KNOWLES, B. H.; ELLAR, D. J. Specificity of *Bacillus thuringiensis* var. *colmeri* insecticidal delta-endotoxin is determined by differential proteolytic



processing of the protoxin by larval gut proteases. European Journal of Biochemistry, v. 156, p. 531-540. 1986.

HAMMOND, R. W.; FOARD, D. E.; LARKINS, B. A. Molecular cloning and analysis of a gene coding for the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean. Journal of Biological Chemistry, v. 259, p. 9883-9890. 1984.

HARPER, S. M.; CRENSHAW, R. W.; MULLINS, M. A.; PRIVALLE, L. S. Lectin binding to insect brush border membranes. The Journal of Economic Entomology, v. 88, p. 1197-1202. 1995.

HILDER, V. A.; GATEHOUSE, A. M.; SHEERMAN, S. E.; BALER, F.; BOULTER, D. A novel mechanism for insect resistance engineered into tobacco. Nature, v. 330, p. 160-163. 1987.

ISHIMOTO, M.; CHRISPEELS, M. J. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of alpha-amylase inhibitor in the common bean. Plant Physiology, v. 111, p. 393-401. 1996.

ISHIMOTO, M.; KITAMURA, K. Growth inhibitory effects of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). Applied Entomology and Zoology, v. 24, p. 281-286. 1989.

ISHIMOTO, M.; SATO, T.; CHRISPEELS, M. J.; KITAMURA, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed  $\alpha$ -amylase inhibitor of common bean. Entomology. Experience Applied, v. 79, p. 309-315. 1996.

JANARTHANAN, S.; SURESH, P.; RADKE, G.; MORGAN, T.D.; OPPERT, B. Arcelins from an Indian Wild Pulse, *Lablab purpureus*, and insecticidal activity in Storage pests. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, p. 1676-1682. 2008.

JOLMA, A.; KIVIOJA, T.; TOIVONEN, J.; CHANG, L.; WEI, G.; ENGE, M.; TAIPALE, M.; VAQUERIZAS, J. M.; YAN, J.; SILLAMPAA, M. J.; BONKE, M.; PALIN, K.; TALUKDER, S.; HUGHES, T. R.; LUSCOMBE, M. N.; et al. Multiplexed massively parallel SELEX for characterization of human transcription factor binding specificities. Genome Research, v. 20, p. 861-873. 2010.

JONGSMA, M. A.; BAKKER, P. L.; PETERS, J.; BOSH, D.; STIEKEMA, W. J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. Proceedings of the National Academy of Science, v. 92, p. 8041-8045. 1995.

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

KAY, D. E. Crop and Product Digest No 3 – Food Legumes. London: Tropical Products Institute, p. 435, 1979.

KLUH, I.; HORN, M.; HÝBLOVÁ, J.; HUBERT, J.; DOLECKOVÁ-MARESOVÁ, L.; VOBURKA, ZDENEK.; KUDLIKOVA, I.; KOCOURED, F.; MARES, M. Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of  $\alpha$ -amilase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. Phytochemistry, v. 66, p. 31-39. 2005.

KOIDE, T.; TSUNAWASA, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors. 2. Amino-acid sequence around the reactive site of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). European Journal of Biochemistry, v. 32, p. 408-416. 1973.

KOIWA, H.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Regulation of proteinase inhibitors and plant defense. Trends in Plant Science, v. 2, p. 379-384. 1997.

KONAREV, A. V; LOVEGROVE, A; SHEWRY, P. R. Serine proteinase inhibitors in seeds of *Cycas siamenis* and other gymnosperms. Phytochemistry, v. 69, p. 2482-2489. 2008.

KORDAS, K.; BURGHARDT, B.; KISFALVI, K.; BARDOCZ, S.; PUSZTAI, A.; VARGA, G. Diverse effects of phytohaemagglutinin on gastrointestinal secretions in rats. The Journal of Physiology, v. 94, p. 31-36. 2000.

KURODA, M.; ISHIMOTO, M.; SUZUKI, K.; KONDO, H.; ABE, K.; KITAMURA, K.; ARAI, S. Oryzacystatins exhibit growth-inhibitory and lethal effects on different species of bean insect pests *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) and *Riptortus clavatus* (Hemiptera). Bioscience Biotechnology and Biochemistry, v. 60, p. 209-212. 1996.



LEHLE, K.; WRBA, A.; JAENICKE, R. *Erythrina caffra* trypsin inhibitor retains its native structure and function after reducing its disulfide bonds. *Journal of Molecular Biology*, v. 239, p. 276-284. 1994.

LEPLE, J. C.; BONADE-BOTINNO, M.; AUGUSTIN, S.; PILATE, G. C; TAN, V. D.; DELPLANQUE, A.; CORNU, D.; JOUANIN, L. 1995. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Crysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. *Molecular Breeding*, v. 1, p. 319-328. 1995.

LIN, Q.; CHEN, Z. C.; ANTONIL, J. F.; WHITE, R. F. Isolation and characterization cDNA clone encoding the antiviral protein from *Phytolacca americana*. *Plant Molecular Biology*, v. 17, p. 609-614. 1991.

LING, J.; LIU, W. Y.; WANG, T. P. Simultaneous existence of 2 types of ribosome inactivating-proteins in seeds from *Cinnamomus camphora* – characterization of the enzymatic-activities of these cytotoxic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta Structure and Molecular Enzymology*, v. 1252, p. 15-22. 1995.

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

MACEDO, M. L. R.; ANDRADE, L. B. S.; MORAES, R. A.; XAVIER-FILHO, J. Vicilin variants and the resistance of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds to the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, v. 105, p. 89-94. 1993.

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

MACEDO, M. L. R.; FILHO, E. B. S. D.; FREIRE, M. G. M.; OLIVA, M. L. V.; SUKIKAWA, J. T.; TOYAMA, M. H.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Sapindus saponaria* L. seeds: purification, characterization and activity towards pest insect digestive enzyme. *The Protein Journal*, v. 30, p. 9-19. 2011.

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

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

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

MCFARLANE, J. E. Nutrition and digestive organs. In: *Fundamentals of insect physiology*, ed. Blum, M. S. New York: Wiley and sons, 1985.

MCGURL, B.; MUKHERJEE, S.; KAHN, M.; RYAN, C. A. Characterization of two proteinase inhibitor (ATI) cDNAs from alfalfa leaves (*Medicago sativa* var. *vernema*): the expression of ATI genes in response to wounding and soil microorganisms. *Plant Molecular Biology*, v. 27, p. 995-1001. 1995.

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

MINNEY, B. H. P.; GATEHOUSE, A. M. R.; DOBIE, P.; DENDY, J.; CARDONA, C.; GATEHOUSE, J. A. Biochemical bases of seed resistance to *Zabrotes subfasciatus* (bean weevil) in *Phaseolus vulgaris* (common bean): a mechanism for arcelin toxicity. *The Journal Insect Physiology*, v. 36, p. 757-761. 1990.

MONTFORT, W.; VILLAFRANCA, J. E.; MONZINGO, A. F.; ERNST, S. R.; KATZIN, B.; RUTENBER, B.; XUONG, N. H.; HAMLIN, R.; ROBERTUS, D. The Three

dimensional structure of ricin at 2.8 Å. The Journal of Biological Chemistry, v. 282, p. 5398-5403. 1987.

MORTON, R. L.; SHROEDER, H. E.; BATERMAN, K. S.; CHRISPPEELS, M. J.; ARMSTRONG, E.; HIGGINS, T. J. V. Bean α-amylase inhibitor- I in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. Proceedings of the National Academy of Science, USA, v. 97, p. 3820-3825. 2000.

MOSOLOV, V. V.; VALUEVA, T. A. Proteinase Inhibitors and their function in plants: A Review. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 41, p. 227-246. 2005.

MOUREY, L.; PEDELACQ, J. D.; BIRCK, C.; FABRE, C.; ROUGE, P.; SAMAMA, J. P. Crystal structure of the arcelin-1 dimer from *Phaseolus vulgaris* at 1.9-Å resolution. The Journal of Biological Chemistry, v. 273, p. 12914-12922. 1998.

NEURATH, H. Evolution of proteolytic enzymes. Science, v. 224, p.350-357. 1984.

OERKE, E. C.; DEHNE, H. W.; SCHONBECK, F.; WEBER, A. Crop Production and Crop Protection: Estimated Losses in Major Food and Cash Crops. Amsterdam: Elsevier, Science B.V., 1994.

OKA, Y.; CHET, I.; SPIEGEL, Y. Accumulation of lectins in cereal roots invaded by the cereal cyst nematode *Heterodera avenae*. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 51, p. 333-345. 1997.

OLIVA, M. L. V.; FERREIRA, R. S.; FERREIRA, J. G.; PAULA, C. A. A.; SALAS, C. A.; SAMPAIO, M. U. Structural and Functional Properties of Kunitz Proteinase Inhibitors from Leguminosae: A Mini Review. Current Protein and Peptide Science, v. 12, p. 348-357. 2011.

OLIVA, M. L. V.; SILVA, M. C. C.; SALLAI, R. C.; BRITO, M. V.; SAMPAIO, M. U. A novel subclassification for kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. Biochimie, v. 92, p. 1667-1673, 2010.

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, p. 498-504. 2011.

OLIVEIRA, J. T. A.; VASCONCELLOS, I. M.; GONDIM, M. J. L.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; SANTOS, C. F.; MOREIRA, L. I. M. *Canavalia brasiliensis* seeds. Protein quality and nutritional implications of dietary lectin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 64, p. 417- 424. 1994.

OLSNES, S.; REFSNES, K.; PIHL, A. Mechanism of action of the toxic lectins abrin and ricin. *Nature*, v. 249, p. 627-631. 1974.

OLSNES, S.; SANDVIG, K.; EIKLID, K.; PIHL, A. Properties and action mechanism of a toxic lectin modeccin: interaction to cells lines resistant to modeccin, abrin and ricin. *Supramolecular Structure*, v. 9, p. 15-25. 1978.

OSBORN, T. C.; ALEXANDER, D. C.; SUN, S. S. M.; CARDONA, C.; BLISS, F. A. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science*, v. 240, p. 207-210. 1988.

PAES, N. S.; GERHARDT, I. R.; COUTINHO, M. V.; YOKOYAMA, M.; SANTANA, E.; HARRIS, N.; CHRISPEELS, M. J.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. The effect of arcelin-1 on the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. *The Journal of Insect Physiology*, v. 46, p. 393-402. 2000.

PATANKAR, A. G.; GIRI, A. P.; HARSUKAR, 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, p. 453-464. 2001.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. Lectin as plant defense proteins. *Plant Physiology*, v. 109, p. 347-352. 1995.

PUEYO, J. J.; MORGAN, T. D.; AMEENUDDIN, N.; LIANG, C.; REECK, G. R.; CHRISPEELS, M. J.; KRAMER, K. J. Effects of bean and wheat alpha-amylase inhibitors on alpha-amylase activity and growth of stored-product insect pests. *Entomology Experience Applied*, v. 75, p. 237-244. 1995.

PUSZTAI, A.; EWEN, S. W.; GRANT, G.; BROWN, D. S., STEWART, J. C.; PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J., BARDOCZ, S. Antinutritive effects of wheat-germ agglutinin and other N-acetylglucosamine- specific lectins. *British Journal of Nutrition*, v. 70, p. 313-321. 1993.

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

RAMESHWARAM, N. R; NADIMPALLI, S. K. An efficient method for the purification and quantification of a galactose-specific lectin from vegetative tissues of *Dolichos lablab*. *Journal of Chromatography B*, v. 861, p. 209-217. 2008.

READ, J. W.; HAAS, L. W. The baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. V. Further studies concerning potassium bromate and enzyme activity. *Cereal Chemistry*, v. 15, p. 59-68. 1938.

REYES, L. F. Proteínas Inativadoras de Ribossomos: identificação de novas proteínas e estudos de interação da cadeia A de pulchellina (PAC) com monocamada de Langmuir. 2011. 144p. Tese (Doutorado em Física) – Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: *Methods in Plant Biochemistry, Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids*, Ed. ROGERS, J. L. New York: Academic Press, p. 259-305, 1991.

RIPOLL, C.; FAVERY, B.; LECOMTE, P.; VAN DAMME, E.; PEUMANS, W. J.; ABAD, P.; JOUANIN, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. *Plant Science*, v. 164, p. 517-523. 2003.

ROHRMEIER, T.; LEHLE, L. WIP1, a wound-inducible gene from maize with homology Bowman-birk proteinase inhibitors. *Plant Molecular Biology*, v. 22, p. 783-792. 1993.

RYAN, C. A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, v. 28, p. 425–449. 1990.

RYAN, C. A., PEARCE, G. Systemin: A polypeptide signal for plant defensive genes. *Annual Review of Cell and Development Biology*, v. 14, p. 1-17. 1998.

SCHROEDER, H. E.; GOLLASH, S.; MOORE, A.; TABE, L. M.; CRAIG, S.; HARDIE, D.; CHRISPEELS, M. J.; SPENCER, D.; HIGGINS, T. J. V. Bean  $\alpha$ -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil, *Bruchus pisorum*, in genetically engineered peas (*Pisum sativum* L.). *Plant Physiology*, v. 107, p. 1233-1239. 1995.

SCHULER, T. H.; POPPY, G. M.; KERRY, B. R.; DENHOLM, I. Insect resistant transgenic plants. *Trends in Biotechnology*, v. 16, p. 168-175. 1998.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEM, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants, *The Plant Cell*, v. 11, p. 431-443. 1999.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Structural and functional diversities in Lepidopteran serine protease. *Cellular and Molecular Biology Letters*. v. 11, p. 132-154. 2006.

STILLMARK, H. Ueber Ricin, ein giftiges Ferment aus dem Samen von *Ricinus communis* L. und einigen anderen Euphorbiaceen. *Arbeiten des Pharmakologischen Institutes Zu Dorpat*, v. 3, p. 59-151. 1888.

STIRPE, F.; BATELLI, M. G. Ribosome inactivating-protein: progress and problems. *Cellular and Molecular Life Science*, v. 63, p. 1866-1870. 2006.

STIRPE, F.; LEGG, R. F.; ONYON, L. J.; ZISKA, P.; FRANS, H. Inhibition of protein synthesis by a toxic lectin from *Viscum album* L (Mistletoe). *Biochemistry Journal*, v. 190, p. 843-845. 1980.

SUZUKI, K.; ISHIMOTO, M. Characterization of the third  $\alpha$ -amylase inhibitor,  $\alpha$  AI-3, in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Breeding Science*, v. 49, p. 275-280. 1999.

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

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

UDEDIBIER, A. B. I.; CARLINI, C. R. Questions and answers to edibility problem of the *Canavalia ensiformis* seeds - a review. *Animal Feed Science and Technology*, v. 74, p. 95-106. 1998.

URWIN, P. E.; ATKINSON, H. J.; MCPHERSON, M. J. Involvement of the NH<sub>2</sub>-terminal region of oryzacystatin-I in cysteine proteinase inhibition. *Protein Engineering design and selection*, v. 8, p. 1303-1307. 1995.

USSUF, K. K.; LAXMI, N. H.; MITRA, R. Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Current Protein and Peptide Science*, v. 80, p. 847-853. 2001.

VAN DAMME, E. J. M.; LANNON, N.; PEUMANS, W. J. Plant lectins. *Advances in Botanical Research*, v. 48, p. 107-209. 2008.

VAN DRIESCHE, E.; FISCHER, J.; BEECKMANS, S.; BOG-HANSE, T. C. Lectins, *Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, v. 11, p. 50-60. 1996.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, v. 44, p. 385-403, 2004.

VIJAYAN, M.; CHANDRA, N. Lectins. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 9, p. 707-714. 1999.

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

WALSH, T. A.; MORGAN, A. E.; HEY, T. D. Characterization and molecular-cloning of a proenzyme form of a ribosome inactivating-protein from maize – Novel

mechanism of proenzyme activation by proteolytic remove of a 2.8 – Kilodalton internal peptide segment. Journal of Biological Chemistry, v. 266, p. 23422-23427. 1991.

WOLFSON, J. L.; MURDOCK, L. L. Diversity in digestive proteinase activity among insects. Journal of Chemical Ecology, v. 16, p. 1089-1102. 1990.

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

ZHU-SALZMAN, K.; SHADE, R. E.; KOIWA, H.; SALZMAN, R. A.; NARASINHAN, M.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M.; MURDOCK, L. L. Carbohydrate binding and resistance to proteolysis control insecticidal activity of *Griffonia simplicifolia* lectin II. Proceedings of the National Academic of Science, USA, v. 95, p. 15123-15128. 1998.



**Purificação de um inibidor do tipo Kunitz de sementes de *Acacia polyphylla***

**DC.: caracterização e propriedades inseticidas contra *Anagasta kuehniella***

**Zeller (Lepidoptera: Pyralidae)**

Suzy Wider Machado<sup>§</sup>, Olga Lima Tavares Machado<sup>ψ</sup>, Cezar Bezerra <sup>†</sup>, Sergio Marangoni<sup>†</sup>, Caio Fernando Ramalho de Oliveira<sup>†</sup>, Maria Ligia Rodrigues Macedo<sup>§\*</sup>

<sup>§</sup>Centro de Ciências Biológicas e Saúde, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande 79070-900, MS, Brazil

<sup>ψ</sup>Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goyatacazes 28013-600, RJ, Brazil

<sup>†</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 13083-970, SP, Brazil

### III - Resumo

*Anagasta kuehniella* é um inseto-praga polífago que causa prejuízos econômicos no mundo todo. Esse inseto, da ordem Lepidoptera, sintetiza serinoprotease como a principal enzima para a digestão de proteínas. Nesse estudo, um novo inibidor de serinoprotease foi isolado a partir de sementes de *Acacia polyphylla* (AcKI). Análises mais aprofundadas revelaram que o AcKI é formado por duas cadeias polipeptídicas com uma massa molecular de aproximadamente 20 kDa. Os efeitos do AcKI sobre o desenvolvimento, sobrevivência e atividade enzimática das larvas de *A. kuehniella* foram avaliados, através da incorporação do AcKI em dieta artificial. Bioensaios revelaram a redução do peso larval em aproximadamente 50% com uma concentração de AcKI de 0,5%. Ensaios adicionais mostraram um aumento nos níveis de atividade enzimática da tripsina e quimotripsina endógenas, com uma diminuição da sensibilidade dessas enzimas ao inibidor. O AcKI produz um efeito anti-nutricional em *A. kuehniella*, indicando que essa molécula é uma proteína promissora para a engenharia de plantas resistentes a este insetos-praga.

**Palavras-chave:** *Acacia polyphylla*; Inibidor do tipo Kunitz; *Anagasta kuehniella*; Inseto-praga.

#### IV - Introdução

A incidência de ataques de insetos-praga em culturas de importância econômica é um sério problema para a produção de alimentos, visto que perdas devido a esses ataques podem chegar a 20% nas maiores culturas <sup>1</sup>. Sabe-se que algumas plantas podem reduzir os danos causados por insetos e patógenos através da síntese de Inibidores de Proteinases (IPs), um grupo de proteínas de plantas que atuam como mecanismo natural de defesa contra herbivoria <sup>2, 3</sup>. Esse grupo de proteínas é abundantemente encontrado na família Fabaceae e estão presentes em vários tecidos da planta, incluindo as sementes, onde podem constituir até 10% do conteúdo total de proteína <sup>4</sup>.

A família mais representativa de inibidores de proteinases é a do tipo Kunitz, que são caracterizados por um peso molecular entre 18-22 kDa, geralmente com quatro resíduos de cisteína formando duas pontes dissulfeto e inibindo tipicamente as enzimas tripsina e quimotripsina <sup>5, 6</sup>. Assim, os IPs têm mostrado efeito inseticida sobre diferentes insetos; e plantas transgênicas expressando IPs têm sido avaliadas como uma estratégia alternativa para a proteção de culturas contra insetos-praga <sup>7</sup>, estimulando dessa maneira a descoberta de novos IPs com diferentes atividades biológicas. No entanto, a escolha de modelos de estudo precisa levar em conta a fisiologia digestiva do inseto como determinante no resultado do efeito inseticida dos IPs sobre as enzimas do intestino médio. Assim insetos da ordem Lepidoptera que possuem serinoprotease, tripsina e quimotripsina, como as enzimas mais representativas em sua fisiologia digestiva <sup>8, 9</sup>, são bons candidatos para se realizar os bioensaios para essa classe de inibidores.

A agricultura moderna é definida pela incorporação de inovações tecnológicas para atender as demandas crescentes do mercado mundial de forma sustentável;

entretanto, é por meio de pesquisas básicas que novas ferramentas são estudadas e finalmente aplicadas no campo.

*Anagasta kuehniella* (Zeller) (Lepidoptera, Pyralidae, Phycitinae), a traça da farinha do mediterrâneo, é um inseto-praga polífago que se alimenta de grãos armazenados, frutas, nozes, geleias, bolos e doces, causando prejuízos econômicos no mundo todo. Dependendo da temperatura e umidade, uma única fêmea pode colocar até 600 ovos <sup>10</sup>. Entretanto, antes de sugerir alternativas de controle a uma praga específica, é importante a realização de estudos de aspecto fisiológico e bioquímico do potencial inseticida da proteína, uma vez que respostas adaptativas podem ser desencadeadas em insetos-praga, anulando o efeito esperado, como já reportado em alguns insetos-praga <sup>11, 12</sup>. Como tal, esse estudo destina-se a descrever a purificação e as propriedades bioquímicas de um novo inibidor isolado de sementes de *Acacia polyphylla* (AckI). Além disso, um completo estudo avaliando o efeito inseticida do AckI sobre o desenvolvimento de *A. kuehniella* foi realizado, utilizando bioensaios, medições de parâmetros nutricionais, fisiológicos e ensaios *in vivo*, para mostrar o potencial do AckI no controle dessa praga.

## V - Material e Métodos

**1. Materiais.** As sementes de *A. polyphylla* foram obtidas localmente, na região de Três Lagoas, no estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Albumina sérica bovina (BSA), tripsina pancreática bovina,  $\alpha$ -quimotripsina pancreática bovina, N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide (BAPNA), N-benzoyl-L-tyrosyl-p-nitroanilide (BTPNA), succinyl-alanyl-alanyl-propyl-phenylalanyl-p-nitroanilide (SAAPNA), N-p-tosyl-lysine-chloromethyl ketone (TLCK), tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone (TPCK) e reagentes para eletroforese foram adquiridos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Os

suportes cromatográficos foram adquiridos da GE Healthcare. Todos os produtos químicos e reagentes usados foram de grade analítica.

**2. Insetos.** A colônia da traça da farinha (*A. kuehniella*) foi mantida em condições padrões de temperatura ( $28 \pm 1$  °C), umidade ( $70 \pm 5\%$ ) e fotoperíodo (16 horas). Os insetos se alimentaram em uma dieta constituída de gérmen de trigo e farinha integral (3:2).

**3. Purificação do AcKI.** As sementes de *A. polyphylla* livres do tegumento foram trituradas em um moinho e posteriormente delipidadas com hexano. O extrato bruto das sementes foi obtido através da extração, a partir do material triturado, com tampão fosfato 0,1M, pH 7,6 (1:10, p/v), por duas horas, seguida pela centrifugação a 10 000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi dialisado contra água destilada por três dias a 4°C, e posteriormente liofilizado. Para a purificação do AcKI, o extrato bruto foi dissolvido em tampão fosfato 0,1M, pH 7,6, contendo 0,1 M de NaCl e aplicado a uma coluna cromatográfica Sephadex G-50 (2 x 50 cm) que foi equilibrada com o mesmo tampão. Frações de 3 mL foram coletadas com uma taxa de 36 mL/h. As frações contendo atividade inibitória foram agrupadas e dialisadas durante 48 horas a 4°C e posteriormente liofilizadas. O pico que mostrou atividade inibitória foi aplicado em uma coluna Sepharose-tripsina (12 x 3 cm) equilibrada com tampão fosfato de Sódio 0,1 M, pH 7,6, contendo 0,1 M de NaCl a uma taxa de 30 mL/h. As proteínas que ficaram ligadas à coluna foram eluídas com 50 mM de HCl, e subsequentemente dialisadas e liofilizadas. As proteínas foram detectadas através de monitoramento da absorbância a 280 nm.

**4. Análise em RP-HPLC do AcKI Purificado.** O pico eluído da coluna Sepharose-tripsina foi submetido à Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Fase Reversa (RP-HPLC). As amostras foram aplicadas a uma coluna C5 (Symmetric, Waters

System) que foi previamente equilibrada com 0,1% de TFA (solvente A), seguido por 60 min de gradiente linear de 0 a 100% (v/v) de 66% (v/v) de acetonitrila em 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético (solvente B). As proteínas foram detectadas por monitoramento da absorbância a 280 nm.

**5. Quantificação de Proteínas.** O conteúdo de proteínas foi determinado por coloração Coomassie blue, através do método desenvolvido por Bradford <sup>13</sup>, usando albumina sérica bovina (1mg/mL) como padrão.

**6. Ensaio de Atividade Inibitória.** Os ensaios de atividade inibitória foram determinados através do monitoramento da atividade hidrolítica da tripsina e quimotripsina bovina sobre os substratos, BAPNA e BTPNA, respectivamente. Ambas as enzimas foram incubadas com AcKI (1 mg/mL) por 10 minutos, a 37°C, em tampão Tris-HCl (50 mM), pH 8,0 antes de iniciar a reação <sup>14</sup>. Para iniciar a reação, 1 mM de BAPNA ou 20 mM de BTPNA foram adicionados ao ensaio. Após 15 minutos, a reação foi parada pela adição de 30% de ácido acético (v/v). A liberação de cromoforo p-nitroanilide foi monitorada a 405 nm para ambos os substratos. Controle de substratos e enzimas foram utilizados para assegurar a validade das leituras de absorbância da amostra.

**7. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida e Focalização Isoelétrica.** Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, 12,5%), na ausência e presença de 100 mM de dithiothreitol (DTT), foi realizada como descrito por Laemmli <sup>15</sup>. As proteínas foram detectadas por coloração de Coomassie brilliant blue R-250 (0,1%).

A focalização isoelétrica foi analisada sobre um sistema coletor (LKB) usando solução de anfolina (40%, v/v) em uma escala de pH de 3,5 a 9,5, com subsequente coloração com Coomassie blue G-250, de acordo com o procedimento descrito por

Westermeier <sup>16</sup>. Os inibidores foram detectados usando técnicas de coloração negativa, de acordo com Uriel e Berges <sup>17</sup>.

**8. Estabilidade Térmica e ao pH.** Amostras de AcKI (1mg/mL em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,0) foram aquecidas por 30 minutos em banho-maria em várias temperaturas (37° a 100°C) e, em seguida, foram congeladas a 0°C, e mantidas até que fosse testado a atividade residual do inibidor na amostra. Para medir a estabilidade frente ao pH, uma amostra de AcKI (1 mg/mL) foi diluída em igual volume em vários tampões (100 mM): citrato de sódio (pH 2 a 4), acetato de sódio (pH 5), fosfato de sódio (pH 6 e 7), Tris-HCl (pH 8) e bicarbonato de sódio (pH 9 e 10). Após a incubação em cada tampão por uma hora a 37 °C, o pH foi reajustado para pH 8,0 e a atividade inibitória sobre a tripsina foi avaliada como descrito anteriormente. Todos os experimentos foram analisados em triplicata e os resultados reportados são a média dos três ensaios.

**9. Sequenciamento Amino-Terminal.** A sequência amino-terminal do AcKI foi determinada por sequenciamento direto, usando degradação de Edman automatizada e um sequenciador de aminoácido PROCISE (Applied Biosystems). O aminoácido feniltioidantoina (PTH) foi identificado em um analisador de aminoácido (PTH) modelo 140C, baseado no tempo de retenção. A sequência foi submetida a um alinhamento automático, no banco de dados NCBI, usando o programa Blast.

**10. Preparação do Intestino Médio.** As proteases foram obtidas do intestino médio de larvas, de acordo com o protocolo descrito por Macedo *et al.* <sup>18</sup>. As larvas foram imobilizadas em gelo e dissecadas. Os intestinos médios foram cirurgicamente removidos e colocados em uma solução salina iso-osmótica, agrupados em alíquotas de 10 intestinos que subsequentemente foram homogeneizados em 150

mM de NaCl e centrifugados a 6 000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi estocado a – 20 °C até o uso em ensaios enzimáticos.

#### **11. Atividade Inibitória do AcKI, TLCK e TPCK Sobre Diferentes Enzimas.**

Tripsina e quimotripsina bovina foram incubadas com inibidores sintéticos de tripsina (TLCK) e quimotripsina (TPCK), respectivamente, bem como com AcKI (2µg) a 37°C, em 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,0. Os substratos, BAPNA e BTPNA, foram utilizados como descrito anteriormente. O mesmo ensaio foi realizado, utilizando extrato de intestino médio (5 µg) de larvas do quarto instar como fonte de enzimas, usando os substratos BAPNA e SAAPPNA, este último sendo específico para quimotripsina de insetos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os controles apropriados foram incluídos.

**12. Efeito do AcKI Sobre o Desenvolvimento de *A. kuehniella*.** Para examinar os efeitos do AcKI sobre o desenvolvimento de *A. kuehniella*, larvas neonatas foram alimentadas em uma dieta artificial contendo AcKI nas concentrações de 0,5%, 1,0% e 2,0% (p/p) até chegarem ao quarto instar. O experimento controle, sem o inibidor, também foi realizado. Para cada tratamento, quatro larvas neonatas foram colocadas em um frasco limpo, até um total de dez frascos, contendo então 40 larvas neonatas no total para cada tratamento (n=40). Após 22 dias de incubação sob condições padrão de temperatura e umidade, o peso e o número de larvas sobreviventes foram determinados. Análise de regressão linear foi usada para avaliar a resposta de *A. kuehniella* às concentrações de AcKI. A dosagem efetiva para 50% de resposta foi definida como a concentração de AcKI que apresentaram peso larval cerca de 50% menor do que o grupo controle. Após a escolha da concentração ideal de AcKI (redução de peso de 50%), ensaios adicionais foram realizados, a fim de avaliar o peso e sobrevivência no terceiro (16 dias), quarto (22



dias) e quinto ínstar (28 dias), sob as mesmas condições estabelecidas no primeiro experimento. Dieta e produção fecal foram medidas para avaliação dos parâmetros nutricionais. Ensaio bioquímico com as principais enzimas presentes no intestino médio de *A. kuehniella* também foram realizados.

**13. Parâmetros Nutricionais.** Foram avaliados os parâmetros nutricionais em larvas de terceiro, quarto e quinto ínstar entre o grupo exposto à dieta com AcKI e dieta controle. As larvas, fezes e restos de alimentos foram separados usando um microscópio estereoscópio, e em seguida foram secos e pesados. Parâmetros nutricionais de consumo, digestão e utilização do alimento foram calculados, segundo descrito por Waldbauer <sup>19</sup> e Farrar *et al.* <sup>20</sup>. O índice nutricional, denominado eficiência da conversão do alimento ingerido (ECI), eficiência da conversão do alimento digerido (ECD), digestibilidade aproximada (DA) e custo metabólico (CM) foram calculados como a seguir:

$ECI (\Delta B/I) \times 100$ ;  $ECD [\Delta B/I - F] \times 100$ ;  $DA [(I - F)/I] \times 100$  e  $CM (100 - ECD)$ , onde I = peso do alimento consumido,  $\Delta B$  peso larval e F = peso das fezes produzidas durante o período na dieta.

**14. Zimografia em Gel de Eletroforese da Atividade das Proteases do Extrato do Intestino Médio:** As proteínas extraídas do intestino médio das larvas de *A. kuehniella* foram analisadas em SDS-PAGE (12,5%) contendo 0,1% de gelatina <sup>21</sup>. Após a corrida em gel de eletroforese a 4 °C, o gel foi lavado com 2,5% de solução Triton X-100 por duas horas sob agitação para remover o SDS, posteriormente o gel foi incubado com 0,1 M de tampão Tris-HCl, pH 8,0 de 2 a 3 horas. Por último, o gel foi submetido à coloração com Coomassie blue R-250. As bandas de atividade proteolítica apareceram como zonas claras contra um fundo azul.

**15. Efeito do AcKI Ingerido Sobre as Proteases do Intestino Médio.** As enzimas tripsina e quimotripsina presentes no extrato do intestino médio de larvas de *A. kuehniella* (alimentadas em ambas as dietas, contendo AcKI e controle) foram avaliadas usando o substrato BAPNA e SAAPPNA, para tripsina e quimotripsina, respectivamente. Uma amostra de intestino médio (5 µg) foi incubada a 37°C por 10 minutos antes da adição do substrato para começar a reação, a qual durou 15 minutos para o substrato BAPNA e 5 minutos para o SAAPPNA. A reação foi parada através da adição de 30% (v/v) de ácido acético.

Para analisar a capacidade do AcKI de inibir a atividade dessas enzimas, amostras de extrato de intestino médio foram incubadas com concentrações crescentes de AcKI (0 a 2 µg). Ensaio de inibição para tripsina e quimotripsina foram então realizados, como descrito acima. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

**16. Digestão do AcKI.** Para verificar a possibilidade do AcKI ser digerido pelas enzimas digestivas do inseto, o AcKI foi incubado com 50 mM de tampão Tris-HCl, pH 8,0 e com as enzimas digestivas do extrato do intestino médio de larvas de quarto ínstar, por 72 horas a 30°C (concentrações iguais de extrato de intestino médio e de AcKI). A digestão foi parada pela imersão dos tubos em gelo. A atividade inibitória remanescente do AcKI foi analisada através da inibição da tripsina, usando BAPNA como substrato.

**17. Análise Estatística.** Todos os dados foram examinados usando análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste *a posteriori* de Tukey, para análise de peso larval e Kruskal-Wallis, para análise de sobrevivência de larvas. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## VI - Resultados e Discussão

**1. Purificação do AcKI.** Diferentes técnicas cromatográficas foram usadas para a purificação do AcKI. No primeiro passo, a filtração em gel separou o extrato bruto em dois grupos principais (Fig. 1A), onde apenas o segundo pico (segundo grupo) mostrou atividade inibitória contra tripsina. No segundo passo, esse segundo pico da filtração em gel foi submetido à cromatografia de biofinidade e o pico eluído com HCl 50 mM da coluna exibiu atividade inibitória contra tripsina (Fig. 1B). O inibidor purificado pela coluna de afinidade foi submetido ao RP-HPLC. Usando um gradiente linear de tampão B, a presença de quatro principais picos foi observado, com um tempo de retenção similar (Fig. 1C), sugerindo a presença de iso-inibidores, como reportado para outros inibidores do tipo Kunitz <sup>6, 25</sup>.

A análise em SDS-PAGE (12,5%) revelou que uma única proteína foi purificada, mostrando um peso molecular aproximado de 20 kDa sob condições não reduzidas (Fig. 1D). Essa proteína, denominada AcKI, foi submetida a maiores estudos para caracterizações adicionais. Apesar do AcKI apresentar uma única banda sob condições não reduzidas, o tratamento do AcKI com DTT demonstrou a presença de duas bandas de massas moleculares distintas, indicando que essa molécula possui duas cadeias polipeptídicas (*Insert*, Fig.1A). Outros IPs isolados do gênero *Acacia* possuem massa molecular entre 18 a 22 kDa: *A. elata* ~20 kDa <sup>22</sup>, *A. siberiana* ~19 kDa <sup>23</sup>, *A. confusa* ~21 kDa <sup>24</sup>, *A. victoriae* ~18.3 kDa <sup>5</sup>, *A. plumosa* ~20 kDa <sup>25</sup>, and *A. senegal* 18-22 kDa <sup>26</sup>. Além disso, a presença de duas cadeias polipeptídicas parece ser outra característica entre os inibidores desse gênero, como também acontece em outros inibidores da subfamília Mimosoideae.

A análise da focalização isoeletrica do AcKI, mostrou a presença de quatro bandas com escalas de p/s entre 6,5 e 5,85 (Fig. 1E), confirmando a ocorrência de

isoinibidores. Inibidores de proteases podem apresentar variadas formas moleculares e diferentes valores de  $pI$ <sup>4</sup>, entretanto a maioria dos inibidores do tipo Kunitz são ácidos<sup>14, 30</sup>. A existência de isoformas na natureza, possivelmente está relacionada com o sinergismo entre elas para garantir a sobrevivência da planta,<sup>4</sup> já que as tentativas de adaptação para neutralizar os efeitos de proteínas tóxicas por parte dos insetos são em grande parte bem sucedidas.

**2. Estabilidade Térmica e ao pH.** Os inibidores Kunitz frequentemente têm demonstrado características de tolerância a altas temperaturas e sobre uma larga variação de pH<sup>28-31</sup>. Ensaios *in vitro* com 1 µg de AcKI revelaram que o inibidor mantém a atividade inibitória mesmo depois de incubado à temperaturas acima de 90 °C, como mostrado na Figura 2 A. Do mesmo modo, a incubação do AcKI, na concentração de 1 µg, em uma escala de pH de 2 a 10 também pareceu não afetar sua atividade inibitória (Fig. 2B). Todavia quando se reduz a concentração de AcKI para 0,1 µg no ensaio, a proteína perde significativamente sua atividade a partir de 60°C (Fig. 2C). E da mesma forma que para estabilidade térmica, em baixa concentração de AcKI (0,1 µg), a estabilidade da molécula é afetada, mantendo atividade apenas próximo ao pH 8 (Fig. 2D).

**3. Sequenciamento Amino-Terminal.** O pico IV (AcKI), obtido através do RP-HPLC (Fig. 1C), foi submetido a análise de sequência amino-terminal, e mostrou homologia com inibidores da família Kunitz. A Tabela 1 mostra a comparação da sequência entre AcKI e alguns inibidores Kunitz com identidade acima de 75%, tais como inibidores de *Glycine max*<sup>32-34</sup> e *Psophocarpus tetragonolobus*<sup>35</sup>.

**4. Atividade Inibitória do AcKI.** A atividade inibitória do AcKI sobre a tripsina e quimotripsina de *A. kuehniella* e a de origem bovina foram analisadas. O AcKI demonstrou uma inibição mais forte sobre a tripsina, do que sobre a quimotripsina

(Fig. 3). Esse perfil é característico da maioria dos inibidores Kunitz que apresentam inibição contra tripsina e quimotripsina; geralmente inibem essa última em menor grau, tal fato acontece, por exemplo, com inibidor de tripsina de *A. elata* <sup>22</sup>; *A. confusa* (ACTI) <sup>24</sup>; *Enterolobium contortisiliquum* (ECTI) <sup>29</sup>, *Peltophorum dubium* (PDTI) <sup>31</sup>, *Archidendron ellipticum* (AeTI) <sup>36</sup>; *Cesalpineia bonduc* (CbTI) <sup>9</sup>; *A. plumosa* (ApTI) <sup>25</sup>. O AcKI foi mais efetivo em inibir a tripsina comercial do que tripsina de *A. kuehniella*, assim 1,5 µg de AcKI inibiu cerca de 98% da atividade da tripsina comercial, enquanto a mesma concentração de inibidor inibiu aproximadamente 80% da atividade trípica de *A. kuehniella*. Essa preferência de inibidores Kunitz por tripsina de vertebrados, em vez de tripsinas de insetos, já foi reportado anteriormente por Macedo *et al* <sup>31</sup>. Outro inibidor de tripsina isolado de sementes de *Pithecelobium dumosum*, se comporta de maneira similar, inibindo cerca de 98% de tripsina bovina, enquanto na mesma concentração inibiu cerca de 90% da atividade tripsina de *A. kuehniella* <sup>37</sup>. Estudo com AeTI e SKTI, também mostraram um menor grau de inibição de tripsinas de *Spodoptera frugiperda*, quando comparada com a inibição de tripsina bovina <sup>36</sup>. Esse comportamento tem sido estudado por diferentes autores e o entendimento geral é que durante a co-evolução de insetos e plantas, os insetos desenvolveram sobre suas tripsinas um aumento da hidrofobicidade em seu sítio reativo, fazendo com que a interação com os sítios reativos hidrofílicos de IPs fosse mais fraca, um mecanismo de adaptação para a resistência de insetos a IPs <sup>38</sup>. A inibição das enzimas digestivas de *A. kuehniella* por inibidores sintéticos de tripsina (TLCK) e quimotripsina (TPCK) foram avaliadas em enzimas do intestino médio de larvas de quarto instar (Fig. 4). Quando adicionado *in vitro* extrato do intestino médio de *A. kuehniella*, o TLCK inibiu completamente a atividade da tripsina, enquanto o TPCK não inibiu a atividade da quimotripsina. Sob as mesmas

condições, o AcKI inibiu cerca de 90% e 30% da tripsina e quimotripsina, respectivamente, reafirmando que o AcKI inibe quimotripsina mais fracamente. Estudos anteriores têm mostrado a inibição de quimotripsinas de insetos pelo TPCK em *Galleria mellonella*<sup>39</sup> e *Ostrinia nubilalis*<sup>40</sup>, entretanto nenhum efeito foi observado em *Heliothis virescens*<sup>41</sup>, *Spodoptera littoralis*<sup>42</sup>, *Manduca sexta*<sup>43</sup>, *Bombyx mori*<sup>44</sup>, *Helicoverpa zea*<sup>45</sup> e *Spodoptera frugiperda*<sup>46</sup>. De acordo com Lopes *et al.*<sup>46</sup>, as quimotripsinas de insetos pertencentes a outras ordens, que não Lepidoptera são inativadas por TPCK, enquanto dentro da ordem Lepidoptera, essa inibição é variável. A maioria dos insetos dessa ordem possuem quimotripsinas características, com um aminoácido translocado que pode resultar na redução do acesso do substrato ao sítio ativo da enzima devido a um impedimento estérico. Outra possibilidade é que a troca na proximidade do His 57 em quimotripsinas de lepidópteros podem afetar os valores de pKa, diminuindo a reatividade do His 57 com cetonas e outros reagentes<sup>44</sup>. Essa possível translocação do aminoácido pode ser uma adaptação à pressão de seleção devido a um hábito alimentar generalista, como é o caso de *A. kuehniella*.

**5. Efeito do AcKI Sobre o Desenvolvimento de Larvas de *A. kuehniella*.** O efeito do AcKI sobre o desenvolvimento de larvas de *A. kuehniella* foi monitorado através da alimentação da larva em uma dieta contendo AcKI (de 0 a 2%) com análise de peso e número de sobreviventes em larvas de quarto instar. A média do peso de larvas alimentadas em dieta controle foi 9 mg e em larvas alimentadas em dieta contendo 0,5% de inibidor foi 4,4 mg, ou seja uma redução de cerca de 50% (dados não mostrados). Essa concentração de 0,5% de AcKI foi definida como sendo ótima para os futuros testes, como a análise de peso e sobrevivência em larvas de terceiro, quarto e quinto instar (Fig 5 A e B). As larvas alimentadas na dieta contendo

AcKI mostraram uma diferença significativa de peso ( $p < 0,05$ ), reduzindo cerca de 53% no terceiro instar, 48,5% no quarto instar e 43% no quinto instar, quando comparadas com as respectivas larvas alimentadas em dieta controle. Quando alimentadas em uma dieta contendo 0,5% de AcKI, a sobrevivência larval não variou, com exceção de larvas de terceiro instar, que mostraram uma redução significativa na sobrevivência ( $p < 0,05$ ), de 22%.

Dentre os inibidores de tripsinas de sementes de *Acacia* que foram anteriormente estudados, AsPI (Inibidor de tripsina de *A. senegal*) mostrou atividade inseticida sobre *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera), afetando o desenvolvimento larval desse inseto <sup>26</sup>. A concentração de AcKI usada em nosso estudo (0,5%) corresponde aos níveis naturais em sementes de leguminosas e foi similar ao usado em experimentos desse tipo por outros autores <sup>47, 48</sup>. Os parâmetros nutricionais ilustrados na Tabela 2, mostraram que as larvas que se alimentaram com AcKI, tiveram uma menor eficiência na conversão do alimento ingerido (ECI), justificando o baixo peso larval. O custo metabólico (CM) e a digestibilidade aproximada (DA) em larvas alimentadas com o AcKI foram maiores, indicando que uma considerável porcentagem do alimento metabolizado é usada para a manutenção de processos vitais e uma menor porção é usada para ganho de massa. As larvas de *A. kuehniella* que ingeriram cronicamente 0,7% de PFTI (Inibidor de Tripsina de *Plathymenia foliolosa*) tiveram o mesmo comportamento <sup>49</sup>.

**6. Efeito do AcKI sobre as Enzimas Digestivas.** A atividade proteolítica das enzimas tripsina e quimotripsina das larvas de *A. kuehniella* que foram alimentadas cronicamente com AcKI foram mensuradas utilizando BAPNA e SAAPPNA como substrato, respectivamente. No grupo controle, em relação à atividade da tripsina, houve um pico no quarto instar, decrescendo no quinto (Fig. 6); enquanto para

quimotripsina, uma alta atividade começou no terceiro instar e decresceu nos instares subsequentes (Fig. 7). O quinto instar é o ultimo estágio antes do empupamento, onde a larva não se alimenta mais, logo não necessita de enzimas digestivas, o que justifica a redução da atividade proteolítica observadas em larvas controle. Entretanto, esse perfil não se repetiu em larvas que se alimentaram com AcKI. No quinto instar, ambas as enzimas, tripsina e quimotripsina apresentam um aumento em suas atividades (Fig. 6 e 7), sugerindo que mais enzimas estão sendo sintetizadas pelas larvas de *A. kuehniella* em resposta ao AcKI na dieta. Avaliações bioquímicas e evidências moleculares indicam que alguns insetos tentam se adaptar à presença de inibidores de proteinases através da superprodução de proteases nativas<sup>12, 48</sup> ou pela síntese de isoenzimas<sup>50, 51, 52</sup>, o que está em concordância com o aumento das atividades da tripsina e quimotripsina observadas nesse caso. Aparentemente não houve troca no perfil enzimático e visualmente nenhuma forma variante de enzima foi observada através da análise da Zimografia em gel de eletroforese (Fig. 8), porém é possível observar um aumento das proteinases nativas no quinto instar larval, corroborando os resultados encontrados para as análises bioquímicas da tripsina e quimotripsina. A atividade proteolítica de ambos os tratamentos foram avaliadas após a incubação *in vitro* com concentrações crescentes de AcKI. No terceiro instar, a inibição das enzimas tripsina (Fig. 9 A) e quimotripsina (Fig. 9 D) foi proporcional a adição de AcKI. Um perfil de inibição similar foi observado no quarto instar para tripsina (Fig. 9 B) e quimotripsina (Fig. 9 E). Entretanto, no quinto instar larval, observou-se um decréscimo na atividade inibitória em larvas alimentadas com AcKI para ambas as classes de enzimas (Fig. 9 C e F). Essa alteração no perfil de inibição indica que o *pool* de enzimas de *A. kuehniella* adquiriram algum grau de insensibilidade ao AcKI. Claramente, os insetos



responderam à dieta tentando se adaptar aos efeitos negativos do inibidor. Estudos anteriores tem mostrado que larvas de *A. kuehniella* não adquiriram insensibilidade quando expostas a PFTI <sup>49</sup> e ApTI <sup>18</sup>. No entanto, deve-se levar em consideração que insetos-praga podem responder a presença de IPs de diferentes maneiras. Outra possibilidade é que a troca na sensibilidade das enzimas do intestino médio ocorra apenas no último instar larval. Assim, como os estudos anteriores analisaram apenas o quarto instar larval, é possível que os autores não tenham observado esse efeito. Sabe-se que essa estratégia de adaptação, através da indução da produção de isoenzimas insensíveis aos IPs, é utilizada pelos insetos <sup>51, 52</sup>. Outros autores já reportaram que em resposta ao consumo de inibidores de tripsina ou quimotripsina na dieta, alguns lepidópteros como *Helicoverpa zea*, *Agrotis ipsilon*, *Spodoptera exigua* e *Spodoptera frugiperda*, sintetizaram novas isoenzimas insensíveis aos IPs testados <sup>12, 45, 51</sup>.

**7. Digestão do AcKI.** Após a incubação por até 72 horas a 30 °C, do AcKI com extrato de intestino médio de larvas controle, e de larvas alimentadas com AcKI, a digestibilidade *in vitro* foi analisada através do monitoramento da atividade residual da tripsina (Fig. 10). O AcKI foi resistente a digestão por até 24 horas de incubação e manteve a inibição da tripsina em ambos os extratos de intestino médio. Todavia, após 24 horas de incubação, as enzimas dos intestinos médios controle, sem a adição de AcKI (controle negativo) naturalmente perderam sua atividade enzimática; desse modo, foi considerado o tempo de digestão até esse ponto. Baseado nesse resultado, verificou-se que as enzimas presentes em ambos os tratamentos foram incapazes de digerir o AcKI durante as primeiras 24 horas. Resistência à digestão é um importante pré-requisito para uma proteína exercer efeito inseticida. Muitas proteínas tóxicas com atividade inseticida são resistentes à degradação por enzimas

digestivas, como por exemplo, Talisin, uma proteína inseticida com atividades de lectina e propriedades de inibidor de proteinase de sementes de *Talisia sculenta*<sup>53</sup>,  
<sup>54</sup>.

Esse estudo trouxe a purificação e caracterização de um novo inibidor do tipo Kunitz, com potencial inseticida sobre *A. kuehniella* em baixas concentrações. Efeitos de redução de peso e efeitos negativos sobre a fisiologia, como o aumento da síntese das enzimas inibidas, foram observados, bem como a alteração de parâmetros nutricionais. Nossa hipótese é que devido à superprodução das enzimas que foram inibidas, houve um déficit de energia e de aminoácidos para outras vias metabólicas, igualmente essenciais ao desenvolvimento do inseto. Apesar dos efeitos antinutricionais e da tentativa de adaptação através da produção de isoenzimas insensíveis, o inseto não foi capaz de degradar o inibidor por meio das enzimas digestivas. Dessa maneira o AcKI se mostra uma proteína inseticida com um bom potencial biotecnológico a ser melhor estudado, para que possa ser aproveitado na engenharia de plantas resistentes a insetos-praga.

**VII - Abreviações Usadas:** BAPNA - N-benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide; BTPNA - N-benzoyl- L-tyrosyl-p-nitroanilide; SAAPPNA - Succinyl-alanyl-alanyl-propyl-phenylalanyl-p-nitroanilide; TLCK - N-p-tosyl-lysine chloromethyl ketone; TPCK - tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone; DTT – dithiothreitol; BSA – albumina sérica bovina.

## **VIII - Agradecimentos**

Os autores são gratos pelo suporte dado pelas agências de fomento brasileiras: FINEP, CAPES, CNPq, FUNDECT e FAPESP (2011/09361-0).

## IX - Literatura Citada

1. Ferry, N.; Edwards, M. G.; Gatehouse, J. A.; Gatehouse, A. M. R. Plant-insect interactions: molecular approaches to insect resistance. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 155-161.
2. Macedo, M. L. R.; Sá, C. M.; Freire, M. G. M.; Parra, J. R. P. A kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effects on *Callosobruchus maculatus*. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2533-2540.
3. Kim, J. S.; Park, S. C.; Hwang, I.; Cheong, H.; Nah, J. W.; Hahm, J. S.; Park, Y. Protease inhibitor from plants with antimicrobial activity. *J. Mol. Sci.* **2009**, *10*, 2860-2872.
4. Richardson, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In *Methods in Plant Biochemistry, Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids*, Rogers, J. L. Ed.; Academic Press: New York, NY, **1991**; Vol. 5., pp 259-305.
5. Ee, K. Y.; Zhao, J.; Rehman, A.; Agboola, S. O. Purifications and characterizations of a kunitz-type trypsin inhibitor from *Acacia victoriae* Benth. seeds. *J. Agric. Food. Chem.* **2009**, *57*, 7022-7029.
6. Oliveira, C. F. R.; Vasconcelos, I. M.; Aparicio, R.; Freire, M. G. M.; Baldasso, P. A.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. R. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. *Process Biochem.* **2012**, *47*, 929-934.
7. Schuler, T. H.; Poppy, G. M.; Kerry, B. R.; Denholm, I. Environmental risk assessment of a transgene products using honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *Trends Biotech.* **1998**, *16*, 168-175.

8. Hilder, V. A.; Gatehouse, A. M. R.; Sheerman, S. E. R. F.; Boulter, B. D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*. **1987**, 330, 160–163.
9. Bhattacharyya, A.; Rai, S.; Babu, C.R. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Cesalpineia bonduc* seeds: Isolation, partial characterization and insecticidal properties. *Plant Physiol. Biochem.* **2007**, 45, 169-177.
10. Coelho, M. B.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. Insecticidal action of *Annona coriacea* lectin against the flour moth *Anagasta kuehniella* and Rice moth *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera: Pyralidae). *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* **2007**, 146, 406-414.
11. Gatehouse, L. N.; Shannon, A. L.; Burgess, E. P. J.; Christeller, J. T. Characterization of major midgut proteinase cDNA from *Helicoverpa armigera* larvae and change in gene expression in response to four proteinase inhibitor in the diet. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1997**, 27, 929-944.
12. 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.* **2007**, 37, 1283-1290.
13. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantifications of microgram quantities of protein using the principal of protein-dye-binding. *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248-254.
14. Mello, G. C.; Oliva, M. L. V.; Sumikawa, J. T.; Machado, O. L. T.; Marangoni, S.; Novello, J. C.; Macedo, M. L. R. Purifications and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. *J. Protein. Chem.* **2001**, 20, 625-632.

15. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage. *Nature*. **1970**, 227, 680-685.
16. Westermeier, R. Gel Electrophoresis. In *A Guide to Theory and Practice*; Ebel, H. F. Ed.; VCH Publishers: New York, NY, 1993. pp. 210–212.
17. Uriel, J.; Berges, J. Characterization of natural inhibitors of trypsin and chymotrypsin by electrophoresis in acrylamide-agarose gels. *Nature* 1968, 218, 578– 580.
18. 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. Insec. Biochem. Physiol.* **2010**, 73, 213-231.
19. Waldbauer, G. P. The consumption and utilization of food by insects. *Adv. Insect Physiol.* **1968**, 5, 229-288.
20. Farrar, R. R.; Barbour, J. D.; Kenedy, G. G. Quantifying food consumption and growth in insect. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **1989**, 82, 593-598.
21. Michaud, D.; Cantin, L.; Raworth, D. A.; Vrain, T. C. Assessing the stability of cystatin/cysteine proteinase complexes using mildly-denaturing gelatin-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*. **1996**, 17, 74-79.
22. Kortt, A. A.; Jermyn, M. A. Purification and properties of the trypsin inhibitor from *Acacia elata* seed. *Eur. J. Biochem.* **1981**, 115, 551-557.
23. Joubert, F. J. Purification and properties of the proteinase inhibitor from *Acacia siberiana* (paperback *Acacia*) seed. *Phytochemistry*. **1983**, 22, 53-57.
24. Lin, J. Y.; Chu, S. C.; Wu, W. C.; Hsieh, Y. S. Trypsin inhibitor from the seeds of *Acacia confusa*. *J. Biochem.* **1991**, 110, 879.

25. Lopes, J. L. S.; Valadares, N. F.; Morais, D. I.; Rosa, J. C.; Araujo, H. S. S.; Beltramini, L. M. Physico-chemical and antifungal properties of protease inhibitor from *Acacia plumosa*. *Phytochemistry*. **2009**, 70, 871-879.
26. Babu, S. R.; Subrahmanyam, B. Bio-potency of serine proteinase inhibitor from *Acacia senegal* seeds on digestive proteinases, larval growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Pest. Biochem. Physiol.* **2010**, 98, 349-358.
27. Ceiro, L. D.; Oliva, M. L. V.; Torquato, R.; Kohler, P.; Weder, J. K. P.; Novello, J. C.; Sampaio, C. A. M.; Oliveira B.; Marangoni, S. The complete amino acid sequence of trypsin inhibitor from *Bauhinia variegata* var. *candida* seeds. *J. Protein. Chem.* **1998**, 17, 827-834.
28. Bhattacharyya, A.; Mazumdar, S.; Leighton, S. M.; Babu, C. R. A kunitz proteinase from *Archidendron ellipticum* seeds: purification, characterizations and kinetic properties. *Phytochemistry*. **2006**, 67, 232-241.
29. Batista, I. F.; Oliva, M. L.; Araujo, M. S.; Sampaio, M. U.; Richardson, M.; Fritz, H.; Sampaio, C. A. Primary structure of a kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. *Phytochemistry*. **1996**, 41, 1017-1022.
30. Macedo, M. L. R.; Matos, D. G.; Machado, O. L.; Marangoni, S.; Novello, J. C. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochemistry*. **2000**, 54, 553-558.
31. 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 protease and its effects on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochim. Biophys. Acta.* **2003**, 1621, 170-182.

32. Ashida, Y.; Matsushima, A.; Tsuru, Y.; Hirota, T.; Hirata, T. Isolation and sequencing of a cDNA clone encoding a 20-kDa protein with trypsin inhibitory activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 1305-1309.
33. Gotor, C.; Pintor-Toro, J. A.; Romero, L. C. Isolation of a new member of the soybean Kunitz-type proteinase inhibitors. *Plant Physiol.* **1995**, *107*, 1015-1016.
34. Roshed, N. A.; Mac Donald, M. H.; Matthews, B. F. Protease inhibitor expression in soybean roots exhibiting susceptible and resistance interactions to soybean cyst nematode. *J. Nematol.* **2008**, *40*, 138-146.
35. Yamamoto, M.; Hara, S.; Ikenaka, T. Amino acid sequences of two trypsin inhibitor from winged bean seeds (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC.). *J. Biochem.* **1983**, *94*, 849-863.
36. Bhattacharyya, A.; Sudeshna, M. L. B.; Babu, C. R.; Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C: Toxicol. Pharmacol.* **2007**, *145*, 669-677.
37. 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.; Sales, M. P. Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. *Plant Physiol. Biochem.* **2007**, *45*, 858-865.
38. Lopes, A. R.; Juliano, M. A.; Juliano, R.; Terra, W. R. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2004**, *55*, 140-153.



39. Hammed, M. B. B.; Attias, J. Isolations and characterization of two alkaline proteases of the greater wax moth *Galleria mellonella* (L.). *Insect Biochem.* **1987**, 5, 653-658.
40. Houseman, J. G.; Philogène, B. J. R. Partial characterization of proteinases activity in the larval midgut of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae). *Can. J. Zool.* **1989**, 67, 864-868.
41. Johnston, K. A.; Lee, M. J.; Brough, C.; Hilder, V. A.; Gatehouse, J. A. Protease activity in the larval midgut of *Heliothis virescens*: Evidence for trypsin and Chymotrypsin-like enzymes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 25, 375-383.
42. Lee, M. J.; Anstee, J. H. Endoprotease from the midgut of larval *Spodoptera littoralis* include a chymotrypsin-like enzyme with an extended binding site. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 25, 49-51.
43. Peterson, A. M.; Fernando, G. J. P.; Wells, M. A. Purification, characterization and cDNA sequence of an alkaline chymotrypsin from the midgut of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1995**, 25, 765-774.
44. Kotani, E.; Niwa, T.; Suga, K.; Sugimura, Y.; Oda, K.; Mori, H.; Furusawa, T. Cloning and sequencing of cDNA for a highly basic protease from the digestive juice of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1999**, 8, 299-304.
45. Mazumdar-Leighton, S.; Broadway, R. M. Identification of six chymotrypsins cDNA from larval midgut of *Helicoverpa zea* and *Agrotis ipsilon* feeding on the soybean (kunitz) trypsin inhibitor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **2001**, 31, 633-644.

46. 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. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **2009**, *70*, 188-203.
47. Macedo, M. L. R.; Freire, M. G. M.; Martins, L. T. D. M.; Martinez, D. S. T.; Gomes, V. M.; Smolka, M. B.; Toyama, M. H.; Marangoni, S.; Coelho, L. C. B. B. Novel protein from *Labramia bojeri* A. DC. seeds homologue to kunitz-type trypsin inhibitor with lectin-like properties. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 7548-7554.
48. Jongsma, M. A.; Bolter, C. The adaptation of insect to plant protease inhibitors. *J. Insect Physiol.* **1997**, *43*, 885-895.
49. Ramos, V. S.; Freire, M. G. M.; Parra, J. R. P.; Macedo, M. L. R. Regulatory effect of an inhibitor from *Plathymenia foliolosa* seeds on the larval development of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera). *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* **2009**, *152*, 255-261.
50. Broadway, R. Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.* **1997**, *43*, 855-874.
51. Jongma, M. A.; Bakker, P. L.; Peters, J.; Bosh, D.; Stiekema, W. J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1995**, *92*, 8041-8045.
52. 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. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 10-19.

53. Macedo, M. L. R.; Freire, M. G. M.; Kubo, C. E. G.; Parra, J. R. P. Bioinsecticidal activity of *Talisia sculenta* reserve protein in growth and serine digestive enzymes during larval development of *Anticarsia gemmatalis*. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* **2011**, 153, 24-33.
54. Freire, M. G. M.; Franco, O. L.; Kubo, C. E. G.; Migliolo, L.; Vargas, R. H.; Oliveira, C. F. R.; Parra, J. R. P.; Macedo, M. L. R. Structural insights regarding na insecticidal *Talisia sculenta* protein and its biotechnological potencial for *Diatraea saccharalis* larval control. *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **2012**, 161, 86-92.

## Tabelas

**Tabela 1.** Alinhamento comparativo da sequência N-terminal de inibidores da família Kunitz conhecidos. TI p20, KTI e p20 1: inibidores de tripsina de *Glycine max*; WTI 1A e WTI 1B: inibidores de tripsina de *Psophocarpus tetragonolobus*. Resíduos idênticos estão em blocos sombreados.

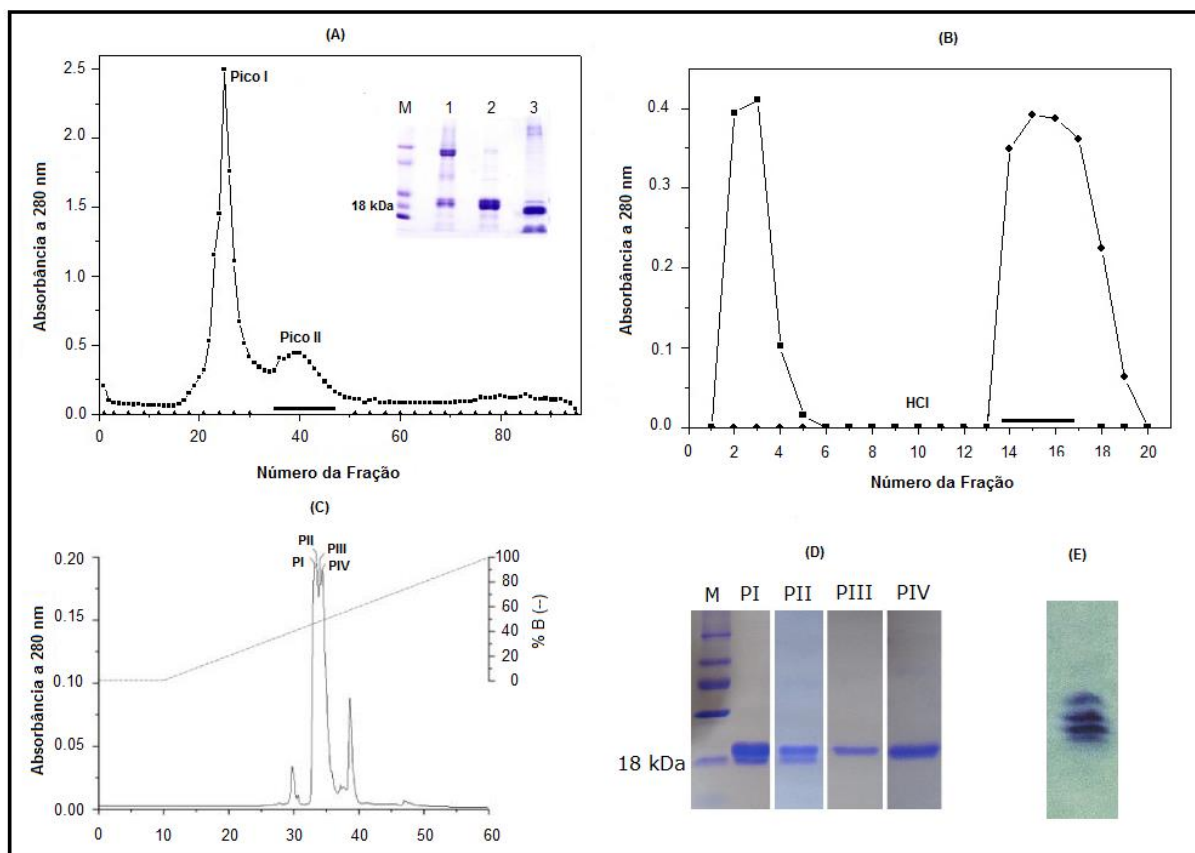
																									Identidade (%)		
AcKI	Q	V	F	D	T	E	G	N	G	I	R	N	G	G	T	Y	Y	I	L	P	D	R	W	G	K	G	
TI p20		V	F	D	T	E	G	N	P	I	R	N	G	G	T	Y	Y	V	L	P	V	I	R	G	K	G	80
KTI		V	F	D	T	E	G	N	P	I	R	N	G	G	T	Y	Y	V	L	P	V	I	R	G	K	G	80
p20 1		V	F	D	T	E	G	X	S	I	R	N	G	G	T	Y	Y	V	L	P	V	I	R	G	K	G	76
WTI 1 <sup>a</sup>				D	S	E	G	E	L	V	R	N	G	G	T	Y	Y	L	L	P	D	R	W				75
WTI 1B				D	S	E	G	E	L	V	R	N	G	G	T	Y	Y	L	L	P	D	R	W				75

**Tabela 2.** Parâmetros nutricionais de larvas de *A. kuehniella* alimentadas em dieta artificial contendo 0,5% de AcKI e em dieta controle, com AcKI. Abreviações: ECI: eficiência da conversão do alimento ingerido; ECD: eficiência da conversão do alimento digerido; DA: digestibilidade aparente; CM: custo metabólico.

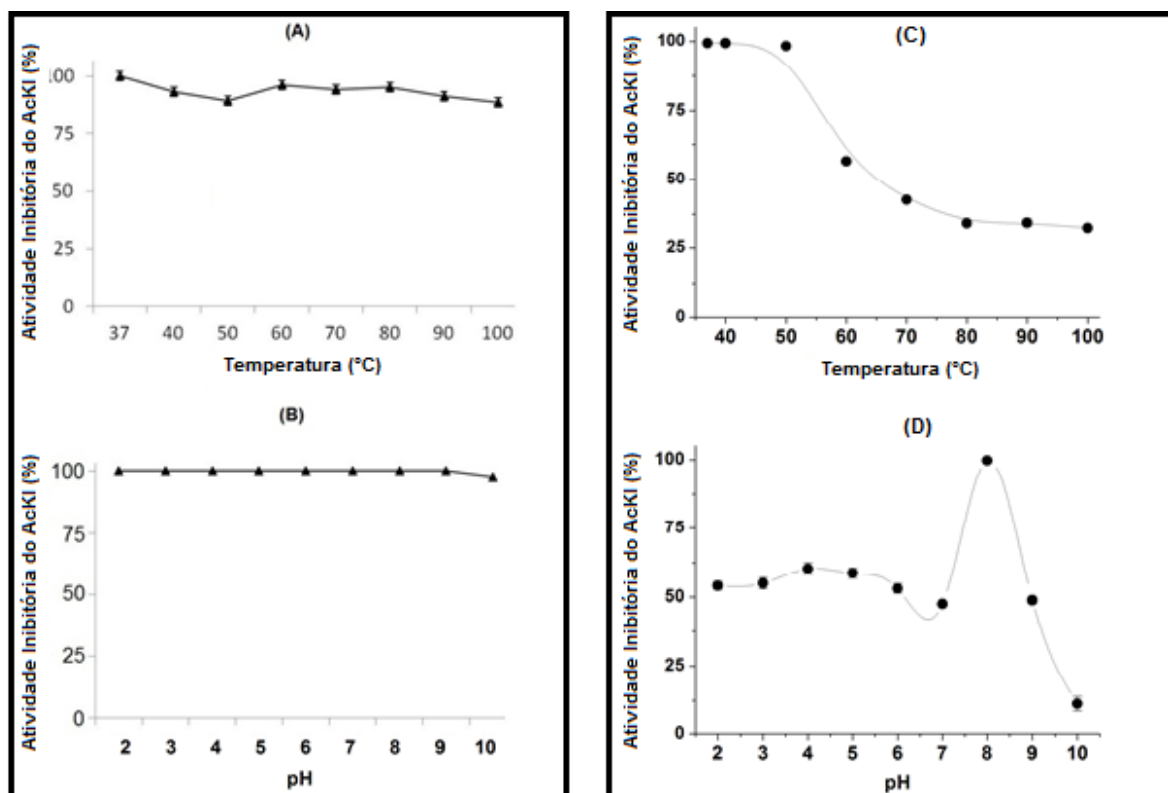
Parâmetros nutricionais	Terceiro ínstar		Quarto ínstar		Quinto ínstar	
	Controle	AcKI 0,5%	Controle	AcKI 0,5%	Controle	AcKI 0,5%
<b>ECI (%)</b>	6,8 ± 0,5 a	4,4 ± 0,5 b	6,2 ± 0,3 a	4,3 ± 0,5 b	7,6 ± 0,2 c	4,9 ± 0,9 b
<b>ECD (%)</b>	8,7 ± 1,1 a	4,8 ± 0,7 b	7,4 ± 0,4 a	5,0 ± 0,7 b	9,7 ± 0,3 c	5,7 ± 1,0 b
<b>DA (%)</b>	78,2 ± 5,1 a	93,3 ± 4,7 b	84,3 ± 0,9 c	87,7 ± 2,5 bd	77,6 ± 1,1 a	85,9 ± 1,0 d
<b>CM (%)</b>	91,3 ± 1,1 a	95,2 ± 0,7 b	92,6 ± 0,4 a	95,1 ± 0,7 b	90,3 ± 0,3 a	94,3 ± 1,0 b

Médias contidas na mesma linha apresentando letras iguais não possuem diferença significativa (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

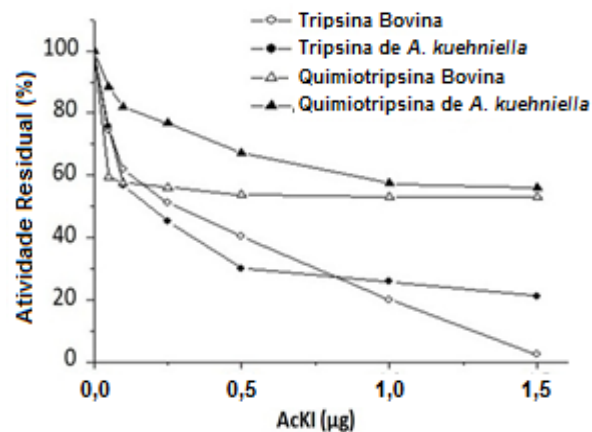
## Figuras



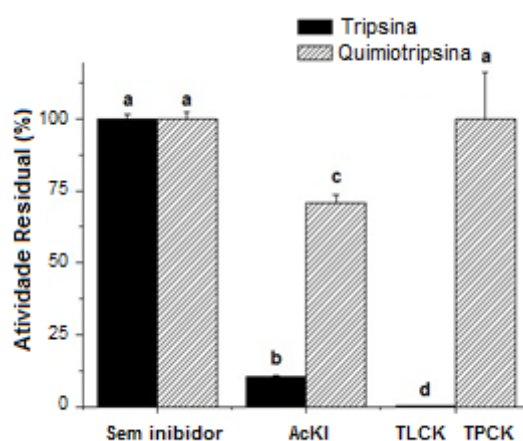
**Figura 1.** (A) Filtração em gel (Sephadex G-50) do extrato de sementes de *A. polyphylla*. O segundo pico contém atividade inibitória da tripsina; *insert*: análise em SDS-PAGE do extrato bruto (1), pico com atividade antitriptica da Sephadex G-50 (2) e AcKI parcialmente purificado, obtido do segundo pico da Sephadex G-50, reduzido com 0,1M de DTT (3), (M) marcadores moleculares. (B) Cromatografia de afinidade Sepharose-Tripsina do pico com atividade antitriptica obtido da Sephadex G-50. (C) Perfil de eluição para o fracionamento do RP-HPLC (coluna de hidrofobicidade C5) do AcKI e (D) análise em SDS-PAGE dos quatro principais picos (I, II, III, IV) do RP-HPLC. (E) Focalização isoelétrica do AcKI.



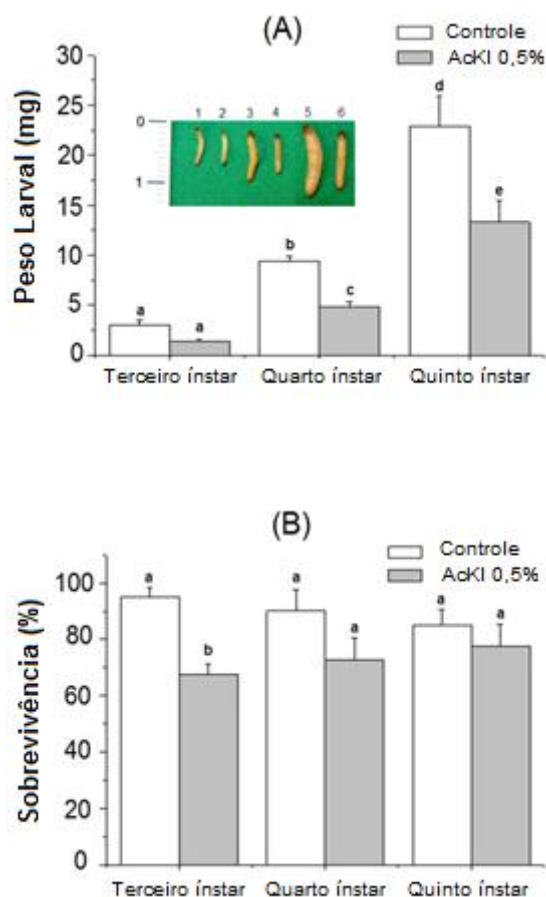
**Figura 2.** Estabilidade do AcKI. (A) Estabilidade térmica do AcKI, na concentração de 1 µg após incubação durante 30 minutos nas temperaturas indicadas. (B) Estabilidade ao pH do AcKI, na concentração de 1 µg, após incubação nos pHs indicados, a 37°C. (C) Estabilidade térmica do AcKI, na concentração de 0,1 µg após incubação durante 30 minutos nas temperaturas indicadas. (D) Estabilidade ao pH do AcKI, na concentração de 0,1 µg, após incubação nos pHs indicados, a 37°C. A atividade inibitória residual da tripsina foi mensurada usando BAPNA como substrato.



**Figura 3.** Inibição das enzimas digestivas de *A. kuehniella* e enzimas bovinas usando os substratos sintéticos, BAPNA para tripsina, BTPNA para quimotripsina bovina e SAAPPNA para quimotripsina de *A. kuehniella*. Todos os valores representam a média de triplicatas.

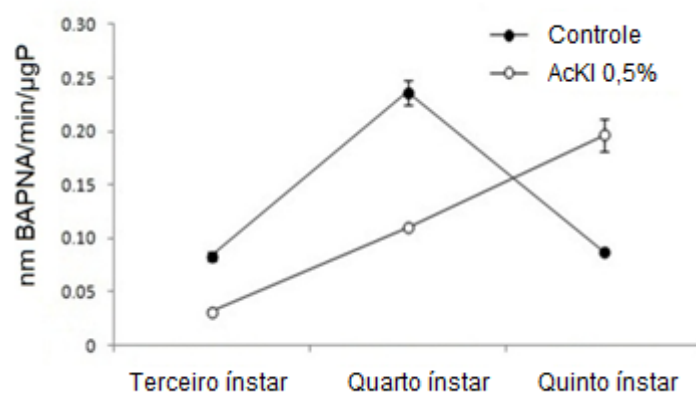


**Figura 4.** Inibição da tripsina e quimotripsina do intestino médio de *A. kuehniella* pelo AcKI e por inibidores sintéticos, TLCK (inibidor de tripsina) e TPCK (inibidor de quimotripsina).

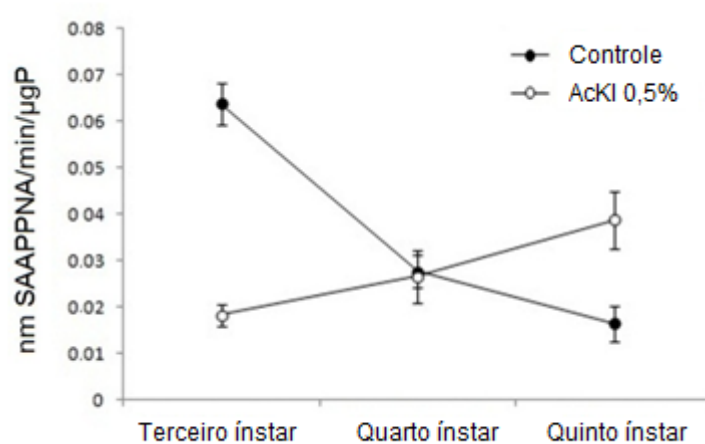


**Figura 5.** Efeito da dieta artificial contendo 0,5% de AcKI sobre o desenvolvimento de larvas de *A. kuehniella* de terceiro, quarto e quinto instar. (A) Peso larval; não houve diferença significativa apenas entre os tratamentos no terceiro instar ( $p < 0,05$ , teste de Tukey); *insert*: fotografia de larvas de *A. kuehniella*: (1, 3, 5) larvas de terceiro, quarto e quinto ínstar, respectivamente, alimentadas em dieta controle; (2, 4, 6) larvas de terceiro, quarto e quinto instar, respectivamente, alimentadas em dieta contendo AcKI. (B) Sobrevivência; houve diferença significativa apenas entre os tratamentos no terceiro-ínstar ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis).

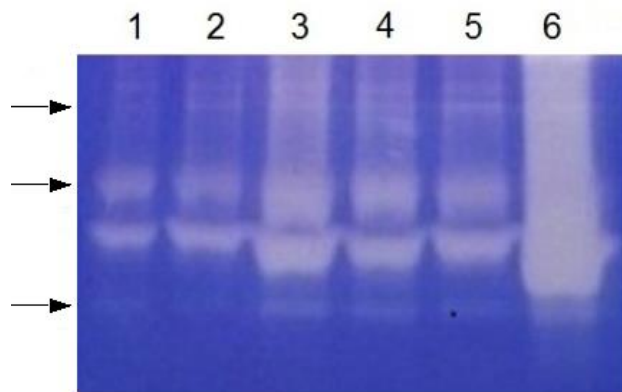




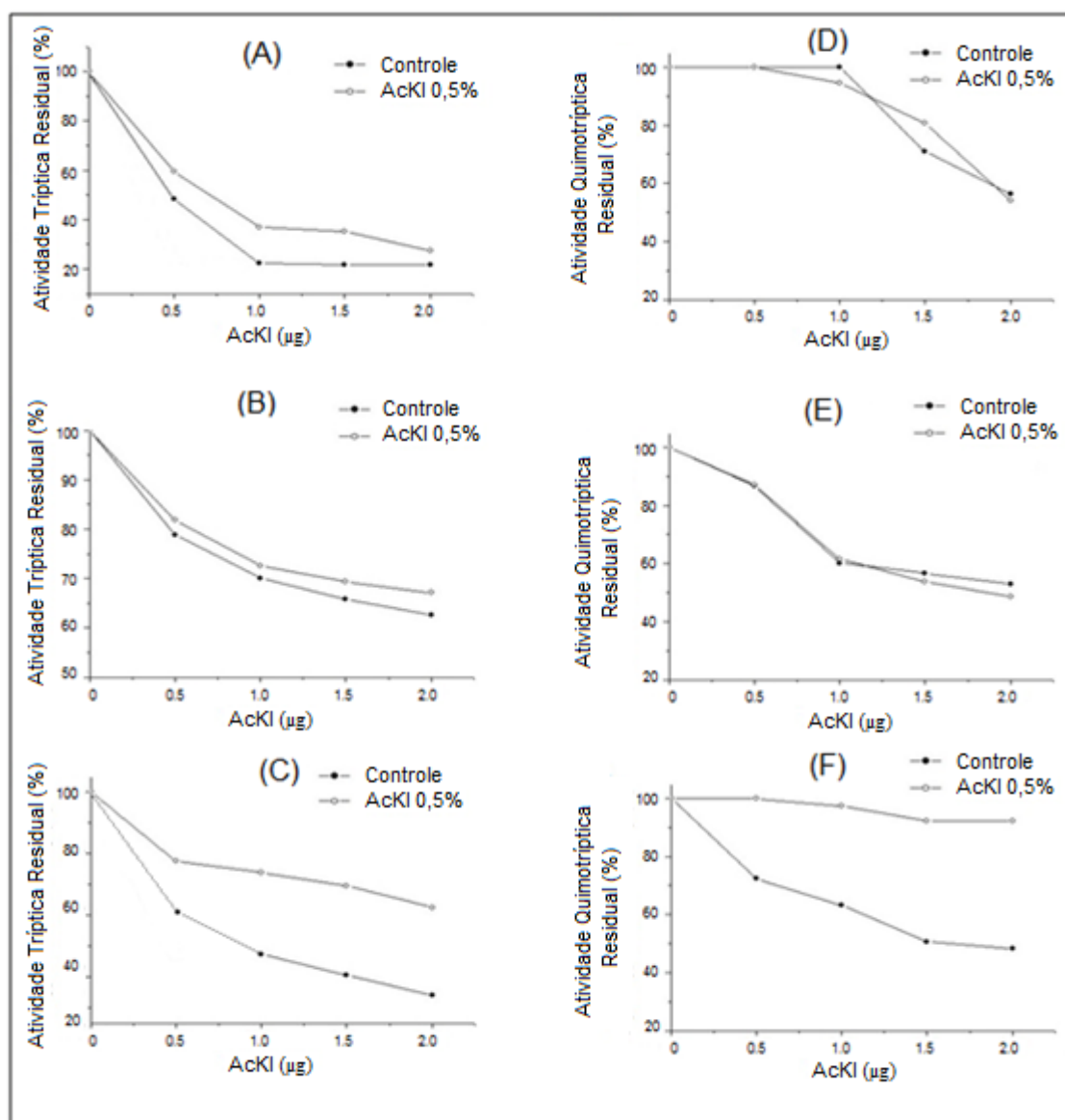
**Figura 6.** Atividade proteolítica da tripsina no extrato de intestino médio em larvas de terceiro, quarto e quinto ínstar, usando BAPNA como substrato.



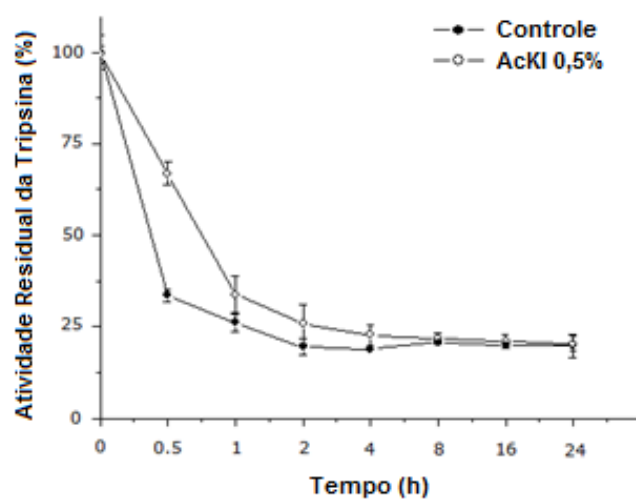
**Figura 7.** Atividade proteolítica da quimotripsina no extrato do intestino médio em larvas de terceiro, quarto e quinto ínstar, usando SAAPPNA como substrato.



**Figura 8.** SDS-PAGE contendo 0,1% de gelatina. (1) Extrato de intestino médio de larvas de terceiro ínstar alimentadas em dieta controle; (2) extrato de intestino médio de larvas de terceiro ínstar alimentadas em dieta contendo 0,5% de AcKI; (3) extrato de intestino médio de larvas de quarto ínstar alimentadas em dieta controle; (4) extrato de intestino médio de larvas de quarto ínstar alimentadas em dieta contendo 0,5% de AcKI; (5) extrato de intestino médio de larvas de quinto ínstar alimentadas em dieta controle; (6) extrato de intestino médio de larvas de quinto ínstar alimentadas em dieta contendo 0,5% de AcKI. A atividade proteolítica aparece como uma zona clara contra um fundo azul escuro. As setas, de baixo para cima, representam o peso molecular aproximado de 18 kDa, 34 kDa and 66 kDa, respectivamente.



**Figura 9.** Inibição pelo AcKI da atividade proteolítica do extrato de intestino médio de larvas de terceiro (A e D), quarto (B e E) e quinto ínstar (C e F) alimentadas em dieta artificial contendo 0,5% de AcKI e larvas alimentadas em dieta controle. A atividade proteolítica da tripsina foi ensaiada usando BAPNA como substrato, e da quimotripsina, usando SAAPPNA como substrato. Os valores representados são as médias de triplicata.



**Figura 10.** Inibição da atividade residual da tripsina de *A. kuehniella*, após incubação com AcKI durante 24 h a 30°C. No gráfico, pontos fechados e abertos representados, correspondem à atividade triptica do intestino médio de larvas alimentadas em dieta controle e dieta contendo 0,5% de AcKI, respectivamente. Cada ponto representa a média de triplicata.

## X - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse estudo, um novo inibidor de protease foi purificado, apresentando as características comuns aos inibidores do tipo Kunitz. Seu potencial inseticida foi avaliado através de bioensaios que revelaram um efeito evidente de redução de peso em larvas de *A. kuehniella* em baixas concentrações de inibidor. Outros efeitos sobre a fisiologia foram observados, incluindo efeitos negativos sobre os parâmetros nutricionais, possivelmente devido ao aumento da síntese enzimática em resposta à dieta contendo AcKI. Provavelmente a superprodução das enzimas do intestino médio inibidas pelo AcKI, levou a uma alta demanda energética e de aminoácidos para o organismo, o que prejudicou o desenvolvimento larval, provocando a estagnação do crescimento e a mortalidade de larvas, observadas no presente estudo. As enzimas do intestino médio de *A. kuehniella* foram incapazes de digerir o inibidor, sugerindo que essa é uma proteína que tem um efeito anti-nutricional sobre *A. kuehniella* e um alto potencial biotecnológico.

Como perspectiva futura, é interessante testar o efeito do AcKI sobre outros insetos-praga, a fim de avaliar o seu efeito inseticida e conhecer outros perfis de resposta a esse inibidor.

O controle de pragas na agricultura moderna está passando por um tipo de revolução. Está se afastando cada vez mais da dependência a pesticidas aplicados exogenamente e se aproximando de métodos menos prejudiciais ao meio ambiente. Essa mudança tem sido provocada devido a um conjunto de fatores, como pressão dos consumidores, fatores econômicos (agrotóxicos tem um alto custo para produtores) e altos níveis de resistência aos agrotóxicos comumente utilizados (GATEHOUSE, 2002). Neste contexto, ganha espaço estratégias biotecnológicas de controle, como plantas transgênicas expressando proteínas entomotóxicas. Dessa

forma, convém ressaltar, a ampla utilização em campo, de culturas geneticamente modificadas, apresentando a protoxina Bt de *Bacillus turingiensis*, que confere resistência a pragas. Com isso abre-se a possibilidade de explorar o potencial biotecnológico de toda a gama de mecanismo de defesa de plantas, para além da exploração da toxina bacteriana (GATEHOUSE, 2002).

Como já citado nesse trabalho, em 1987, Hilder e colaboradores obtiveram a primeira planta transgênica que expressava um gene de inibidor de proteinase. Eles construíram uma planta de tabaco contendo o gene que codifica pra o inibidor de proteinase serínica de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). Essas plantas que são susceptíveis ao inseto *Heliothis verescens* adquiriram altos níveis de resistência a este e, em estudos subsequentes, plantas resistentes foram obtidas contra insetos *Lacanobia oleracea* e *Otiorhynchus sulcatus* (GATEHOUSE e GATEHOUSE, 1998). Desde então, muitas outras plantas de interesse comercial foram transformadas, com êxito, utilizando-se genes de inibidores de proteinases. Algumas delas são apresentadas na tabela abaixo.

**Tabela 1.** Plantas transgênicas expressando genes para inibidores de proteinases.

PLANTA	GENES	INSETOS
Tabaco	CpTI Pot PI II CpTI NaPI	<i>Heliothis virescens</i> Lepidoptera <i>Heliothis virescens</i> <i>Helicoverpa punctigera</i>
Batata	CpTI	<i>Lacanobia oleracea</i>
Tomate	Pot PI I Pot PI II	<i>Helicoverpa armigera</i> <i>Teleogryllis commodus</i>
Arroz	CpTI Pot PI II	<i>Sesamia inferens</i> <i>Chilo suppressalis</i>
Morango	CpTI	<i>Otiorhynchus sulcatus</i>
Alface	Pot PI II	<i>Teleogryllus commodus</i>
Canola	OC-I CII	Coleoptera Lepidoptera, Diptera
Maçã	CpTI	<i>Cydia pomonella</i>
Álamo	OC-I CII	<i>Chrysomela tremulae</i> Lepidoptera

CpTI: Inibidor de Tripsina de Feijão-de-Corda; Pot PI II: Inibidor de Proteinase I de Batata; Pot PI II: Inibidor de Proteinase II de Batata; NaPI: Inibidor de Protease de *Nicotiana glauca*; OC-I: Inibidor de Cisteína de Arroz; CII: Inibidor de Protease Serínica de Soja. Fonte: <http://www.biotechnologia.com.br/revista/bio11/resisten.pdf>

Além disso, há poucos estudos sobre inibidores de proteinases provenientes da nossa flora, apesar da riqueza de espécies vegetais encontradas no Mato Grosso do Sul. Considerando que essas proteínas são importantes para o mecanismo de defesa da planta contra insetos, fungos e nematóides, convém ressaltar a importância de estudos sobre a descrição de técnicas que possibilitem o isolamento desses produtos (PAES *et al.*, 2002). A descoberta de proteínas vegetais com

potencial inseticida contribui para valorização das potencialidades da flora do Centro-Oeste.

#### **4.1 Literatura Citada**

GATEHOUSE, J. A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*, v. 156, p. 145-169. 2002.

PAES, N. S.; LIMA, J. N.; OSÓRIO, R.; MONTEIRO, A. C. S.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Uso de chagasina, um inibidor de cisteíno-proteinase de *Trypanosoma cruzi*, na produção de feijão resistente a caruncho. Encontro de talento estudantil. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 7:48. Brasília, DF. 2002.

FRANCO, O. L.; MELO, F. R.; SILVA, M. C. M.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Resistência de plantas a insetos. Inibidores de enzimas digestivas e a obtenção de plantas resistentes. Brasília, DF: Revista Biotecnologia ciência e desenvolvimento. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio11/resisten.pdf>. Acesso em 15 jan. 2013.