

Carlos Eduardo Maia Gomes

Purificação, Caracterização e Atividade
Bioinseticida de um Inibidor de Tripsina de
Sementes de *Crotalaria pallida*

Natal/RN
2004

Carlos Eduardo Maia Gomes

Purificação, Caracterização e Atividade
Bioinseticida de um Inibidor de Tripsina de
Sementes de *Crotalaria pallida*

Dissertação apresentada à Universidade
Federal do Rio Grande do Norte como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Bioquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Maurício Pereira de Sales

Natal/RN

2004

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Norte como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Maurício Pereira de Sales

Aos meus pais, Ieda e Diderot,
A minha irmã Joelma,
Aos tios Sebastião e Francisco,
E a Telma, minha companheira.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o. Dr. Maurício Pereira de Sales, pela orientação, apoio e amizade nesse curso de mestrado.

Às professoras componentes da Banca de Defesa, Dra. Márcia Soares Vidal e Prof^a Dra. Regina de Fátima dos Santos Braz, pela análise e contribuições importantes a este trabalho.

Aos professores membros da Banca de Qualificação Prof^o Dr. Eliseu dos Santos e Prof^o Dr. Luiz de Abreu pela avaliação criteriosa, pertinente e muito valiosa deste trabalho.

Aos meus pais e minha irmã, pelo apoio incondicional e estímulo, sem os quais não teria forças para seguir em frente.

A Telminha, meu amor, sempre compreensiva e carinhosa... uma luz no meu caminho.

A meus tios, Sebastião e Francisco Maia, meus guias, por me colocarem no caminho certo.

Ao Prof^o. Dr. Paulo Marinho do Departamento de Biologia Celular e Genética, pelos ensinamentos e estímulo durante este trabalho.

À Prof^a Dra. Márcia Vidal do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão, pela ajuda com os insetos *Anthonomous grandis*, *Alabama argillacea* e *Spodoptera frugiperda*.

Aos meus caríssimos amigos Aulus Barbosa, Bruno Maggi, Kelly, Patrícia Mesquita, Thiago Sanna e Wagner Moreira, pelo incentivo, pelo carinho e por me suportar, além dos amigos da confraria, Prof.º Alexandre Queiroz, Fabiano Teixeira, Ivan Rui e Raniere Moura, pelo apoio nos piores momentos e por compartilharem os melhores.

Aos amigos do Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas: Adeliana Oliveira (mamãe), Leonardo Macedo, Gioconda Moura, Renato Sousa, Gláucia Pollyana, Juliana Galvão e Christina Iglesias, pelos ensinamentos, ajuda e carinho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica, por me receberem tão bem no Departamento e por tudo o que aprendi.

Ao Rubens pela identificação da espécie de *Crotalaria* com que trabalhamos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Pesquisa pelas contribuições ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS	11
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. RELAÇÕES PRAGAS/PATÓGENOS E PLANTAS:	15
1.2. DEFESA DE PLANTAS CONTRA INSETOS-PRAGA:	17
1.3. PROTEASES, PROTEINASES E SEUS INIBIDORES:	18
1.3.1. <i>Proteases e proteinases:</i>	18
1.3.2. <i>Proteinases digestivas de insetos</i>	19
1.3.3. <i>Inibidores de proteinases em plantas:</i>	21
1.4. O GÊNERO CROTALARIA:.....	25
2. OBJETIVOS.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 MATERIAIS	28
3.1.1 <i>Sementes de Crotalaria pallida</i>	28
3.1.2 <i>Insetos</i>	28
3.1.3 <i>Equipamentos</i>	29
3.1.4 <i>Reagentes</i>	29
3.2 MÉTODOS	30
3.2.1. <i>Preparação dos extratos proteicos de sementes de C. pallida</i>	30
3.2.1.1. Preparação de extrato bruto	30
3.2.1.2. Fracionamento protéico por sulfato de amônio.....	30
3.2.2. <i>Determinação de proteínas</i>	30
3.2.3. <i>Preparo das soluções usadas como substrato</i>	31
3.2.4. <i>Determinação da atividade antitriptica</i>	31
3.2.5. <i>Isolamento e purificação do Inibidor de tripsina</i>	32
3.2.5.1. Cromatografia de afinidade Tripsina-Sepharose 4B	32
3.2.5.2. Precipitação com ácido tricloroacético (TCA) de ITC	33
3.2.6. <i>Caracterização Bioquímica de ITC</i>	33
3.2.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-redutoras, contendo SDS (SDS-PAGE).	33
3.2.6.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras, contendo SDS (SDS-PAGE) e beta-mercaptoetanol.....	35
3.2.6.3. Seletividade de ITC para outras proteinases.....	35
3.2.6.4. Determinação do mecanismo e da constante de inibição.....	37
3.2.6.5. Estabilidade em diferentes pHs	38
3.2.6.6. Estabilidade térmica	38
3.2.7. <i>Atividades bioinseticidas in vitro e in vivo de ITC</i>	39
3.2.7.1. Ensaio in vitro de inibição de proteinases intestinais de diversos insetos pragas	39
3.2.7.2. Bioensaio para moscas das frutas (<i>C. capitata</i>)	40
3.2.7.3. Bioensaio para o bruquídeo do feijão-de-corda (<i>C. maculatus</i>).....	41
4. RESULTADOS.....	42
4.1. ISOLAMENTO DO INIBIDOR DE TRIPSINA DE SEMENTES DE C. PALLIDA	42
4.1.1 <i>Determinação da atividade anti-tríptica das frações protéicas de sementes de C. pallida</i>	42
4.2. ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA NA PRESENÇA DE SDS (SDS-PAGE) DAS FRAÇÕES PROTEICAS E CROMATOGRÁFICAS DE SEMENTES DE C. PALLIDA.....	44
4.3. TABELA DE PURIFICAÇÃO DE ITC	46
4.4. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE ITC	46
4.4.1. <i>Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) de ITC tratado com agente redutor β-mercapto etanol</i>	46

4.4.2. Atividade inibitória sobre tripsina e outras enzimas serínicas e cisteínicas:.....	47
4.4.3. Estabilidade térmica de ITC:	48
4.4.4. Estabilidade de ITC a diferentes pHs:.....	49
4.4.5. Mecanismo de inibição de ITC	49
4.5. ATIVIDADE BIOINSETICIDA IN VITRO E IN VIVO DE ITC	51
4.5.1. Atividade inibitória in vitro contra extratos intestinais de diversos insetos-praga: ...	51
4.5.2 Atividade bioinseticida in vivo sobre larvas de <i>C. capitata</i> :.....	52
4.5.4 Atividade bioinseticida in vivo sobre larvas de <i>C. maculatus</i>	53
5. DISCUSSÃO	54
6. CONCLUSÕES	61
7. BIBLIOGRAFIA	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Espécimen de <i>Crotalaria pallida</i>	23
Figura 2	Inibição da atividade da tripsina sobre o substrato BAPNA pelas frações protéicas de sementes <i>C. pallida</i>	40
Figura 3	Cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose CL 4B da F2 de sementes de <i>C. pallida</i> .	41
Figura 4A	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% na presença de SDS das amostras protéicas de sementes de <i>C. pallida</i>	43
Figura 4B	Determinação da massa molecular aparente de ITC a partir de sua migração em gel de poliacrilamida a 15% contendo SDS	43
Figura 5	Eletroforese em gel de poliacrilamida a 25% de ITC tratado e não tratado com β -mercaptoetanol	45
Figura 6	Atividade inibitória de ITC após tratamento em temperaturas variando de 37 a 100°C	46
Figura 7	Estabilidade de ITC em diferentes pHs	47
Figura 8	Inibição da atividade tripsínica por ITC	48
Figura 9	Determinação do valor de K_i de ITC contra tripsina	49
Figura 10	Determinação do WD_{50} da fração rica em ITC de sementes de <i>C. pallida</i> para larvas de <i>C. maculatus</i>	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Insetos-praga e suas respectivas plantas-alvo	14
Tabela 2	Famílias de proteinases	16
Tabela 3	Inibidores de proteinases de plantas	20
Tabela 4	Etapas de purificação de ITC	44
Tabela 5	Especificidade de inibição de ITC para enzimas do tipo serínicas e cisteínicas	46
Tabela 6	Inibição da atividade de enzimas proteolíticas intestinais de insetos-praga	50
Tabela 7	Massa de larvas de <i>C. capitata</i> submetidas a dieta contendo concentrações crescentes de ITC	50

LISTA DE ABREVIATURAS

TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
BAPNA	α -benzoil-DL-arginina- ρ -nitroanilida
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
DMSO	Dimetilsulfóxido
kDa	Quilodaltons
TCA	Ácido Tricloroacético
mg	Miligrama
mL	Mililitro
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro
M	Molar
mM	Milimolar
Min	Minuto
nm	Nanômetro
UI	Unidade de inibição
°C	Graus Celcius
[S]	Concentração de substrato
Vmax	Velocidade máxima
Ki	Constante de inibição
ND	Não detectado
ITC	Inibidor de Tripsina de <i>Crotalaria pallida</i>
WD ₅₀	Porcentagem de inibidor na dieta que causa perda de 50% da massa das larvas

RESUMO

Um inibidor de proteinase foi isolado de sementes de *Crotalaria pallida* por fracionamento com sulfato de amônio, cromatografia de afinidade em Sepharose com tripsina acoplada e precipitação com ácido tricloroacético (TCA). O inibidor de tripsina, denominado ITC, possui massa molecular de 32,5 kDa determinada por SDS-PAGE e é composto por duas subunidades, uma de 25,7 e outra de 5,6 kDa, ligadas por pontes dissulfeto; uma característica típica da família de inibidores de Kunitz. ITC foi estável até 50°C e a 100°C sua atividade residual foi cerca de 60%. ITC também foi estável em valores de pHs variando de 2 a 12. A inibição da tripsina por ITC é do tipo não-competitivo, com um K_i de $8,8 \times 10^{-7}M$. ITC inibe fracamente outras proteinases serínicas como quimotripsina e elastase. A inibição da papaína (44%), uma proteinase cisteínica, foi indicativa da bifuncionalidade de ITC. Ensaio *in vitro* contra proteinases digestivas de vários insetos praga das ordens Lepidoptera, Diptera e Coleoptera foram realizados. ITC inibiu em cerca de 100% enzimas digestivas de *Ceratitis capitata* (mosca-das-frutas), *Spodoptera frugiperda* (lagarta do cartucho do algodão), e *Alabama argillacea* (curuquerê do algodão). ITC também inibiu em 74,4% enzimas digestivas de *Callosobruchus maculatus* (broca do feijão) uma praga da ordem Coleoptera. ITC, quando adicionado a dietas artificiais, afetou fracamente o desenvolvimento de larvas de *C. capitata* e teve um WD_{50} de 2,65% contra larvas de *C. maculatus*.

ABSTRACT

A proteinaceous trypsin inhibitor was purified from *Crotalaria pallida* seeds by ammonium sulphate fractionation, affinity chromatography on immobilized Trypsin-Sepharose and TCA precipitation. The trypsin inhibitor, named ITC, had Mr of 32.5 kDa by SDS-PAGE and was composed by two subunits with 27.7 and 5.6 kDa linked by disulphide bridges, a typical characteristic of Kunitz-Inhibitor family. ITC was stable until 50°C, and at 100°C its residual activity was of about 60%. Also, ITC was stable at pHs 2 to 12. The inhibition of trypsin by ITC was non-competitive, with a K_i of $8,8 \times 10^{-7}$ M. ITC inhibits weakly other serine proteinases such as chymotrypsin and elastase. The inhibition of papain (44% of inhibition), a cysteine proteinase was an indicative of the bi-functionality of ITC. *In vitro* assays against digestive proteinases from several Lepdoptera, Diptera and Coleoptera pests were made. ITC inhibited in 100% digestive enzymes of *Ceratitis capitata* (fruit fly), *Spodoptera frugiperda* and *Alabama argillacea*, the last one being a cotton pest. It also inhibited in 74.4% *Callosobruchus maculatus* (bean weevil) digestive enzymes, a Coleoptera pest. ITC, when added in artificial diet models, affected weakly the development of *C. capitata* larvae and it had a WD_{50} of 2.65% to *C. maculatus* larvae.

1. INTRODUÇÃO

A base da alimentação humana é compreendida por alimentos de origem vegetal, principalmente cereais e leguminosas. O aumento da população mundial demanda concomitante incremento da produção de alimentos em escala global. Levando-se em consideração que o aumento da quantidade de terra disponível para o cultivo poderá causar um impacto sério no meio ambiente e nos recursos naturais, se fazem necessárias novas tecnologias que promovam maior produção sem aumentar a área plantada, além de proporcionar alimentos de melhor qualidade nutricional, resistentes a pragas e patógenos e a processos abióticos (ex., salinidade, seca, etc). As perdas na produção da agricultura mundial, devido ao ataque de pragas e patógenos, chegam a 70% da produção sem o uso de inseticidas, e os inseticidas, além dos danos causados ao meio ambiente e ao homem, têm aumentado a resistência dos insetos, pois 15% da produção é perdida, a despeito do uso de agrotóxicos (KRATTIGER, 1997). Genes heterólogos de plantas ou de bactérias são introduzidos em plantas cultivadas visando à produção de plantas resistentes a estresses bióticos e abióticos. O uso de plantas modificadas geneticamente remonta ao ano 1987, quando genes de inibidores de proteinase e de toxina botulínica foram inseridos em plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (HILDER *et al.*, 1987; VAECK *et al.*, 1987; BARTON *et al.*, 1987). Atualmente, há milhões de hectares em áreas cultivadas com diversas espécies de plantas modificadas geneticamente. Culturas modificadas como as de soja, algodão, tabaco, batatas e milho são plantadas e colhidas anualmente em muitos países, inclusive nos Estados Unidos (28,7 milhões de hectares em 1999), Canadá (4,0 milhões), China (0,3 milhões) e Argentina (6,7

milhões) (JAMES, 1999). Seis países (Argentina, Brazil, Canada, China, África do Sul e Estados Unidos), quatro culturas (milho, soja, canola e algodão) e duas características (resistência a insetos e tolerância a herbicidas) foram responsáveis por 99% da área global plantada de culturas transgênicas em 2002 (SOFA – FAO, 2004). Neste contexto, a busca de genes e produtos gênicos que possam ser utilizados na biotecnologia de modificação genética tem sido amplamente estimulada. Entretanto, há um debate acirrado sobre potenciais benefícios e riscos que possam resultar do uso de organismos modificados geneticamente na agricultura.

1.1. Relações pragas/patógenos e plantas:

A agricultura moderna é baseada no sistema de monoculturas, cultivadas em grandes extensões de terra, e isso proporciona que as espécies de insetos monófagos, que se alimentam apenas de uma determinada espécie de planta, se propaguem rapidamente em um ambiente farto em alimento. As pragas e os patógenos (nematódeos, fungos, bactérias e vírus) são responsáveis por grandes perdas na agricultura, pois causam injúrias e doenças, além de se alimentarem dos tecidos de plantas. Os insetos e principalmente suas larvas atacam preferencialmente folhas e sementes (BRZIN *et al.*, 1995). Para deter a herbivoria das pragas, as plantas desenvolveram mecanismos de resistência aos insetos, fazendo com que apenas um número limitado destes fosse capaz de suplantar tal resistência (JONGSMA & BOLTER, 1997, SCHULER *et al.*, 1998). A tabela 1 lista

exemplos da relação insetos-praga e suas respectivas plantas-alvo, plantas essas de interesse econômico para o Nordeste do Brasil.

Tabela 1: Insetos-praga e suas respectivas plantas-alvo:

Espécie	Ordem	Família	Planta-alvo	Bibliografia
<i>Anthonomus grandis</i>	Coleoptera	Curculionidae	<i>Gossypium sp</i> (algodão)	HAYNES e SMITH, 1992
<i>Ceratitis capitata</i>	Diptera	Tephritidae	Várias culturas de importância econômica Ex. Mamoeiro (<i>Carica papaya</i>).	CASTILLO <i>et al.</i> , 2000
<i>Zabrotes subfaciatus</i>	Coleoptera	Bruchidea	<i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão comum) <i>Vigna unguiculata</i> (feijão de corda)	XAVIER-FILHO, 1992
<i>Callosobruchus maculatus</i>	Coleoptera	Bruchidea	<i>Vigna unguiculata</i> (feijão de corda)	XAVIER-FILHO, 1992
<i>Alabama argillacea</i>	Lepidoptera	Pyralidae	<i>Gossypium sp</i> (algodão)	http://www.cnpa.embrapa.br/algodao/arboreopragas.html
<i>Diatraea Saccharalis</i>	Lepidoptera	Crambidae	<i>Saccharum officinarum</i> (cana-de-açúcar)	OGUNWOLU <i>et al.</i> , 1991

Quando foram domesticadas, as plantas perderam ou tiveram reduzida sua capacidade de sintetizar algumas de suas moléculas de defesa (BENREY *et al.*, 1998). Outro fato importante foi a co-evolução dos insetos teorizada por EHRLICH & RAVEN (1964), que preconizou que a produção e o acúmulo de uma toxina pela planta eram seguidos de uma resposta do predador, tal como a detoxificação ou a excreção da toxina pelo mesmo, o que o capacitava a alimentar-se da planta alvo. Desta maneira, ocorreu a adaptação da planta seguida por uma contra-adaptação do predador, havendo alternância da espécie com maior sucesso (ora plantas defendendo-se ou ora insetos atacando), durante a escala evolutiva de tempo.

Atualmente, genes que conferem resistência a insetos podem ser introduzidos em plantas de interesse para reduzir suas susceptibilidades.

Esses genes podem ser isolados de plantas selvagens ou de bactérias (SCHULER *et al.*, 1998; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002). Genes e/ou produtos gênicos de interesse como os inibidores de proteinases, que atuam naturalmente como compostos de defesa de plantas contra insetos, são potenciais candidatos como ferramentas na obtenção de plantas cultivadas resistentes. De fato, um grande número de plantas de interesse comercial já foi transformado com genes de inibidores de proteinases provenientes de outras plantas (HILDER *et al.*, 1987; JOUANIN *et al.*, 1998; SCHULER *et al.*, 1998) Estes inibidores protéicos têm suas atividades baseadas na capacidade de ligação, de modo estável, ao sítio ativo das proteinases digestivas dos insetos, inibindo assim a atividade enzimática (LASKOWSKI & KATO, 1980).

1.2. Defesa de plantas contra insetos-praga:

Há muitos anos, vêm sendo estudadas a biossíntese e a regulação de compostos químicos associados aos mecanismos de defesas das plantas. Inicialmente, essas substâncias químicas foram consideradas como sendo compostos secundários, os quais não tinham suas funções bem estabelecidas (JANZEN *et al.*, 1977; JANZEN *et al.*, 1986). Atualmente, sabe-se que essas moléculas são encontradas em vários tecidos vegetais, na forma de componentes constitutivos, fazendo parte do plano de desenvolvimento normal da planta (ROSENTHAL & JANZEN, 1979) ou componentes induzidos, sendo sintetizados em resposta ao ataque de pragas ou patógenos (HILDEBRAND *et al.*, 1986; XAVIER-FILHO, 1993). Entre esses compostos, estão incluídos antibióticos, alcalóides, terpenos e as proteínas de defesa. Dentre estas

substâncias de natureza protéica, estão incluídas: lectinas, inibidores de proteinases, inibidores de α -amilases, quitinases, proteínas inativadoras de ribossomos, entre outras (RYAN, 1990; BARBIERI, *et al.*, 1993; COHEN, 1993, PEUMANS & VAN DAMME, 1995).

1.3. Proteases, proteinases e seus inibidores:

1.3.1. Proteases e proteinases:

O termo protease é a denominação geral para todas as proteínas com atividade proteolítica. As proteases são divididas em endopeptidases, quando hidrolisam ligações peptídicas internas, e exopeptidases, quando hidrolisam ligações N-terminais ou C-terminais. As endopeptidases são também denominadas proteinases (RYAN *et al.*, 1981). As proteinases são classificadas, de acordo com a União Internacional de Bioquímica, em quatro grandes classes: proteinases serínicas; cisteínicas; aspárticas e metalo-proteinases. O sistema de classificação (Tabela 2) baseou-se em uma comparação entre sítios ativos, mecanismos de ação e estrutura tridimensional das proteinases (NEURATH, 1996).

Tabela 2: Famílias de proteinases

Famílias	Proteinases
Proteinase Serínica I	Quimotripsina Tripsina Elastase
Proteinase Serínica II	Subtilisina
Proteinase Cisteínica	Papaína Actidina Catepsinas B e H Caspases
Proteinases Aspárticas	Penicilopepsina <i>Rhizopus chinesis</i> e <i>Endothia parasitica</i> Proteinases ácidas Renina
Metalo-proteinases I	Carboxipeptidase bovina A
Metalo-proteinases II	Termolisina

As proteases são ubíquas, sendo encontradas desde bactérias até seres humanos, passando por nematódeos, fungos, plantas e animais invertebrados (MINAGAWA *et al.*, 1997; FAISAL *et al.*, 1998; SYNTICHAKI *et al.*, 2002; TANSKUL *et al.*, 2003; NG, 2004) e estão envolvidas em diversos processos metabólicos.

Em plantas, as proteinases participam dos processos de liberação de aminoácidos livres nos órgãos de reserva de plantas (XAVIER-FILHO, 1993), na regulação da apoptose (SOLOMON *et al.*, 1999; LAM *et al.*, 1999), regulação da fotossíntese (ESTELLE, 2001), regulação da expressão gênica (ADAM, 2000) e defesa da planta contra pragas e patógenos (TORNERO *et al.*, 1997). A expressão das proteinases pode ser constitutiva ou induzida (TORNERO *et al.*, 1997, VAN DER HOORN & JONES, 2004).

Em animais, as proteinases são utilizadas na maioria das funções acima relacionadas e também nos processos digestivos das proteínas adquiridas na dieta animal.

1.3.2. Proteinases digestivas de insetos

Os insetos obtêm muitos dos aminoácidos essenciais, utilizando proteinases extracelulares que atuam no lúmen de seus intestinos (HOUSEMAN & DOWNE, 1983; MURDOCK *et al.*, 1986). No início do processo digestivo, os insetos fitófagos (Diptera, Lepidoptera, principalmente) produzem secreções salivares que são misturadas aos tecidos da planta que foram sugados, ainda dentro da cavidade bucal (CHAPMAN *et al.*, 1985). Estas

secreções são importantes porque umedecem o bolo alimentar, facilitando sua passagem através do esôfago.

Os coleópteros não possuem glândulas salivares bem desenvolvidas (WIGGLESCOORTH *et al.*, 1972) e não existem estudos comprovando a presença de proteinases salivares nos mesmos. O material ingerido pelo inseto passa subseqüentemente através do intestino anterior, chegando então ao intestino médio, onde os níveis de proteinases são muito altos, ocorrendo nesse local a digestão de proteínas (TERRA *et al.*, 1990). No intestino posterior e no material fecal dos insetos, são encontrados baixos níveis de proteinases, o que sugere a existência de um mecanismo de recirculação ou recuperação das enzimas digestivas dos mesmos (TERRA *et al.*, 1979).

Os insetos geralmente possuem diferentes tipos de proteinases. As mais bem estudadas são as proteinases serínicas, as quais são muito freqüentes em uma grande variedade de classes de insetos da ordem Diptera, Lepdoptera e Himenoptera, e se assemelham à tripsina e à quimotripsina de mamíferos (APPLEBAUM *et al.*, 1985). Várias espécies de diferentes ordens foram estudadas e revelaram a presença principalmente de proteinases serínicas intestinais: em insetos da ordem Ortoptera, em *Locusta migratoria* (LAM *et al.*, 1999, 2000); Na ordem Lepidoptera, *Lacanobia oleracea* (GATEHOUSE *et al.*, 1999), *Ostrinia nubilalis* (BERNARDI *et al.*, 1996); Nos hemípteros, *Nilaparvata lugens* (FOISSAC *et al.*, 2002); *Creotinades diluttus* (COLEBATCH *et al.*, 2001); *Lygus hesperus* (ZENG *et al.*, 2002); Em insetos coleópteros, *Tenebrio molitor*, *Pyrearinus termitilluminans* e *Pheropsophus aequinoctialis* (TERRA & CRISTOFOLETTI, 1996); *Prostephanus truncatus* (VÁSQUEZ-ARISTA *et al.*, 1999); *Melolontha melolontha* (WAGNER *et al.*, 2002) e na

ordem Diptera: *Chrysomya bezziana* (MUHARSINI *et al.*, 2001), *Phlebotomus papatasi* (RAMALHO-ORTIGÃO *et al.*, 2003), *Stoxomys calcitrans* (MOFFAT *et al.*, 1995), *Lucilia Cuprina* (CASU *et al.*, 1994), *Anopheles gambiae* (MULLER *et al.*, 1993) e *Ceratitis capitata* (SILVA, 2003).

As proteinases cisteínicas também são enzimas digestivas importantes para os insetos, principalmente daqueles que se alimentam de sementes (MURDOCK *et al.*, 1987; SILVA & XAVIR-FILHO, 1991). Muitos coleópteros como o besouro da batata do Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, possuem grandes concentrações de proteinases cisteínicas. Os carunchos *Callosobruchus maculatus*, que atacam sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), e *Zabrotes subfasciatus*, que atacam sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), possuem grandes quantidades de proteases cisteínicas em seus tratos digestivos (MURDOCK *et al.*, 1987; SILVA & XAVIER-FILHO, 1991; LEMOS *et al.*, 1990; GRUDEN *et al.*, 1998).

1.3.3. Inibidores de proteinases em plantas:

Muitas famílias de plantas possuem inibidores de proteinases distribuídos em diversos órgãos, sendo sua expressão constitutiva (órgãos reprodutivos, órgãos de reserva e tecidos vegetativos) ou induzida (resposta à herbivoria, patógenos, injúria mecânica e estresse abiótico) (SHEWRY & LUCAS, 1997, CHEN *et al.*, 2004). A maioria destes inibidores são moléculas pequenas, estáveis, abundantes e de fácil purificação. Eles podem atuar como proteínas de reserva, como reguladores de enzimas endógenas, na regulação do processo de morte celular programada (apoptose) e estão diretamente

envolvidos nos processos de defesa de plantas contra o ataque de pragas e/ou patógenos (XAVIER-FILHO, 1993; VALUEVA *et al.*, 1998; WALKER *et al.*, 1997; SOLOMON *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2000).

Quatro classes de inibidores de proteinases foram estabelecidas de acordo com suas atividades específicas: inibidores de proteinases serínicas; de proteinases cisteínicas; aspárticas e de metalo-proteinases. O número de inibidores de proteinases de plantas identificados e isolados é grande, sendo os inibidores de proteinases serínicas, os que apresentam melhor caracterização (RYAN, 1990). Nos últimos anos, entretanto, muitos inibidores de proteinases cisteínicas também foram caracterizados (BODE & HUBER, 1992; OLIVEIRA, *et al.*, 2003). Os inibidores de metalo-proteinases e de proteinases aspárticas de plantas estão sendo estudados ainda em menor escala (BARRET 1986; TURK 1991). Em plantas, os inibidores de proteinases são agrupados em famílias (Tabela 3), sendo a classe dos inibidores de proteinases serínicas composta por sete famílias e as demais compreendem apenas uma família cada.

Tabela 3: Inibidores de proteinases de plantas.

CLASSES	FAMÍLIAS	BIBLIOGRAFIA
<i>Inibidores de proteinases serínicas</i>	Inibidor de tripsina de soja (Kunitz) Inibidor de Bowman-Birk Inibidor de tripsina de cevada Inibidor de batata I Inibidor de batata II Inibidor de abóbora Inibidor bifuncional de milho/Ragi I-2	GARCIA-OLMEDO <i>et al.</i> , 1987; RYAN, 1990; SHIVARAJ & PATTABIRAMAN, 1981;
<i>Inibidores de metalo-proteinases</i>	Inibidor de carboxipeptidase A, B.	KEILOVA & TOMASEK, 1977; HAAS & RYAN, 1981
<i>Inibidores de proteinases cisteínicas</i>	Inibidor de proteinase cisteínica (fitocistatinas)	ABE <i>et al.</i> , 1987; ABE & WHITAKER, 1988
<i>Inibidores de proteinases aspárticas</i>	Inibidor de proteinase aspártica	MARES <i>et al.</i> , 1989

1.3.3.1. Inibidores de proteinases serínicas:

Inibidores de proteinases serínicas foram detectados inicialmente em órgãos de reserva de plantas como sementes e tubérculos, e posteriormente em folhas e frutos (XAVIER-FILHO, 1993; ARAÚJO *et al.*, 2004). Entretanto, proteinases serínicas não participam da proteólise de proteínas de reserva e, por esse motivo, os inibidores serínicos não possuem a função de regulação da quebra de proteínas de reserva em sementes (REECK *et al.*, 1997). Por outro lado, trabalhos mostram a expressão de inibidores serínicos em resposta a ataques de pragas e patógenos (PENG & BLACK, 1976; ROBY, *et al.*, 1987). A maioria dos inibidores de proteinases serínicas reage com suas enzimas

cognatas através de um mecanismo semelhante ao que ocorre na ligação entre enzima e substrato (LASKOWSKI & KATO, 1980). Esse grupo de inibidores compreende geralmente, proteínas pequenas com 29 a 190 resíduos de aminoácidos e todas elas possuem uma alça ligante exposta (BODE & HUBER, 1992). A formação do complexo enzima-inibidor ocorre rapidamente, mas a sua dissociação é lenta e resulta em enzima livre e em um inibidor clivado, o qual sofre desnaturação e degradação. Na formação desse complexo estão envolvidas interações entre as cadeias do inibidor e da proteinase tais como: pontes de hidrogênio e forças de Van der Waals, entre outras. A presença de pontes dissulfeto é indispensável para que o inibidor adquira uma conformação que o possibilite conectar-se à proteinase (ARDELT & LASKOWSKI, 1991; HUNG *et al.*, 1994).

Muitos dos inibidores de proteinases serínicas, tais como o inibidor de tripsina de sementes de soja, de feijão-de-corda e o de faveiro, afetam o desenvolvimento de vários insetos lepidópteros e coleópteros (BROADWAY & DUFFEY, 1986, MACEDO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002). O efeito causado pelos inibidores de proteinases no processo digestivo dos insetos se deve à diminuição da assimilação de nutrientes através de sua ligação específica a enzimas proteolíticas do intestino dos insetos, impedindo que estas executem suas funções primordiais no processo de digestão protéica (RYAN, 1990). Quando insetos são submetidos a uma dieta artificial contendo inibidores específicos para a principal classe de proteinases de seus intestinos, estes têm seu desenvolvimento retardado, bem como podem apresentar índices de mortalidade bastante significativos (MCMANUS & BURGESS 1995, FRANCO *et al.*, 2003).

1.4. O GÊNERO *Crotalaria*:

O gênero *Crotalaria* pertence à família Leguminosae, subfamília Papilionoideae (JOLY, 1979). Os representantes desse gênero são em geral de hábito herbáceo, sendo alguns arbustivos (Figura 1).



Figura 1: Espécimen de *Crotalaria pallida*.

A planta tem esse nome devido ao fato de que o som das sementes dentro de vagens secas assemelha-se ao do chocalho da cobra cascavel (*Crotalus* sp.).

Diversos estudos mostram o potencial toxicológico de sementes de crotalária sobre vários organismos (DIAZ *et al.*, 2003; NORTON & O'ROURKE,

1979; MCGRATH, *et al.*, 1975; LAWS, 1968). Diaz e colaboradores (2003) demonstraram que uma alimentação contendo 2 a 3% de extrato protéico de sementes de *C. pallida* causou a mortalidade de até 16,1% em pintos. A dieta causou ainda perda de peso, diminuição da ingesta, e também causou aumento do peso de pulmão, coração e baço. Trabalhando com *Crotalaria goreensis*, Norton e O'Rourke (1979) mostraram que pintos alimentados com ração contendo farinha de semente apresentaram lesões de intestino grosso e porção glandular do proventrículo.

A toxicidade de sementes de espécies de crotalária também foi avaliada em mamíferos. Em ratos, dieta contendo 10 e 50% de cotilédone de *C. saltiana* causou a toxicidade e morte, num período de 7 a 29 dias. Entre as lesões encontradas em exame *post mortem* estavam: necrose, fibroplasia portal e hemorragia hepática, congestão e efisema pulmonar e degeneração das células dos glomérulos renais (BARRI *et al.*, 1988). Cavalos alimentados com ração contendo 40% de sementes de *C. juncea* triturada sofreram dispneia e febre e morreram 30 dias após o início da dieta (NOBRE *et al.*, 1994).

Até o presente, a literatura consultada apresenta apenas um inibidor de tripsina isolado de sementes de plantas do gênero *Crotalaria*: PANDO e colaboradores em 1999 isolaram um inibidor de tripsina de sementes de *C. paulina*. Duas lectinas foram isoladas de sementes: uma de *C. pallida* (REGO *et al.*, 2002) e outra de *C. paulina* (PANDO *et al.*, 2004), este último testando a atividade antibacteriana. Nenhum estudo foi relatado mostrando os efeitos *in vitro* e *in vivo* dos inibidores de tripsina de sementes de crotalária para insetos pragas.

2. OBJETIVOS

- Isolar e caracterizar um inibidor de tripsina presente em sementes de *Crotalaria pallida*.
- Testar sua atividade biológica sobre enzimas digestivas de insetos-praga de culturas agrícolas importantes do nordeste brasileiro e atividade bioinseticida para larvas de *Ceratitis capitata* e *Callosobruchus maculatus*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Sementes de *Crotalaria pallida*

As sementes de *C. pallida* foram coletadas de vagens secas de espécimens encontrados no perímetro interno do campus da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. A espécie foi identificada e armazenada no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará.

3.1.2 Insetos

Espécimens de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera; gorgulho do feijão de corda), *Zabrotes subfaciatus*, (Coleoptera; gorgulho do feijão de corda e feijão comum) e *Plodia interpunctella* (Lepidoptera; broca da vagem da algaroba) foram coletados da criação mantida no Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas, do Departamento de Bioquímica da UFRN. *Ceratitis capitata* (Diptera; praga da fruticultura) foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Mosca-das-frutas, do Departamento de Biologia Celular e Genética da UFRN, dirigido pelo Prof^o. Dr. Francisco Pepino de Macedo; larvas de *Alabama argillacea* (Lepidoptera; curuquerê, praga do algodoeiro) e *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; praga do milho) e espécimens adultos de *Anthonomus grandis* (Coleoptera; bicudo do algodoeiro) foram gentilmente cedidas pela Dra. Márcia Vidal, do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão, de Campina Grande, Paraíba.

3.1.3 Equipamentos

Agitador Magnético Tecnal TE-081

Balança analítica eletrônica Tecnal classe II

Banho – Maria Tecnal – Te 056

Bomba Pump-1 Amersham Biosciences

Centrífuga HITACHI CR 21

Coletor de frações Radifrac da Pharmacia Biotech

Espectrofotômetro Femto 700 plus

Microcentrífuga Eppendorf 5410

3.1.4 Reagentes

Acrilamida e N'N'-metilenobisacrilamida; (Sigma, USA)

Albumina sérica bovina (BSA) (Sigma, USA);

Azocaseína 1% (Sigma);

Bromelaína (Sigma, USA)

BapNA (benzoil arginina nitroanilida (Sigma, USA);

DMSO (dimetilsulfóxido- BDH GPR)

Elastase (Sigma, USA)

Papaína (Sigma, USA)

Quimotripsina (Sigma, USA)

SDS (dodecil sulfato de sódio - Reagen)

Tripsina (Sigma, USA)

Todos os outros reagentes utilizados neste trabalho eram de grau analítico, sendo manuseados segundo recomendação do fabricante.

3.2 Métodos

3.2.1. Preparação dos extratos protéicos de sementes de *C. pallida*

3.2.1.1. Preparação de extrato bruto

As sementes foram moídas em um processador até a formação de um pó de granulação fina, em torno de 40 mesh. As proteínas totais desta farinha foram extraídas em tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,5, na proporção de 1:10. A mistura foi submetido a agitação constante, por 3 horas a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, o material foi centrifugado a 12.000 g por 30 min a 4°C. O sobrenadante foi denominado extrato bruto (EB).

3.2.1.2. Fracionamento protéico com sulfato de amônio

O extrato bruto foi fracionado sequencialmente com sulfato de amônio a 0-30% (F1), de 30 - 60% (F2) e de 60 - 90% (F3) de saturação. Na seqüência cada fração foi deixada por cerca de 24h a 4°C, centrifugada a 12.000 g por 30 min, a 4°C para obtenção das proteínas precipitadas. Os precipitados foram ressuspensos em tampão Tris HCl 50 mM pH 7,5, dialisados contra o mesmo tampão para retirada do sulfato de amônio, e mantidos a -20°C durante 16h.

3.2.2. Determinação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Medidas de densidade óptica de 280 nm foram mensuradas para acompanhamento de corridas cromatográficas.

3.2.3. Preparo das soluções usadas como substrato

- BApNA (benzoil arginina nitroanilida) a 1,25 mM dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido 8% do volume final) e completado com tampão Tris-HCl 50mM, pH 7,5. Para os ensaios cinéticos também foram preparados BapNA a 0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM e 2,0 mM, utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente.
- Azocaseína a 1%: 1 g de substrato foi suspenso em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e fervida por 15 minutos, após resfriamento o volume foi completado com água destilada.

3.2.4. Determinação da atividade antitriptica

A atividade anti-tríptica das frações foi determinada utilizando a seguinte metodologia: alíquota de 20 μ L da solução de Tripsina bovina (0,3 mg/mL HCl 2,5 mM) foi pré-incubada com 460 μ L de tampão Tris-HCl 0,05 M pH 7,5, 120 μ L de HCl 2,5m M e 400 μ L do inibidor por 15 minutos a 37 $^{\circ}$ C. Após esse período a reação foi iniciada adicionando-se 500 μ L de solução de substrato específico (BApNA 1,25 mM). A reação processou-se por mais 10 minutos nas mesmas condições de incubação, e em seguida foi interrompida adicionando-se 120 μ L de solução de ácido acético 30%. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e provas em branco foram realizadas. A absorbância foi medida a 410 nm. A unidade de inibição ficou definida como a quantidade de inibidor capaz de diminuir em 0,01 o valor de absorbância no ensaio antitriptico.

3.2.5. Isolamento e purificação do Inibidor de tripsina

3.2.5.1. Cromatografia de afinidade Tripsina-Sepharose 4B

- Protocolo de ligação de tripsina à Sepharose 4B CNBr ativada

Para a cromatografia de afinidade foi feita a acoplagem de tripsina bovina a uma resina de Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio, seguindo instruções do fabricante. Para seu preparo, pesou-se 1 g da Sepharose para cada 3,5 mL final de gel. O pó foi ressuspensionado em 50 mL de HCl 1mM e lavado por 15 min no ácido clorídrico, sendo filtrado várias vezes com auxílio de bomba a vácuo. O gel foi retirado do filtro, adicionou-se 15 mL de HCl 1mM e deixou-se em repouso por 15 min.

A tripsina para a ligação foi preparada dissolvendo-se 10mg de enzima, por mL de gel, em tampão bicarbonato de sódio 0,1 M pH8,3 contendo NaCl 0,5 M. A solução de tripsina foi então adicionada ao gel e incubou-se por 16 h a 4°C. Decorrido o tempo, lavou-se o gel (para retirada do excesso tripsina que não se ligou à Sepharose) com 5 volumes de tampão bicarbonato com NaCl. O gel foi transferido para tampão Tris HCl 0,1M pH 8,0, para bloquear quaisquer grupos ativos remanescentes na resina. Lavou-se, então, o gel com 5 volumes de tampão acetato de sódio 0,1 M NaCl 0,5 M, seguido por 5 volumes Tris HCl 0,1 M NaCl 0,5 pH 8,0.

- Cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose 4B

A fração F2 dialisada foi submetida a uma cromatografia de afinidade Tripsina-Sepharose 4B. A coluna (10 cm X 1,5 cm) foi equilibrada com tampão Tris HCl 50 mM, pH 7,5. As proteínas adsorvidas na matriz foram eluídas com solução de HCl,1mM. O perfil protéico foi acompanhado por

espectrofotometria a 280nm. O pico retido e eluído da matriz de afinidade foi denominado de F2-AF.

3.2.5.2. Precipitação com ácido tricloroacético (TCA)

F2-AFs obtidos de 10 cromatografias de afinidade foram reunidos e submetidos a precipitação com solução de TCA a 2,5%. Este procedimento remove proteínas de alto peso molecular, sem pontes dissulfetos, lábeis a pH extremamente ácido. Após 2-3 min de incubação com solução de TCA a 2,5%, a temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 15.200g a 20°C por 30 min. O sobrenadante foi dialisado contra Tris HCl 50 mM pH 7,5 por 16 h e utilizado nos ensaios de inibição de enzimas de diversas origens, de extratos enzimáticos de intestinos de insetos-pragas e utilizado nos estudos de caracterização bioquímica do inibidor. Parte do sobrenadante foi dialisada contra água destilada, liofilizada e utilizada em bioensaios contra larvas de *Ceratitis capitata* e *Callosobruchus maculatus*. O conteúdo protéico resultante da precipitação com TCA foi denominado ITC.

3.2.6. Caracterização bioquímica de ITC

3.2.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-redutoras, contendo SDS (SDS-PAGE).

A eletroforese das amostras foi feita segundo o método desenvolvido por Laemmli (1970). Foram utilizadas placas de vidro de dimensões 10x14 cm, espaçadores de 0,75 mm e solução estoque de acrilamida/bisacrilamida na proporção de 30:2 dissolvidas em água destilada para o volume de 100 mL. Esta solução foi filtrada em papel de filtro Whatman nº1 e estocada em frascos escuros a 5 °C. O gel de separação foi preparado numa concentração de 20%

contendo: 0,372 mL de água destilada, 1,25 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, 50 μ L de SDS 10%, 3,3 mL de solução estoque de acrilamida/bisacrilamida, 25 μ L de persulfato de amônio e 3,0 μ L de Temed concentrado. O gel de concentração foi preparado com 1,5 mL de água destilada; 0,625 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 6,8; 25 μ L de SDS 10%; 0,33 mL de solução estoque de acrilamida/bisacrilamida; 12,5 μ L de persulfato de amônio e 2,5 μ L de Temed concentrado. Às amostras foi adicionado tampão de amostra constituído de Tris-HCl 62,5 mM; SDS 2%; glicerol 10% v/v; 0,01% de azul de bromofenol e 5% β -mercaptoetanol. O tampão de corrida continha trizma base 0,025 M; glicina 0,192 M e SDS 10%. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 20 mA por aproximadamente 2 horas. Após o marcador de corrida (azul de bromofenol) atingir o final do gel, a eletroforese foi finalizada. Após a eletroforese os géis foram corados segundo procedimento descrito por Weber e Osborne (1969). A solução corante foi preparada usando-se Coomassie Blue R-250 a 1%; metanol 40%; ácido acético 10% em água. O descoloramento foi feito com uma solução contendo ácido acético 10% e etanol 30%.

Para a revelação com prata o gel foi desidratado gradativamente com uma solução de etanol 50%, submetendo-se a três lavagens de 20 minutos cada. Em seguida, foi adicionada uma solução de tiosulfato de sódio (20 mg/100 mL H₂O) e mantida por 1 minuto sob agitação. Foram feitas três lavagens rápidas em água destilada, sendo então adicionada a solução de nitrato de prata (200 mg + 74 μ L formaldeído em 100 mL de H₂O) mantendo-se por 20 min sob agitação. Lavou-se novamente três vezes em água destilada e adicionou-se a solução reveladora (carbonato de cálcio 6 g + 50 μ L formaldeído

+ 2 mL tiosulfato de sódio em 100 mL de H₂O). Para cessar a revelação adicionou-se ácido acético 13%.

3.2.6.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras

Essa eletroforese foi realizada com amostras tratadas com 5 µL de β-mercaptoetanol a 100 °C por 3 min. Após resfriamento da amostra à temperatura ambiente, a eletroforese seguiu como descrito no item anterior.

3.2.6.3. Seletividade de ITC para outras proteinases

- Inibição da elastase

Nos ensaios de inibição da atividade da elastase, 10 µL da enzima (0,1 mg/mL em Tris HCl 50 mM pH 7,5) foram incubados com 350 µL de Tris HCl 50 mM pH 7,5 e 400 µL de solução de inibidor (13,6 µg) por 30 min a 37 °C, após o que foram acrescentados 200 µL de azocaseína a 1%. Após 30 min a 37 °C a reação foi parada com a adição de 150 µL de TCA a 20% e adicionou-se 200 µL do substrato aos tubos-brancos (nos quais a reação foi realizada de modo semelhante aos tubos-teste, mas com adição de substrato após a parada da reação). O material foi centrifugado por 5 min a 15.200 g e alcalinizado com 1 volume de NaOH a 2 M. Os ensaios foram realizados em triplicata, incluindo o controle positivo. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 440 nm.

- Inibição da quimotripsina

Para verificar a atividade inibitória contra quimotripsina, foram incubados 30 µL da enzima (0,1 mg/mL de Tris HCl 50 mM pH 7,5) com 330 µL do mesmo tampão usado na solução da enzima e 400 µL de solução de inibidor (13,6 µg)

por 30 min a 37 °C. Decorrido o tempo, foi acrescentado 200 µL do substrato azocaseína a 1% em Tris HCl 50 mM pH 7,5. Após 30 min, a reação foi parada com 150 µL de TCA a 20% e o substrato foi adicionado aos brancos. O material foi centrifugado por 5 min a 15.200 g e alcalinizado com 1 volume de NaOH a 2 M. Os ensaios foram realizados em triplicata, incluindo o controle positivo. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 440 nm.

- Inibição da papaína

Para testar a inibição da atividade de papaína, 5 µL de solução de papaína a 1 mg/mL de Tris HCl 50 mM pH 7,5 foram pré-incubados a 45 °C com 40 µL de solução ativadora (L-cisteína 0,05M e EDTA 0,02 M pH 8,0) e 40 µL de Tris HCl 50 mM pH 7,5. Após 10 min, 400 µL de solução de inibidor (13,6 µg) foi adicionado. Após mais 30 min de contato inibidor-enzima, foram adicionados 200 µL de azocaseína a 1% em Tris HCl 50 mM pH 7,5 como substrato. Após 10 minutos, a reação foi parada com 300 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 20% e azocaseína a 1% foi adicionada aos brancos. O material foi centrifugado por 5 min a 15.200 g e alcalinizado com 1 volume de NaOH a 2 M. Os ensaios foram realizados em triplicata, incluindo o controle positivo. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 440 nm.

- Inibição da bromelaína

Para determinação da atividade inibitória para a bromelaína, 20 µL de solução de bromelaína (1 mg/mL Tampão acetato de sódio, pH 5,6) foi pré-incubada com 40 µL de solução ativadora contendo L-cisteína 0,05 M e EDTA 0,02 M e 40 µL de tampão acetato de sódio, pH 5,6 por um período de 10

minutos a 45 °C. Após este período foram acrescentados 400 µl de solução inibidor (13,6 µg) e 335 µL do mesmo tampão utilizado anteriormente. Passados mais 10 minutos a reação foi iniciada acrescentando-se 200 µL de solução de azocaseína 1%. A reação foi paralisada com 300 µL de TCA 20% após 10 minutos de reação e alcalinizado com 1 volume de NaOH 2M. O ensaio controle foi realizado na ausência da fração inibidora, nas mesmas condições para a papaína. Os ensaios foram realizados em triplicata e provas em branco foram feitas. Absorbância foi medida a 440 nm.

Os volumes das soluções das enzimas utilizadas nos ensaios acima descritos foram determinados em ensaios de atividade enzimática na ausência de inibidor e em diversos volumes de solução.

3.2.6.4. Determinação do mecanismo e da constante de inibição

Para a determinação do mecanismo de inibição os ensaios foram realizados como descrito em 3.2.6. O controle positivo foi realizado sem inibidor, com alíquotas de 20 µL de solução de tripsina (0,3 mg/mL HCl 2,5 mM). As amostras foram incubadas por 15 minutos a 37°C com concentrações crescentes de 0,5 mM, 1,0 mM, 1,25 mM, 1,5 mM e 2,0 mM de solução de substrato específico (BApNA) em volumes de 500 µL, livres da fração inibidora. Para análise da fração inibidora, alíquotas de 100 µL, 200 µL, 400 µL, e 600 µL da fração, que correspondem a 3,4 µg, 6,8 µg, 13,6 µg e 20,4 µg de proteína respectivamente, foram incubadas com 10 µL de solução de tripsina e 500 µL de solução de BApNA em diversas concentrações (0,5 mM, 1,0 mM, 1,25 mM, 1,5 mM e 2,0 mM).

O valor de K_i foi determinado pelo gráfico de Lineweaver-Burk de acordo com Dixon *et al.* (1979). O eixo das ordenadas (Y) corresponde aos valores do intercepto e da inclinação obtidos pela determinação do mecanismo de inibição citado do item anterior, onde os valores do intercepto correspondem a $1/V_{\max}$ e os valores da inclinação foram obtidos pela fórmula abaixo,

$$\text{Inclinação} = \frac{\Delta 1/V (DO_{410} \cdot T \cdot V)^{-1}}{\Delta 1/[S]}$$

Em que T é o tempo em horas de reação e V é o volume em mL. Os valores das abcissas (X) correspondem às diferentes quantidades de inibidor (3,4 μg , 6,8 μg , 13,6 μg e 20,4 μg).

3.2.6.5. Estabilidade em diferentes pHs

Para verificar o comportamento de ITC após tratamento em diferentes pHs, foram tomadas alíquotas de 2,5 mL de solução de ITC e a elas foi adicionado 1 volume de tampão com o pH desejado. Esses tampões são: para pH 2-4, glicina-HCl; para pH 5-8, fosfato de sódio monobásico; para pH 9-12, glicina NaOH. Para cada tampão a concentração de soluto foi de 100 mM. Após 1 h de incubação a 37 °C, as amostras foram dialisadas por 4h, em Tris HCl pH 7,5 50 mM para ajuste ao pH do ensaio. O ensaio de atividade foi realizado conforme descrito no item 3.2.4., em triplicata.

3.2.6.6. Estabilidade térmica

A estabilidade térmica de ITC foi determinada incubando-se alíquotas de solução do inibidor por 30 min em banho-maria nas seguintes temperaturas: 37 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C e 100 °C. Decorrido o tempo de

incubação, as amostras foram resfriadas a 4 °C e então empregadas no ensaio de atividade como descrito acima (item 3.2.4.). Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.2.7. Atividades bioinseticidas *in vitro* e *in vivo* de ITC

3.2.7.1. Ensaio *in vitro* de inibição de proteinases intestinais de diversos insetos pragas

Foram coletadas larvas de *C. maculatus* e *Z. subfaciatus* (pragas dos feijões armazenados) com 19-20 dias de vida pós-eclosão (3º instar), larvas de *A. argillacea* e *S. frugiperda* do 5º instar (pragas do algodão e do milho, respectivamente), larvas de *P. interpunctela* (praga da algaroba) e larvas de 5º dia de *C. capitata* (moscas das frutas). Essas larvas foram mergulhadas em solução de NaCl a 150 mM e tiveram seus intestinos dissecados com auxílio de pinças de relojoeiro e lupa estereoscópica. Os intestinos assim obtidos foram imediatamente colocados em tubos para microcentrífuga (1,5 mL), contendo 100µL de tampão acetato de sódio 300 mM, cisteína 1mM, EDTA 3 mM, pH 5,6, sendo estocados a -20°C.. Insetos adultos de *A. grandis* (praga da maçã do algodão) foram dissecados em solução de NaCl 150mM e os intestinos estocados a -20°C em tampão 100µL de tampão acetato de sódio 300 mM, cisteína 1mM, EDTA 3 mM, pH 5,6. Na preparação dos ensaios esses intestinos foram macerados e extraídos por 10 minutos em banho de gelo e centrifugados a 12.000g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e utilizado nos ensaios de inibição.

Nos ensaios *in vitro*, alíquotas de 20 µL de extrato intestinal de *A. grandis* e *C. maculatus*, 10 µL de extrato intestinal de *Z. subfaciatus*, *C.*

capitata, *A. argillacea* e *S. frugiperda*, e 2 μL de extrato intestinal de *P. interpunctela* foram incubados com 400 μL (13,6 μg) de ITC por 30 min a 37 °C. Após este período de contato foram adicionados 500 μL do substrato BAPNA (específico para tripsina). Após 16 horas, a reação foi parada com 120 μL de solução de ácido acético a 30%. Ensaio enzimáticos contendo as proteinases dos insetos foram realizados paralelamente aos ensaios de inibição. Foram realizados controles negativos em que o substrato foi adicionado após a interrupção da reação. Todos os ensaios foram executados em triplicata e lidos a 410 nm de absorbância.

Os volumes das soluções de extratos enzimáticos utilizadas nos ensaios acima descritos foram determinados em ensaios de atividade enzimática na ausência de inibidor e em diversos volumes de solução.

3.2.7.2. Bioensaio para moscas das frutas (*C. capitata*)

Larvas de *C. capitata* foram submetidas a ensaio *in vivo* para avaliação do efeito da ingestão de ITC no crescimento e desenvolvimento do inseto. Para tal, dietas foram preparadas contendo concentrações crescentes de ITC: 0,05%, 0,1%, 0,5% e 2,0%, além da dieta controle sem inibidor. Larvas de 1° dia de vida pós-eclosão foram colocadas em tubos de ensaio contendo 500 mg de dieta. Foram adicionadas 5 larvas por tubo, sendo 4 tubos por tratamento. Os tubos foram então fechados com filme plástico e incubados por 5 dias em estufa B.O.D. a 28 °C e 90% de umidade. No 5° dia, as larvas foram retiradas das dietas e pesadas individualmente em balança de precisão. Foram calculadas as médias e os desvios padrões para cada tratamento.

- Dieta artificial para *C. capitata*:

O preparo de 500 g de dieta artificial, segundo Walder, 2002, foi realizado adicionando-se gérmen de trigo (15 g), farinha de trigo (32,5 g), açúcar cristal (60 g), extrato de levedura (49,5 g), benzoato de sódio (1,5 g), HCl (4,5 g), H₂O (285 g) e bagaço de cana-de-açúcar (52 g). O material foi misturado até a formação de uma pasta homogênea. Para os bioensaios com larvas de *C. capitata* diferentes quantidades de inibidor liofilizado foram adicionadas e os valores subtraídos da massa de água.

3.2.7.3. Bioensaio para o bruquídeo do feijão-de-corda (*C. maculatus*).

As sementes artificiais pesando cerca de 400 mg foram preparadas com a mistura de farinha de feijão de corda. ITC foi incorporado à farinha de feijão de corda nas proporções de 0,5%, 1%, 2%, 4% e 8%. O controle contendo apenas farinha de feijão de corda foi adicionado ao ensaio. As sementes artificiais foram preparadas em uma prensa manual adaptada e com auxílio de um molde cilíndrico de latão. Depois de prensadas, três sementes artificiais foram expostas à infestação durante 24 horas com fêmeas dos bruquídeos de 48 horas de idade. Passando o período de oviposição, as fêmeas foram retiradas dos tubos e o excesso de ovos postos foi excluído com auxílio de uma agulha fina, deixando-se 3 ovos por semente, mantidas em câmara incubadora por 18 dias a 28 °C e 60% de umidade relativa.

Passados 18 dias, as sementes foram abertas com o auxílio de pinças e uma lupa. Foram pesadas as larvas de *C. maculatus* em cada semente artificial e anotados os resultados. Todo o experimento foi feito em triplicata.

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento do inibidor de tripsina de sementes de *C. pallida*

4.1.1 Determinação da atividade anti-tríptica das frações protéicas de sementes de *C. pallida*

O extrato de proteínas totais de sementes de *C. pallida* foi fracionado em três faixas com sulfato de amônio (F1, F2 e F3) e a atividade inibitória para tripsina bovina foi avaliada. O extrato bruto inibiu a atividade tríptica em 77,3% e dentre as frações precipitadas com sulfato de amônio, a F2 (30-60%) apresentou maior atividade anti-tríptica, atingindo um índice de 95,6% de inibição (figura. 2). F2 foi usada nos passos subseqüentes de purificação neste trabalho.

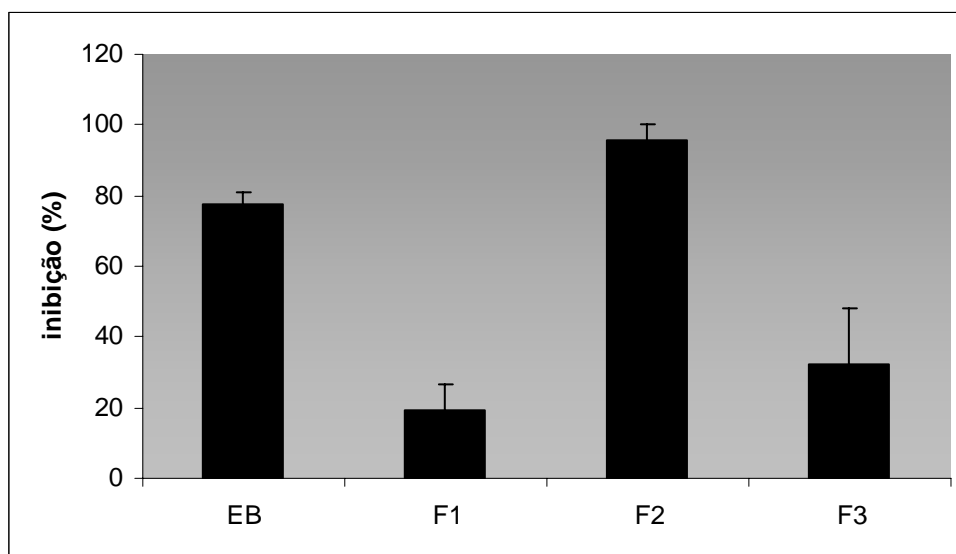


Figura 2. Inibição da atividade da tripsina sobre o substrato BAPNA pelas frações protéicas de sementes *C. pallida*. EB: extrato bruto; F1: fração 0-30% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; F2: fração 30-60% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; F3: fração 60-90% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

4.1.2. Cromatografia de afinidade em coluna de Tripsina-Sepharose CL 4B:

A fração denominada F2 foi dialisada contra Tris HCl 50 mM, pH 7,5 e aplicada em uma coluna de afinidade Tripsina-Sepharose, previamente equilibrada com o mesmo tampão. O material protéico retido foi eluído da matriz com uma solução de HCl 1 mM. O conteúdo do pico, retido e eluído com HCl 1 mM, foi submetido a ensaio de inibição contra tripsina, apresentando um pico de atividade denominado F2-AF, que possuía 99,3% de atividade antitriptica (figura 3).

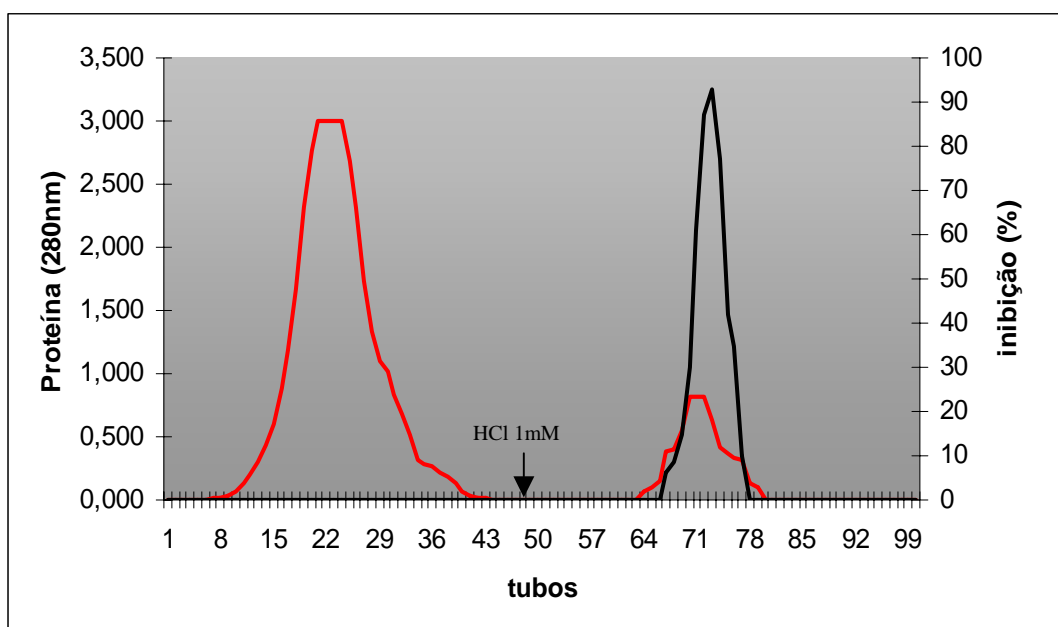


Figura 3. Cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose CL 4B da F2 de sementes de *C. pallida*. Perfil protéico a 280 nm (---) e de atividade antitriptica (---) das proteínas retidas e eluídas com solução de HCl 1mM. Fluxo constante de 3,5 mL/min.

4.1.3. Fracionamento de F2-AF com TCA 2,5%

O material com atividade inibitória proveniente da cromatografia de afinidade (F2-AF) foi reunido e precipitado com ácido tricloroacético (TCA) a uma concentração final de 2,5%. O sobrenadante após a centrifugação apresentou 90,3% de inibição da atividade da tripsina.

4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) das frações proteicas e cromatográficas de sementes de *C. pallida*

Com o intuito de visualizar a progressão da purificação de ITC de sementes de *C. pallida* foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% contendo SDS a 10% (Laemmli, 1970) (figura 4A). É interessante observar que existe mais de uma banda protéica no pico retido da cromatografia de afinidade (F2-AF), indicando a possibilidade da presença de mais de um inibidor de tripsina na F2. Como se pode perceber no gel revelado com prata, a precipitação das proteínas de F2-AF com TCA a 2,5% produz uma única banda de massa molecular aparente de 32,5 kDa, calculada em função da migração eletroforética (figura 4B). Essa proteína foi denominada ITC.

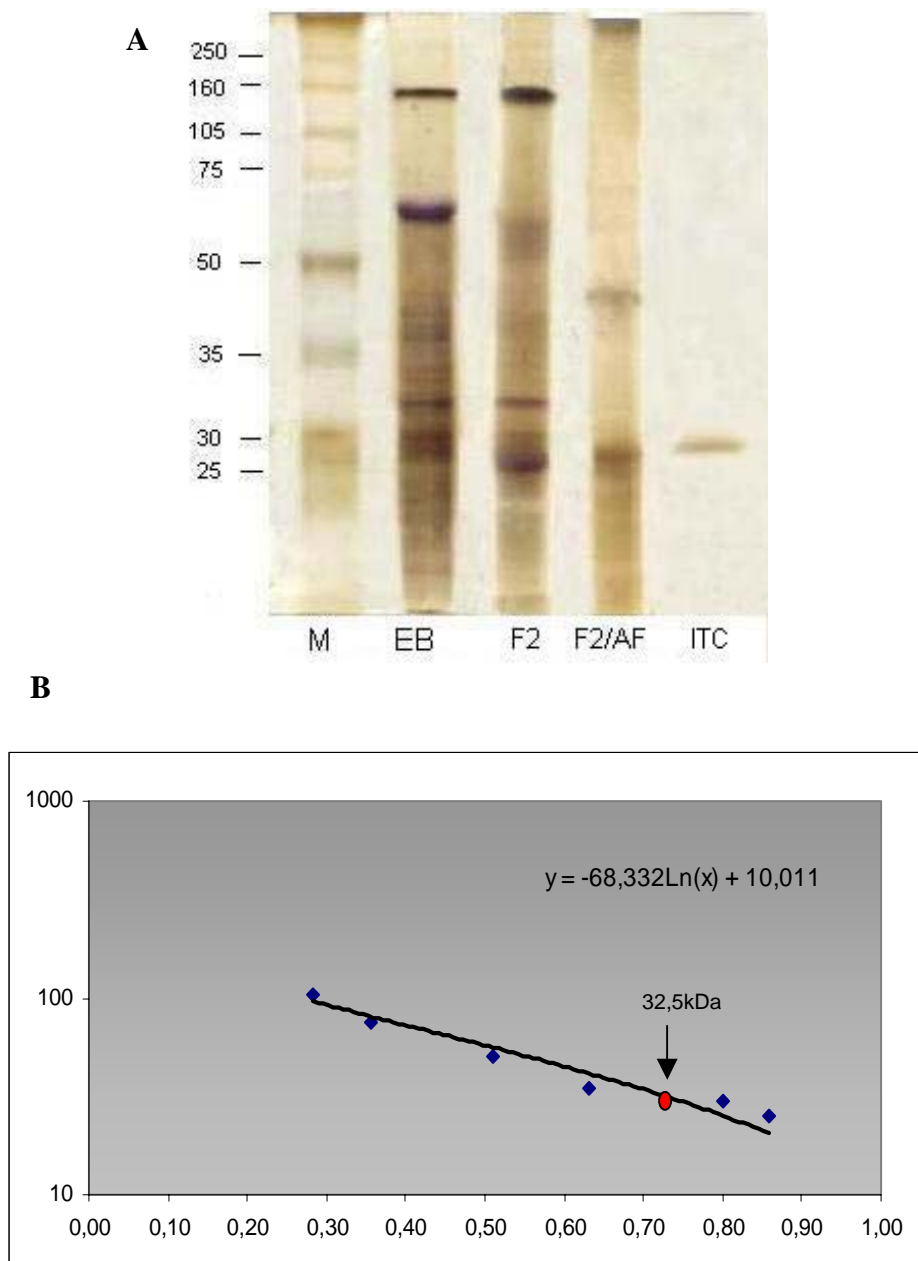


Figura 4. (A) Eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% na presença de SDS das amostras protéicas de sementes de *C. pallida*; M: marcador de peso molecular; EB: extrato bruto; F2: fração 30-60%; F2/AF: material retido em afinidade; ITC: inibidor purificado com TCA 2,5%. (B) Determinação da massa molecular aparente de ITC a partir de sua migração em gel de poliacrilamida a 15% contendo SDS.

4.3. Tabela de purificação de ITC

A partir dos volumes das frações obtidas de cada passo de purificação, de suas respectivas quantidades de proteína e de unidades inibitórias (UI) foi construída uma tabela de purificação de ITC. A tabela 4 mostra que o grau de purificação de ITC foi de 180,4 vezes, com uma recuperação de 0,5% da atividade específica no último passo de purificação.

Tabela 4. Etapas de purificação de ITC.

Etapas	Volume (mL)	Proteína total (mg)	UI* total	Atividade específica (UI/mg)	Purificação (X)	Recuperação (%)
EB	640	3584	10048	2,8	1	100
F2	375	787,5	6828	8,7	3,1	67,9
F2-AF	9	1,8	201,6	112	40	2,0
TCA	1	0,1	50,5	505	180,4	0,5

*Unidades de Inibição

4.4. Caracterização bioquímica de ITC

4.4.1. Eletroforese em gel de poliácridamida na presença de SDS (SDS-PAGE) de ITC tratado com agente redutor β -mercapto etanol

Uma eletroforese em gel de poliácridamida a 25% (SDS-PAGE) de ITC em condições redutoras (com β -mercaptoetanol) foi realizada para determinar se a proteína ITC era ou não composta por subunidades ligadas por pontes dissulfeto. De acordo com o gel mostrado na figura 5, foi observado que ITC compõe-se de duas subunidades, uma com peso molecular aparente de 27,6 kDa, e outra menor com 5,6 kDa, característicos dos inibidores de tripsina tipo Kunitz.

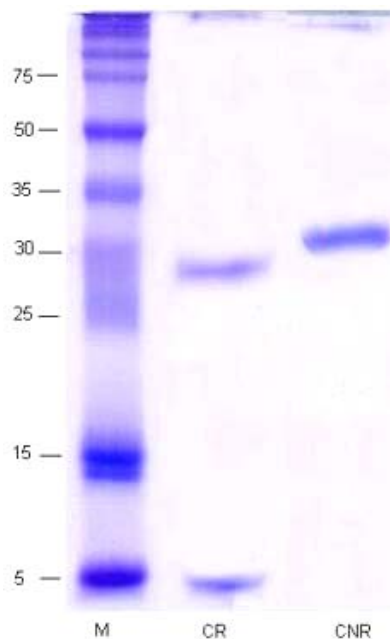


Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 25% de ITC tratado e não tratado com β -mercaptoetanol. M: marcador de peso molecular; CR: ITC submetido à condição redutora com β -mercaptoetanol; CNR: ITC não tratado com o agente redutor.

4.4.2. Atividade inibitória sobre tripsina e outras enzimas serínicas e cisteínicas:

Para determinar a especificidade de inibição de ITC sobre a tripsina, foram realizados ensaios utilizando várias enzimas serínicas e cisteínicas. Como se pode observar na tabela 5, ITC inibiu quimotripsina (36,2% de inibição) e elastase (15,9% de inibição), ambas proteinases serínicas, mas preferencialmente inibiu tripsina com cerca de 90,3% de inibição. Com relação a proteinases cisteínicas, ITC apresentou 43,9% de inibição para papaína e não inibiu a bromelaína.

Tabela 5. Especificidade de inibição de ITC para enzimas do tipo serínicas e cisteínicas

Enzima	Inibição
Tripsina	90,37 ± 5,9%
Quimotripsina	36,20 ± 7,91%
Elastase	15,91 ± 7,41%
Papaína	43,91 ± 8,59%
Bromelaína	ND*

* Não detectada

4.4.3. Estabilidade térmica de ITC:

A estabilidade do inibidor de tripsina de *C. pallida* foi testada em diferentes temperaturas (37 a 100°C). Na figura 6 observa-se que a proteína manteve sua atividade máxima até a temperatura de 50°C (85%). Acima de 50°C houve um decréscimo da atividade inibitória em torno de 9% (78%). A 100°C a atividade inibitória decaiu em 36%.

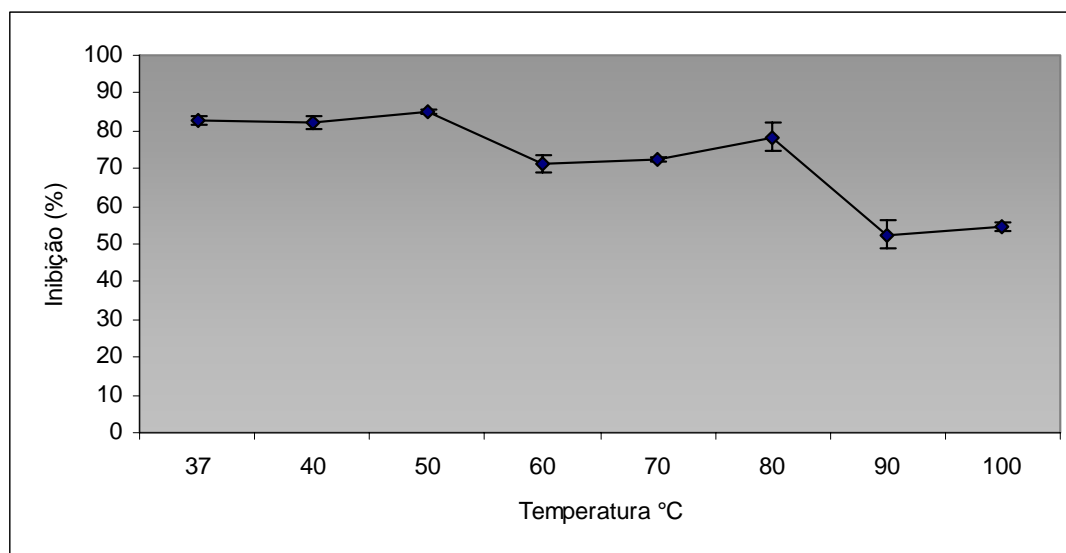


Figura 6. Atividade inibitória de ITC após tratamento em temperaturas variando de 37 a 100°C.

4.4.4. Estabilidade de ITC em diferentes valores de pHs:

A estabilidade de ITC em diversos pHs foi testada incubando-se o inibidor em soluções-tampão com pHs variando de 2 a 12. Após ensaio antitriptico verificou-se que a atividade de ITC permaneceu praticamente inalterada em toda a faixa de pH testada (figura 7).

A pH 2, o mais ácido, a atividade de ITC foi 86% e manteve-se nesse patamar por toda a extensão de pHs testados. Em pH 7 a atividade foi de 87% e em pH 12, o mais alcalino, 84%.

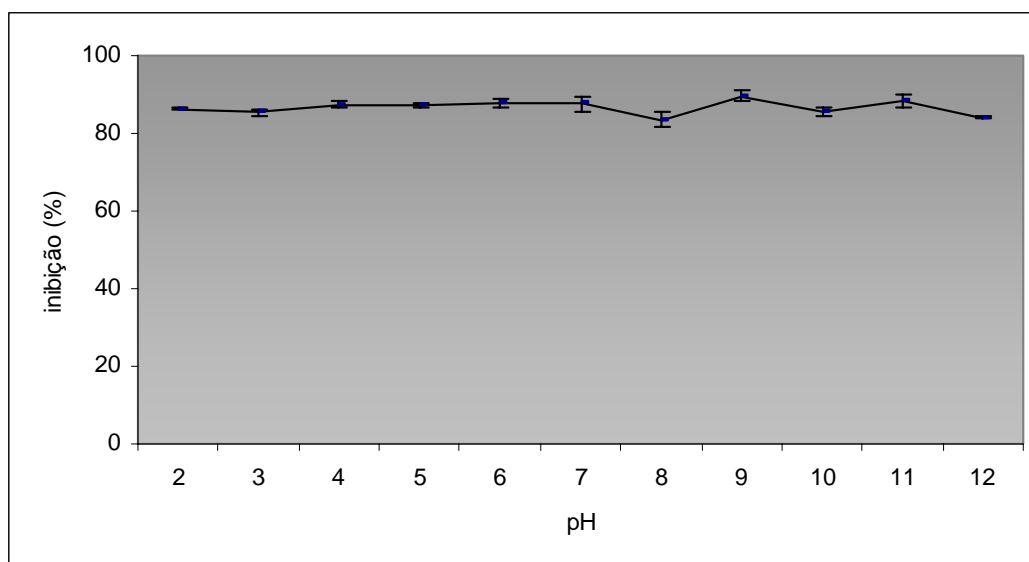


Figura 7: Estabilidade de ITC em diferentes pHs.

4.4.5. Mecanismo de inibição de ITC

Após realização de ensaios com concentrações variáveis de inibidor e substrato (BAPNA) foi construído o gráfico de duplo recíproco de Lineweaver-Burk, para visualização do tipo de inibição proporcionado por ITC. A figura 8 mostra o gráfico e nele pode-se observar que a inibição é do tipo não-competitivo, já que não há modificação do valor de K_m e há diminuição de $V_{m\acute{a}x}$.

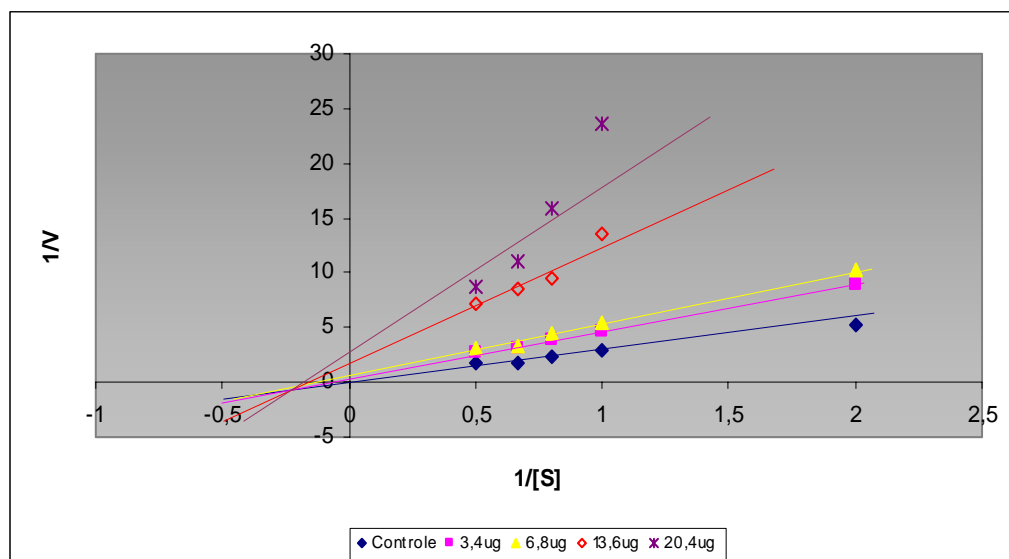


Figura 8. Inibição da atividade tripsínica por ITC. Dados da cinética foram ilustrados pelo gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk. Atividade inibitória de ITC foi determinada usando várias concentrações de BApNA como substrato.

A partir do gráfico de duplo-recíproco foi construído o gráfico para determinação do K_i de ITC (Dixon et al., 1979) (figura 9). Esse gráfico levou em consideração os valores de interseção com o eixo $1/v$ e de inclinação das retas de tendência do gráfico de duplo-recíproco e as concentrações de inibidor usadas no ensaio. A partir desses dados foi calculado um K_i de $5,8\mu\text{g}$ ou $8,8 \times 10^{-7}$ para ITC.

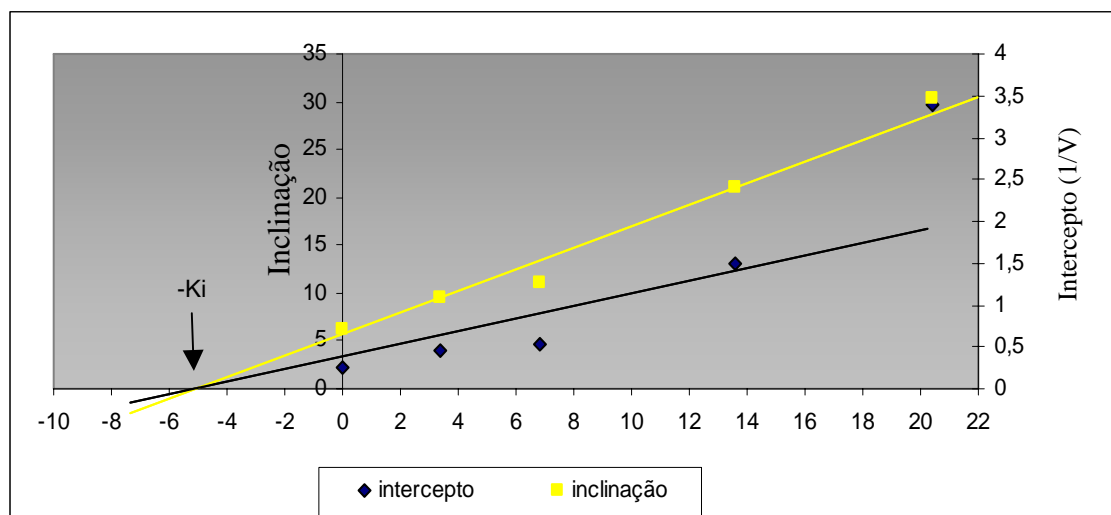


Figura 9. Determinação do valor de K_i de ITC contra tripsina. A constante de inibição de ITC sobre a tripsina foi obtido pelo método de Dixon et al., (1979).

4.5. Atividade bioinseticida *in vitro* e *in vivo* de ITC

4.5.1. Atividade inibitória *in vitro* contra extratos intestinais de diversos insetos-praga:

A atividade inibitória *in vitro* de ITC para enzimas digestivas de diversos insetos-praga do nordeste do Brasil foi testada. A mosca-das-frutas, *C. capitata* e *S. frugiperda* (praga do milho) tiveram suas atividades proteolíticas inibidas em 100%. Enzimas digestivas do curuquerê (*A. argillacea*) foram inibidas em 97,9%. Extratos enzimáticos de intestinos de *A. grandis* (bicudo do algodoeiro), *C. maculatus* (gorgulho do feijão de corda), *Z. subfasciatus* (gorgulho do feijão comum) e *P. interpunctela* (praga generalista) foram inibidos em 52%, 74%, 36% e 66%, respectivamente (tabela 6).

Tabela 6. Inibição da atividade de enzimas proteolíticas intestinais de insetos-praga.

Inseto	Inibição
<i>Anthonomus grandis</i> (Curculionidae)	52,10 ± 10,12%
<i>Alabama argillacea</i> (Noctuidae)	97,90 ± 17,17%
<i>Callosobruchus maculatus</i> (Bruchidae)	74,44 ± 15,77%
<i>Ceratitis capitata</i> (Tephritidae)	100,00 ± 18,36%
<i>Spodoptera frugiperda</i> (Noctuidae)	100,00 ± 7,26%
<i>Plodia interpunctella</i> (Pyralidae)	66,76 ± 7,43%
<i>Zabrotes subfaciatus</i> (Bruchidae)	36,48 ± 13,67%

4.5.2 Atividade bioinseticida in vivo sobre larvas de *C. capitata*:

Larvas de mosca-das-frutas *C. capitata* foram alimentadas com dieta artificial contendo concentrações crescentes de ITC liofilizado (0,05 a 2,0%, p/p). Como se pode observar na tabela 7, dentre as concentrações utilizadas, a de 0,1% provocou redução mais acentuada na massa das larvas em relação ao controle (sem inibidor). Foi observado que em concentrações mais altas que 0,1% a massa média das larvas aumenta com a adição crescente da quantidade de inibidor.

Tabela 7. Massa de larvas de *C. capitata* submetidas a dieta contendo concentrações crescentes de ITC.

% de ITC na dieta	Massa das larvas (mg)
Controle	8,25 ± 1,12
0,05%	6,78 ± 2,14
0,1%	6,03 ± 1,56
0,5%	7,13 ± 0,99
2,0%	7,19 ± 0,74

4.5.4 Atividade bioinseticida *in vivo* sobre larvas de *C. maculatus*

Larvas do gorgulho do feijão de corda *C. maculatus* foram alimentadas com dieta artificial contendo concentrações crescentes de ITC liofilizado (0,5 a 8,0%, p/p). Como se pode observar na figura 10 a WD_{50} de ITC foi de 2,65%, ou seja, a concentração de proteína que diminui o peso das larvas em 50% em relação ao controle.

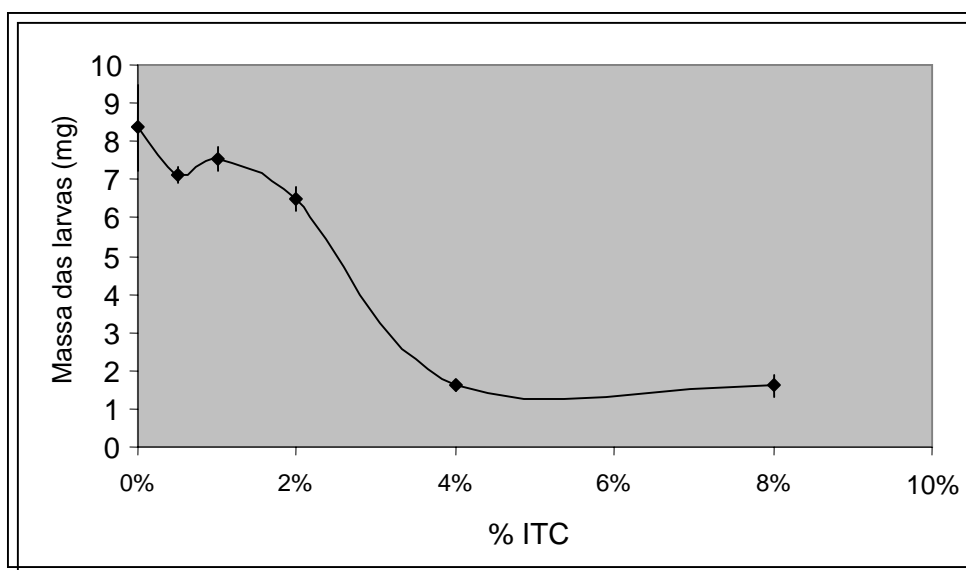


Figura 10. Determinação do WD_{50} de ITC adicionado a sementes artificiais oferecidas a larvas de *C. maculatus*.

5. DISCUSSÃO

Inibidores de tripsina são extensivamente estudados sob os mais diversos aspectos, tais como a caracterização bioquímica, estrutura tridimensional, interação com as diversas classes de proteinases e efeito sobre praga e patógenos (RYAN, 1990; JONGSMA & BOLTER, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2002; KRAUCHENCO *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2004). Além disso, são excelentes candidatos aos programas de melhoramento de plantas via biotecnologia do DNA recombinante, onde são utilizados na produção de plantas resistentes a pragas (FALCO & SILVA-FILHO, 2003; DE LEO *et al.*, 2001; MASOUD *et al.*, 1996).

Neste estudo foi purificado e caracterizado um inibidor de tripsina existente em sementes de *Crotalaria pallida* e sua atividade inibitória *in vitro* sobre extratos enzimáticos de intestinos de sete espécies de insetos-praga encontradas na região Nordeste foi analisada. Dentre estas espécies, duas foram selecionadas para avaliação do efeito deletério do inibidor sobre o desenvolvimento de suas larvas: *C. capitata* (praga da fruticultura) e *C. maculatus* (praga do feijão de corda).

A proteína purificada, denominada de ITC, possui massa molecular de 32,5 kDa, por SDS-PAGE e é composta de duas subunidades, uma de 27,7 kDa e outra menor de 5,6 kDa, unidas por pontes dissulfeto, uma evidência de que este inibidor pertence à família do inibidores do tipo Kunitz. Essa família possui proteínas formadas por uma única cadeia polipeptídica, e ou por duas cadeias polipeptídicas unidas entre si por pontes dissulfeto (NEGREIROS *et al.*, 1991; LIN *et al.*, 1991; BATISTA *et al.*, 1996; MACEDO *et al.*, 2000; PANDO *et al.*, 2001, CAVALCANTI *et al.*, 2002). Essa variedade de estrutura e peso

molecular pode ser encontrada dentro de um mesmo gênero. Por exemplo, Pando e colaboradores (1999) isolaram um inibidor de tripsina de outra espécie do gênero *Crotalaria*, a *Crotalaria paulina*, que possuía uma única cadeia polipeptídica de massa molecular de 20 kDa. Inibidores do tipo Kunitz são encontrados em sementes de várias espécies de dicotiledôneas, especialmente na família das leguminosas e seus efeitos para pragas que utilizam enzimas digestivas do tipo tripsina, são de grande interesse para a biotecnologia (OLIVEIRA *et al.* 2002; TRONCOSO *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2004).

Semelhante a outros inibidores de tripsina purificados e caracterizados (MACEDO *et al.*, 2003; Osman, *et al.*, 2002), ITC foi termo-resistente, mantendo sua atividade total, quando aquecido a até 50°C e somente reduzindo para um pouco mais da metade de sua atividade após aquecimento a 100°C por 30 min. Sua atividade inibitória também não foi alterada quando submetido a uma faixa ampla de pHs, variando de 2 a 12. Esta estabilidade é provavelmente devido à presença de pontes dissulfeto entre suas cadeias polipeptídicas. A cinética de ITC é do tipo não-competitivo, diferindo dos demais inibidores de tripsina que, em geral, apresentam inibição do tipo competitivo (LASKOWSKI & KATO, 1980; FUSHIKI & KAZUO, 1989). Entretanto, mais recentemente, Araújo (2002) isolou um inibidor de tripsina de sementes de *Tamarindus indica* cujo mecanismo de inibição é também do tipo não-competitivo. O K_i de ITC foi determinado como sendo $8,8 \times 10^{-7}M$, sendo assim uma proteína com menor afinidade para tripsina bovina em relação aos inibidores com alta afinidade encontrados em sementes de *Dimorphandra mollis*, com K_i de $5,3 \times 10^{-10}M$, (MACEDO *et al.*, 2000) e CPTI, o inibidor de

tripsina de sementes de *C. paulina*, com K_i de $4,5 \times 10^{-8}M$ (PANDO *et al.*, 1999).

ITC apresentou afinidade diferenciada para outras proteinases serínicas, como a quimotripsina, inibindo-a em 36,2% e a elastase, que foi inibida em 15,9%. A inibição da papaína, uma proteinase cisteínica, em 43,9%, foi interessante, pois proteínas com atividade inibitória de proteinases serínicas e cisteínicas são incomuns. Esse fato é um indicativo de que se pode tratar de um inibidor bifuncional de tripsina/papaína como o purificado por Oliveira e colaboradores (2002) que isolaram e caracterizaram um inibidor de papaína de sementes de *Prosopis juliflora* que foi identificado como sendo a mesma proteína isolada por Negreiros e colaboradores (1991) como inibidor de tripsina. A bifuncionalidade do inibidor de tripsina de algaroba foi comprovada por estudos de modelagem de proteínas, nos quais Franco e colaboradores (2003) mostraram que esse inibidor possui sítios ativos de inibição de papaína e tripsina. Os inibidores bifuncionais são bastante procurados para utilização na construção de plantas transformadas, por exemplo, Masoud e colaboradores (1996) transformaram plantas de tabaco com o gene do inibidor bifuncional de tripsina/ α -amilase de milho, tornando a planta protegida duplamente contra pragas.

A atividade de ITC foi testada, *in vitro*, contra extratos enzimáticos de intestinos de 7 insetos-praga. As atividades bapnásicas de extratos intestinais de *C. capitata* e *S. frugiperda* foram inibidas em 100% e a de *A. argillacea* foi inibida em 97,9%. Estes insetos expressam proteinases serínicas em seus intestinos médios (APPLEBAUM *et al.*, 1985; SILVA, 2003; GATEHOUSE *et al.*, 1999; ZENG *et al.*, 2001; TERRA & CRISTOFOLETTI, 1996; MUHARSINI *et*

al., 2001; CASU *et al.*, 1994) diferentemente dos insetos da ordem Coleoptera (*A. grandis*, *C. maculatus*, e *Z. subfaciatus*), que expressam preferencialmente proteinases cisteínicas (MURDOCK *et al.*, 1986; SILVA & XAVIER-FILHO, 1991; LEMOS *et al.*, 1990; GRUDEN *et al.*, 1998), entretanto enzimas digestivas destes insetos foram inibidas em 52,1%, 74,4%, 36,4%, respectivamente, o que indicaria a presença nos intestinos destas pragas ou de enzimas do tipo serínicas ou que a bifuncionalidade, sugerida para ITC, fosse responsável por este efeito inibitório.

As atividades *in vitro* dos inibidores puderam ser comprovadas quando estes inibidores são incorporados a dietas artificiais e oferecidas aos insetos alvos. Mesmo que os ensaios *in vitro* sejam testes iniciais para a indicação destas proteínas como bioinseticidas, diversos trabalhos mostraram que a comprovação dos efeitos deletérios que os inibidores de proteinases exercem sobre o desenvolvimento de larvas de insetos-praga deve ser feita através de testes *in vivo* (BROADWAY & DUFFEY, 1986; BURGUESS *et al.*, 1994; DE LEO *et al.*, 2001; MACEDO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002; SIQUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2002; FABRICK, *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2003; MACEDO *et al.*, 2003; TELANG *et al.*, 2003). A atividade *in vivo* de ITC foi avaliada durante o desenvolvimento larval de duas importantes pragas para o agronegócio potiguar, *C. capitata* (mosca das frutas) e para *C. maculatus* (gorgulho do feijão de corda). Para isto, ITC foi adicionado à dieta artificial de moscas das frutas em concentrações crescentes de 0,05%, 0,1%, 0,5% e 2,0% e, em sementes artificiais, para o gorgulho do feijão em concentrações de 0,5%, 1%, 2%, 4% e 8%. Em relação às moscas das frutas houve a diminuição do peso das larvas em todos os tratamentos; entretanto, a redução mais acentuada ocorreu na

concentração 0,01%. O efeito de ITC aparentemente foi superado nas concentrações superiores em relação ao controle. Apesar do fato de que *in vitro* ITC inibe em 100% as enzimas serínicas de larvas de moscas das frutas é compreensível que tenha ocorrido uma resposta das larvas a dietas contendo ITC em maiores concentrações (0,5% e 2,0%). Sabe-se que os insetos-praga têm esta capacidade de adaptar-se aos inibidores que lhes são apresentados em ensaios *in vivo* e, também, quando desafiados a plantas geneticamente transformadas (BOULTER & JONGSMA, 1995; ISHIMOTO & CHRISPEELS, 1996; JONGSMA & BOULTER, 1997). Os estudos de De Leo e colaboradores (1998) com plantas de *Arabidopsis thaliana* e *Nicotiana tabacum* transformadas com o inibidor de tripsina de mostarda mostraram que larvas de *Spodoptera littoralis* ganharam peso e se desenvolveram mais rapidamente quando alimentadas com folhas que expressavam baixos níveis de inibidor.

Duas hipóteses podem ser levantadas para explicar a adaptabilidade das larvas de *C. capitata* ao inibidor oferecido na dieta artificial: ou elas expressaram maior quantidade de enzimas digestivas, ou expressaram tipos diferentes de proteinases para superar o efeito de ITC. Broadway e Duffey propuseram em 1986 que a presença de inibidores de proteinases em intestinos de lavas de insetos pode levar à superprodução de proteases em resposta à presença do inibidor. Esse mecanismo de compensação pode explicar o aumento de peso das larvas de *C. capitata* em concentrações acima de 0,1%. Por outro lado, insetos podem sintetizar proteinases diferentes das habituais em resposta à presença de inibidores. Tal fato já é bem documentado para espécies de Lepidoptera (BROADWAY, 1995; JONGSMA *et al.*, 1995; BROADWAY, 1997; BOWN *et al.*, 1997; WU *et al.*, 1997) e Coleoptera

(BOLTER & JONGSMA, 1995; GIRARD *et al.*, 1998; BONADÉ-BOTTINO *et al.*, 1999). Entretanto, ainda não há trabalhos mostrando esse tipo de resposta em insetos da ordem Diptera.

Trabalhos mostram também que os inibidores não atuam somente atrasando ou impedindo o desenvolvimento larval dos insetos. Essas proteínas também podem impedir ou retardar o estágio de pupa, podem provocar o surgimento de adultos mal-formados e podem também prejudicar a fecundidade dos insetos. (EDMONDS *et al.*, 1996; DE LEO & GALLERANI, 2002; FRANCO *et al.*, 2004).

Callosobruchus maculatus é uma importante praga do feijão de corda (*Vigna unguiculata*) (XAVIER-FILHO, 1992) que expressa proteases cisteínicas em seus intestinos para digerirem as proteínas da dieta, no caso as presentes em sementes secas do feijão (CAMPOS *et al.*, 1989; SILVA & XAVIER-FILHO, 2001). Vários trabalhos foram realizados nos últimos anos mostrando o efeito tóxico de diversas proteínas contra as larvas desse inseto, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (YUNES *et al.*, 1998; MACEDO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002; SIQUEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2002;). No bioensaio contra larvas de *C. maculatus*, no qual concentrações crescentes de ITC (0,5 a 8% p/p) foram adicionadas à dieta artificial, o WD_{50} observado foi de 2,65% e que na concentração 4% o peso das larvas foi 75% do que os das larvas da dieta controle. Macedo e colaboradores (2002) mostraram que um inibidor de tripsina de sementes de *Dimorphandra mollis* também era deletério para larvas de *C. maculatus*, com uma WD_{50} de 0,53%, bem menor do que o encontrado neste trabalho. No entanto, o mecanismo deletério de inibidores de tripsina para estas larvas de insetos que possuem concentrações baixas de enzimas serínicas em seus

intestinos (MURDOCK *et al.*, 1986; SILVA & XAVIER-FILHO, 1991), permanece ainda obscuro; talvez a bifuncionalidade do inibidor de *C. pallida*, baseado em estudos de modelagem, possa esclarecer os resultados das inibições tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

Até o presente momento, apenas um trabalho mostra a presença de proteínas tóxicas de *C. pallida*, porém ainda sem demonstrar seu potencial toxicológico contra insetos. Rego e colaboradores (2002) isolaram uma lectina de *C. pallida*. *C. pallida* e outras espécies dentro do gênero *Crotalaria* foram utilizadas em estudos de toxicidade em mamíferos e aves desde há bastante tempo (DIAZ *et al.*, 2003; NORTON & O'ROURKE, 1979; MCGRATH *et al.*, 1975; LAWS, 1968), embora nenhum deles aponta inibidores de proteinases como causa da toxicidade. Este é o primeiro trabalho mostrando a inibição *in vitro* e *in vivo* de proteinases de insetos-praga por inibidores de *C. pallida*.

6. CONCLUSÕES

- Um inibidor de tripsina do tipo Kunitz do tipo não-competitivo foi purificado de sementes de *C. pallida*. Esse inibidor, denominado ITC, possui massa molecular de 32,5 kDa com duas subunidades ligadas por uma ponte dissulfeto, com K_i de $8,8 \times 10^{-7}$.
- ITC possui forte inibição *in vitro* para enzimas digestivas de três insetos-pragas (*A. argillacea*, *S. frugiperda*, *C. capitata* e *C. maculatus*) e inibição moderada para enzimas digestivas de *A. grandis*, *Z. subfasciatus* e *P. interpunctela*.
- O inibidor ITC diminuiu em 26% a massa das larvas de *C. capitata* quando adicionado a 0,1% em dieta artificial.
- Em ensaios *in vivo* para *Callosobruchus maculatus*, ITC foi deletério quando adicionado em semente artificial, com um WD_{50} de 2,65%.

7. BIBLIOGRAFIA

Abe, K., Kondo, H. & Arai, S. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. **Agric. Biol. Chem.** 51, 2763-2768. 1987.

Abe, M., Abe K., Kuroda, M. & Arai, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. **Eur. J. Biochem.**, 209(3): 933-7. 1992.

Adam, Z. Chloroplast Proteases: Possible Regulators of Gene Expression? **Biochimie** 82:647-654. 2000.

Aguirre, C., Valdes-Rodriguez, S., Mendonza-Hernández, G., Rojo-Domínguez, A., Blanco-Labra, A. A novel 8,7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from the large grain borer *Prostephanus truncates* (Coleoptera: Bostrichidae). **Comp. Biochem. Physiol. B.** 138:81-89. 2004.

Applebaum, S. W. Biochemistry of Digestion. In: Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Farmacology, eds., Kerkut, G. A. & Gilbert, L. I. New York, 4, 279- 311. 1985.

Araújo, C. L. Purificação e Caracterização de um inibidor de tripsina presente em sementes de tamarindo (*Tamarindus indica*). Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2002.

Ardelt, W. & Laskowski, M. Jr. Effect of single amino acid replacements on the thermodynamics of the reactive site peptide bond hydrolysis in ovomucoid third domain. **Journal Molec. Biol.** 220, 1045-1053. 1991.

Augustyniak, J. Dabert, M. & Wypijewski, K. Transgenes in plants: protection against viruses and insects. **Acta Physiol. Plant.**, 19(4), 561-569. 1997.

Barbieri, L., Battelli, M. G., Stirpe, F. Ribosome-Inactivating Proteins from Plants. **Biochim. Biophys. Acta.** 1154: 237-282. 1993.

Barret, A. J., Rawlings, N.D., Davies, M. E., Machleidt, W., Salvesen, G. & Turk, V. In: Barret, A. J. & Salvesen, G., (eds.), **Proteinases Inhibitors**. Elsevier Amsterdam, 515-569. 1986.

Barton, K. A., Whiteley, H. R., Yang, N-S. *Bacillus thuringiensis* σ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteram insects. **Plant Physiol.** 85:1103-1109. 1987.

Batista, I. F. C., Oliva, M. L. V., Araújo, M. S., Sampaio, M. U., Richardson, M., Fritz, H., Sampaio, C. A. M. Primary structure of a kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Phytochemistry**, 41(4): 1017-1022. 1996.

- Benrey, B., Callejas, A., Rios, L., Oyama, K., Denno, R. F. The Effects of Domestication of *Brassica* and *Phaseolus* on the Interaction Between Phytophagous Insects and Parasitoids. **Biological Control**. 11:130-140. 1998.
- Bernardi, R., Tedeschi, G., Ronchih, S., Palmieri, S. Isolation and some molecular properties of a Trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia lubialis* Hubner (Lepidoptera; Pyralidae). **Insect Biochem. Molec. Biol.** 26(9):883-889. 1996.
- Bode, W. & Huber, R. Natural Protein Proteinase Inhibitor and their Interaction with Proteinases. **Eur. J. Biochem.**, 204, 433-451. 1992.
- Bonadé-Bottino, M., Lerin, J., Zaccomer, B., Jouanin, L. Physiological adaptation explains the insensitivity of *Baris coerulescens* to transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin I. **Ins. Biochem. Mol. Biol.** 29(2):131-138. 1999.
- Boulter, C. J., Jongsma, M. A. Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemLineata*) adapt to proteinase inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. **J. Insect Physiol.** 41(12):1071-1078. 1995.
- Bown, D. P., Wilkinson, W. S., Gatehouse, J. A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene **Ins. Biochem. Mol. Biol.** 27(7):625-638. 1997.
- Broadway, R. M. & Duffey, S.S. Plant Proteinase Inhibitors: Mechanism of Action and Effect on the Growth and Digestive Physiology of Larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, 32, 827-833. 1986.
- Broadway, R. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? **J. Ins. Physiol.** 41(2):107-116. 1995.
- Broadway, R. M., Dietary regulation of serine proteinases that are resistant to serine proteinase inhibitors. **J. Ins. Physiol.** 43(9):855-874. 1997.
- Brow, W. M. & Dziegielewska, K. M. Friends and relations of the cystatin superfamily--new members and their evolution. **Protein Sci.**, 6(1):5-12. 1997.
- Brzin, J. & Kidric, M. Proteinases and Their Inhibitors in Plants: Role in Normal Growth and Response to Various Stress Conditions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 15(13): 421-467. 1995.
- Burgess, E. P. J., Main, C. A., Stevens, P. S., Christeller, J. T., Gatehouse, A. M. R., Laing, W. A. Effects of protease inhibitor concentration and combinations on the survival, growth and gut enzyme activities of the black field cricket, *Teleogryllus commodus*. **J. Ins. Physiol.** 40(9):803-811. 1994.
- Campos, F. A. P., Xavier-Filho, J., Silva, C. P., Ary, M. B. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). **Comp. Biochem. Physiol. B.** 92:51-57. 1989.

Carlini, C. R., Grossi-de-Sá, M. F. Plant Toxic Proteins with Insecticidal Properties. A Review on their Potentialities as Bioinsecticides. **Toxicon**. 40:1515-1539. 2002.

Castillo, M. A., Moya, P., Hernández, E., Primo-Yúfera, E. Susceptibility of *Ceratitis capitata* Wiedemann (Diptera: Tephritidae) to Entomopathogenic Fungi and Their Extracts. **Biological Control**. 19(3):274-282. 2000.

Casu, R. E., Pearson, R. D., Jarmey, J. M., Cadogan, L. C., Riding, G. A., Tellam, R. L. Excretory/secretory chymotrypsin from *Lucilia cuprina*: purification, enzymatic specificity and amino acid sequence deduced from mRNA. **Insect Mol. Biol.** 3(4):201-211. 1994.

Cavalcanti, M. S. M., Oliva, M. L. V., Fritz, H., Jochum, M., Mentele, R., Sampaio, M., Coelho, L. C. B. B., Batista I. F. C., Sampaio, C. A. M.. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with one disulfide bridge purified from *Swartzia pickellii*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 291:635-639. 2002.

Chapman, R. Structure of digestive system, In: Kerkut, G.A. (Ed.), **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, vol. 4, New York: Pergamon Press, 165-211. 1985.

Chen. T. E., Huang, D. J., Lin, Y. H. Isolation and Characterization of a Serine Proteinase from the Storage Roots of Sweet Potato (*Ipomea batatas* [L.] Lam.). **Plant Science**, 166:1019-1026. 2004.

Christeller, J. T., Laing, W. A., Markwick, N. P., Burgess, E. P. J. Midgut Protease Activities in 12 Phytophagous Lepidopteran Larvae: Dietary and Protease Inhibitor Interactions. **Insect Biochem. Molec. Biol.** 22(7):735-746. 1992.

Cohen, E. Chitin Synthesis and Degradation as Targets for Pesticide Action. **Arch. Insect Biochem. Physiol.** 22:245-261. 1993.

Colebatch, G. East, P., Cooper, P. Preliminary characterisation of digestive proteases of the green mirid, *Creontiades dilutus* (Hemiptera: Miridae). **Insect Biochem Mol Biol.** 31(5):415-423. 2001.

Datta, K., Usha, R., Dutta, S. K., Singh, M. A Comparative Study of the Winged Bean Protease Inhibitors and their Interaction with Proteases. **Plant Physiol. Biochem.** 39:949-959. 2001.

De Leo, F. Bonadé-Bottino, M. A., Ceci, L. R., Gallerani, R., Jouanin, L. Opposite effects on *Spodoptera littoralis* larvae of high expression level of a trypsin proteinase inhibitor in transgenic plants. **Plant Physiol.** 118:997-1004. 1998.

De Leo, F., Bonadé-Bottino, M., Ceci, L. R., Gallerani, R., Jouanin, L. Effect of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 31:593-602. 2001.

De Leo, F., Gallerani, R. The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis* larvae fed on transgenic plants. **Ins. Biochem. Mol. Biol.** 32:489-496. 2002.

Diaz, G. J., Roldan, L. P., Cortes, A. Intoxication of *Crotalaria pallida* seeds to growing broiler chicks. **Vet Hum Toxicol.** 45(4):187-9. 2003.

Dixon, M., Webber, E. C., Therone, C. J. R., Tripton, K. F. Inhibition and Activation. In *Enzymes*. Academic Press, New York, pp 332-381. 1979.

Drenth, J., Kalk, K. H. & Swen, H. M. Binding of chloromethyl ketone substrate analogues to crystalline papain. **Biochemistry**, 15(17): 3731-8. 1976.

Edmonds, H. S., Gatehouse, L. N., Hilder, V. A., Gatehouse, A.M. The inhibitory effects of cysteine protease inhibitor, oryzacystatin, on digestive proteases and on larval survival and development of the southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*). **Entomol. Exp. Appl.** 78: 83–94. 1996.

Erlich, P.R. & Raven, P.H. Butterflies and Plants: a study in coevolution. **Evolution**, 18. 1964.

Estelle, M. Proteases and Cellular Regulation in Plants. **Curr. Opin. Plant Biol.** 4:252-260. 2001.

Fabrick, J., Benhke, C., Czaplá, T., Bala, K., Rao, A. G., Kramer, K. J., Reeck, G. R. Effects of a potato cysteine proteinase inhibitor on midgut proteolytic enzyme activity and growth of the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Ins. Biochem. Mol. Biol.** 32:405-415. 2002.

Faisal, M., MacIntyre, E. A., Adham, K. G., Tall., B. D., Kothary, M. H., La Peyre, J. F. Evidence for the Presence of Protease Inhibitors in Eastern (*Crassostrea virginica*) and Pacific (*Crassostrea gigas*) Oysters. **Comp. Biochem. Physiol. B.** 121:161-168. 1998.

Falco, M. C., Silva-Filho, M. C. Expression of Soybean Proteinase Inhibitors in Transgenic Sugarcane Plants: Effects on Natural Defense Against *Diatrea saccharalis*. **Plant Physiol. Biochem.** 41:761-766. 2003.

Foissac, X., Edwards, M. G., Du, J. P., Gatehouse, A. M., Gatehouse, J. A. Putative protein digestion in a sap-sucking homopteran plant pest (rice brown plant hopper; *Nilaparvata lugens*: Delphacidae) - identification of trypsin-like and cathepsin B-like proteases. **Insect Biochem Mol Biol.** 32(9):967-978. 2002.

Franco, O. L., Grossi-de-Sá, M. F., Sales, M. P., Mello, L., V., Oliveira, A. S., Digden, D. J. Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*. **Proteins**, 49(3):335-341. 2002.

Franco, O. L., Santos, R. C., Batista, J. A. N., Mendes, A. C. M., Araújo, M. A. M., Monnerat, R. G., Grossi-de-Sá, M. F., Freitas, S. M. Effects of Black-Eyed Pea Trypsin/Chymotrypsin inhibitor on Proteolytic Activity and on Development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, 63:343-349. 2003.

Franco, O. L., Dias, S. C., Magalhães, C. P., Monteiro, A. C. S., Bloch Jr., C., Melo, F. R., Oliveira-Neto, O. B., Monnerat, R. G., Grossi-de-Sá, M. F. Effects of Kunitz Trypsin Inhibitor on the Cotton Boll Weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry**, 65:81-89. 2004.

Fushiki, T., Kazuo, I., Two Hypothesis on the feedback regulation of pancreatic enzyme secretion. **FASEB J.**, 3:121-126. 1989.

Garcia, V. A., Freire, M. G. M., Novello, J. C., Marangoni, S., Macedo, M. L. R. Trypsin Inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization and activity against pest proteases. **The Protein Journal**. 23(5):343-350. 2004.

Garcia-Olmedo, S. F., Sanchez, M. G., Gómez, R. L., Royo, J., Carbonero, P. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and α -amylases. **Oxford Survey Plant Molecular and Cell Biology**. 4:275-334. 1987.

Gatehouse, A. M. R. & Gatehouse, J. A. Identifying Proteins with Insecticidal Activity: Use of Encoding Genes to Produce Insect-Resistant Transgenic Crops. **Pestic. Sci.** 52, 165-175. 1998.

Gatehouse, A. M. R., Norton, E., Davison, G. M., Babbé, S. M., Newell, C. A., Gatehouse, J. A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. **J. Insect Physiol.** 45(6):545-558. 1999.

Girard, C., Le Métayer, M., Bonadé-Bottino, M., Pham-Delègue, M., Jouanin, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. **Ins. Biochem. Mol. Biol.**, .28(4):229-237. 1998.

Gruden K., Strukelj B., Popovic T., Lenarcic B., Bevec T., Brzin J., Kregar I., Herzgog-Velikonja J., Stiekma W. J., Bosh D. & Jongsma M. A. The cysteine activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemLineata* Say) guts, wich is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors. **Insect Biochem. Molec. Biol**, 28, 549-560. 1998.

Hildebrand, D. F., Rodriguez, J. G., Brown, G. C., Luu, K. T., Volden, C. S. Peroxidative responses of leaves in two soybeans genotypes injured by two-spotted spider mites (Acari:Tetranychidae). **J. Econ. Entomol.** 79:1459-1464. 1986.

Hilder, V., Gatehouse, A., Sheerman, S., Barker, R. & Boulter, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, 330, 160-163. 1987.

Houseman, J. G., Downe, A. E. R. The effects of three metabolic inhibitors on digestive proteinase production in *Rhodnius prolixus* Stål (Hemiptera: Reduviidae). **J. Insect Physiol.** 29(4):317-321. 1983.

Hung, C. H., Lee, M. C., Lin, J. Y. Inactivation of *Acacia confusa* Trypsin Inhibitor by Site-Specific Mutagenesis. **FEBS Letters**. 353:312-314. 1994.

Ishimoto, M., Chrispeels, M. J. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of α -amylase inhibitor in the common bean. **Plant Physiol.** 111:393-401. 1996.

Janzen, D. H., Juster, H. B., Bell, E. A. Toxicity of secondary compounds of the seed-eating larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. **Phytochem.** 16:223-227. 1977.

Janzen, D. H., Ryan, C. A., Liener, I. E., Pearce, G. 1986. Potentially defensive proteins in mature seeds of 59 species of tropical Leguminosae. **J. Chem. Ecol.** 12:1469-1480. 1986.

Joly, A., B. Botânica – Introdução à Taxonomia Vegetal, 5^a ed., **Companhia Editora Nacional**, São Paulo, SP, 1979.

Jongsma, M. A. & Bolter, C. J. The adaptation of Insects to Plant Protease Inhibitors. **J. Insect Physiol.** 43(10):885-895. 1997.

Jouanin, L., Bonadé-Bottino, M., Girard, C., Morrot, G., Giband, M. Transgenic plants for insect resistance. **Plant Science**, 131(1):1-11. 1998.

Keilova, H., Tomasek, V. Naturally occurring inhibitors of intracellular proteinases. **Acta Biol. Med. Ger.** 36(11-12):1873-81. 1977.

Kimura, M., Ikeda, T., Fukumoto, D., Yamasaki, N. & Yonekura, M. Primary structure of a cysteine proteinase inhibitor from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill). **Biosci Biotechnol Biochem.**, 59(12):2328-9. 1995.

Kondo, H., Abe, K. & Emorim, Y. & ARAI, S. Papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a rice seed cysteine proteinase inhibitor, depends on the central Gln-Val-Val-Ala-Gly region conserved among cystatin superfamily members. **J. Biochem**, 109(2):294-8. 1991.

Krattiger, A. F. Insect resistance in Crops: a Case Study of *Bacillus thuringiensis* (bt) and its Transfer to Developing Countries. **ISAAA Briefs**, 2:42. 1997.

Krauchenco, S., Pando, S. C., Marangoni, S., Polikarpov, I. Crystal structure of the Kunitz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds. **Biochem. Biophys. Res. Commu.** 312:1303-1308. 2003.

Kudo, N., Nishiyama M., Sasaki, H., Abe, K., Arai, S. & Tanokura, M. Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Studies of a Rice Cyseine Proteinase Inhibitor, Oryzacystatin-I. **J. Biochem.** 123, 568-570. 1998.

Kunitz, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **J. Gen. Physiol.** 29:149-154.

Lam, E., Pontier, D., del Pozo, O. Die and Let Live – Programmed Cell Death in Plants. **Curr. Opin. Plant Biol.** 2:502-507. 1999.

Lam, W., Coast, G. M., Rayne, R. C. Isolation and characterization of two chymotrypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 29(7):653-660. 1999.

Lam, W., Coast, G. M., Rayne, R. C. Characterization of multiple trypsin from the midgut of *Locusta migratoria*. **Insect Biochem. Mol. Biol.** 30(1):85-94. 2000.

Laskowski, M. Jr. & Kato, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annu Rev. Biochem.** 49, 593-626. 1980.

Lawrence, P. K. & Koundal, K. R. Plant Protease Inhibitors in Control of Phytophagous Insects. **Electronic Journal of Biotechnology.** 5(1):93-109.

Laws, L. Toxicity of *Crotalaria mucronata* to sheep. **Aust Vet J.** 44(10):453-5. 1968. 2002.

Lemos, F. J. A., Campos, F. A. P., Silva, C. P., Xavier-Filho, J. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Entomol. Exp. Appl.** 56:219-227. 1990.

Lin, J. Y., Chu, S. C., Wu, H. C., Hsieh, Y. S. Trypsin inhibitor from the seeds of *Acacia confusa*. **J. Biochem.** 110:879-883. 1991.

Macedo, M. L. R., Matos, D. G. G., Machado, O. L. T., Marangoni, S., Novello, J. C. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. **Phytochemistry**, 54:553-558. 2000.

Macedo, M. L. R., Mello, G. C., Freire, M. G. M., Novello, J. C., Marangoni, S., Matos, D. G. G. Effect of a Trypsin Inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the Development of *Callosobruchus maculatus*. **Plant Physiol. Biochem.** 40:891-898. 2002.

Macedo, M. L. R., Freire, M. G. M., Cabrini, E. C., Toyama, M. H., Novello, J. C., Marangoni, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Biochimica et Biophysica Acta.** 1621:170-182. 2003.

Mares, M., Meloun, B., Pavlik, M., Kotska, V., Baudy, M. Primary structure of cathepsin D inhibitor from potatoes and its structure relationship to soybean trypsin inhibitor family. **FEBS Letters**. 251(1-2):94-98. 1989.

Masoud, S. A., Ding, X., Johnson, L. B., White F. F., Reeck, G. R. Expression of a corn bifunctional inhibitor of serine proteinases and insect α -amylases in transgenic tobacco plants. **Plant Science**, 115:59-69. 1996.

McGrath, J. P., Duncan J. R., Munnell, J. F. *Crotalaria spectabilis* toxicity in swine: characterization of the renal glomerular lesion. **J Comp Pathol**. 85(2):185-94. 1975.

McManus, M. T. & Burgess, E. P. J. Effects of the Soybean (Kunitz) Trypsin Inhibitor on the Growth and Digestive Proteases of Larvae of *Spodoptera litura*. **J. Ins. Physiol** 41, 731-738. 1995.

Minagawa, S., Ishida, M., Shimakura, K., Nagashima, Y., Shiomi, K. Isolation and Amino Acid Sequences of Two Kunitz-type Protease Inhibitors from the Sea Anemone *Anthopleura* aff. *xanthogrammica*. **Comp. Biochem. Physiol**. 118B(2):381-386. 1997.

Moffatt, M. R., Blakemore, D., Lehane, M. J. Studies on the synthesis and secretion of trypsin in the midgut of *Stomoxys calcitrans*. **Comp. Biochem. Physiol**. 110 (2):291-300. 1995.

Muharsini, S., Dalrymple, B., Vuocolo, T., Hamilton, S., Willadsen, P., Wijffels, G. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae of *Chrysomya bezziana*, the Old World Screwworm fly. **Insect Biochem Mol Biol**. 31(11):1029-40. 2001.

Muller, H. M., Vizioli. I., Della Torre, A., Crisanti, A. Temporal and spatial expression of serine protease genes in *Anopheles gambiae*. **Parasitologia**. 35:73-76. 1993.

Murdock, L. L., Brookhart, G., Dunn, P. E., Foard, D. E., Kelley, S., Kitch, L., Shade, E. R., Shukle, R. H. & Wolfson, J. L. Cysteine Digestive Proteinases in Coleoptera. **Comp. Biochem. Physiol**. 87B:4, 783-787. 1987.

Negreiros, A. N. M., Carvalho, M. M., Xavier-Filho, J., Blanco-Labra, A., Shewry, P. R., Richardson, M. The Complete Amino Acid Sequence of the Major Kunitz Trypsin Inhibitor from the Seeds of *Prosopis juliflora*. **Phytochemistry**, 30:9, 2829-2833. 1991.

Neurath, H. The Diversity of Proteolytic Enzymes. In: Beynon, R. J. & Bond, J. S. (ed.), **Proteolytic Enzymes: A Practical Approach**. New York, Oxford University Press, 1, 1-14. 1996.

Ng, T. B. (2004). **Peptides and Proteins from Fungi**. *Peptides*, 25, 1055-1073.

Norton, J. H., O'Rourke, P. K. Toxicity of *Crotalaria Goreensis* for chickens. **Aust Vet J.** 55(4):173-174. 1979.

Ogunwolu, E. O., Reagan, T. E., Flynn, J. L., Hensley, S. D. Effects of *Diatraea saccharalis* (F.) (Lepidoptera: Pyralidae) damage and stalk rot fungi in sugarcane yield in Louisiana. **Crop. Prot.** 10:57-61. 1991.

Ohtsubo, K. I., Richardson, M. The amino acid sequence of a 20kDa bifunctional subtilisin/ α -amylase inhibitor from brain of rice (*Oryza sativa* L.) seeds. **FEBS.** 309(1):68-72. 1992.

Oliveira, A. S., Pereira, R. A., Lima, L. M., Morais A. H. A., Melo, F., Franco, O. L., Bloch Jr, C., Grossi de Sá, M.F. & Sales, M.P. Activity toward Bruchid Pest of a Kunitz-Type Inhibitor from Seeds of the Algaroba tree (*Prosopis juliflora* d.c.). **Pesticide Biochemistry and Physiology.** 72, 122-132. 2002.

Oliveira, A. S., Xavier-Filho, J., Sales, M. P. Cysteine Proteinase and Cystatins. **Braz. arch. biol. Technol.** 46(1):91-104. 2003.

Osman, M. A., Reid, P. M., Weber, C. W. Thermal inactivation of therapy bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH. **Food Chemistry.** 78:419:423. 2002.

Pando, L. A., Di Cicero, L., Novello, J. C., Oliveira, B., Weder, J. K., Marangoni, S. Isolation and characterization of a new trypsin inhibitor from *Crotalaria paulina* seeds. **IUBMB Life.** 48(5):519-23. 1999.

Pando, S. C., Oliva, M. L. V., Sampaio, C. A. M., Di Ciero, L., Novello, J. C., Marangoni, S. Primary Sequence Determination of a Kunitz Inhibitor Isolated from *Delonix Regia* Seeds. **Phytochemistry.** 57:625-631. 2001.

Pando, S. C., Carvalho, D. D., Toyama, M. H., Di Ciero, L., Novello, J. C., Pascholatti, S. F., Marangoni, S. Purification and characterization of a lectin from *Crotalaria paulina* seeds. **Prot. J.** 25(7):437-444. 2004.

Pandya, M. J., Smith, D. A., Yarwood, A., Gilroy, J., Richardson, M. Complete amino acid sequences of two trypsin inhibitors from buckwheat seed. **Phytochemistry**, 43 (2): 327-331. 1996.

Park, K. S., Cheong J. J., Lee, S. J., Suh, M. C., Choi, D. A novel Proteinase Inhibitor Gene Transiently Induced by Tobacco Mosaic Virus Infection. **Biophys. et Biochim. Acta.** 1942:509-512. 2000.

Peng, J. H., Black, L. L. Increased proteinase inhibitor activity in response to infection of resistant tomato plants by *Phytophthora infestans*. **Phytopatol.** 66:958-963. 1976.

Peuman, W. J., Van Damme, E. J. M. Lectin as Plant Defense ProteInsect **Plant Physiol.** 109:347-352. 1995.

Ramalho-Ortigao, J. M., Kamhawi, S., Rowton, E. D., Ribeiro, J. M., Valenzuela, J. G. Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. **Insect Biochem Mol Biol.** 33(2):163-171. 2003.

Rego, E. J. L., Carvalho, D. D., Marangoni, S., Oliveira, B., Novello, J. C. (2002). Lectins from seeds of *Crotalaria pallida* (Smooth rattlebox). **Phytochemistry.** 60:441-446.

Reeck, G. R., Kramer, K. J., Baker, J. E., Kanost, M. R., Fabrick J. A., Behnke, C. A. Proteinase inhibitors and resistance of transgenic plants to insects. In: Carozzi, N. & Koziel, M., eds. **Advances in insect control: the role of transgenic plants.** Londres, Taylor and Francis, pp. 157-183. 1997.

Richardson, M. J., Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Richardson, M. J., ed. **Methods in plant biochemistry.** New York, Academic Press pp 259-305. 1991.

Roby, D., Toppan, A., Esquerre-Tugaye, M-T. Cell surfaces in plant-microorganism interactions. VIII. Increased proteinase inhibitor activity in melo plants in response to infection by *Colletotrichum lagenarium* or to treatment with an elicitor fraction of this fungus. **Mol. Plant Physiol.** 30:453-460. 1987.

Rosenthal, G. A. & Janzen, D. H. Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites. New York, Academic Press. 1979.

Ryan, C. A. & Walker-Simmons, M. Plant Proteinases. In: Marcus, A. (ed.), **The Biochemistry of Plants.** New York, Academic Press, 6, 321-350. 1981.

Ryan, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens. **Annu. Re. Phytopathol.** 28, 425- 449. 1990.

Sales, M. P., Gerhardt, I. R., Grossi-de-Sá, M. F., Xavier-Filho, J. Do Legume Storage Proteins Play a Role in Defending Seeds against Bruchids? **Plant Physiol.** 124:515:522. 2000.

Schuler, H. T., Poppy, M. G., Kerry B. R. & Denholm L. Insect-Resistant Transgenic Plants, **Tibtech** 16, 168-174. 1998.

Shewry, P., R. & Lucas, J., A. Plant Proteins that Confer Resistance to Pests and Pathogens. In: Callow, J. (ed.), **Advances in Botanical Research.** London, Academic Press, 26, 136-192. 1997.

Shivaraj, B., Pattabiraman, T.N. Natural plant enzyme inhibitors. Characterization of an unusual alpha-amylase/trypsin inhibitor from ragi (*Eleusine coracana* Geartn.). **Biochem J.** 193(1):29-36. 1981.

Silva, C. P., Xavier-Filho, J. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and

Zabrotes subfasciatus (BOH.) (Coleoptera: bruchidae). **Comp. Biochem. Physiol.** 99(3):529-533. 1991.

Silva, J. G., Meixner, M. D., McPheron, B. A., Steck, G. J., Sheppard, W. S. Recent Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) infestations in Florida--a genetic perspective. **J Econ Entomol.** 96(6):1711-1718. 2003.

Siqueira-Júnior, C. L., Fernandes, K. V. S., Machado O. L. T., Cunha, M., Gomes, V. M., Moura, D., Jacinto, T. 87kDa tomato cystatin exhibits properties of a defense protein and forms protein crystals In prosystemin overexpressing transgenic plants. **Plant Physiol. Biochem.** 40:247-254. 2002.

Solomon, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E., Levine, A. The Involvement of Cysteine Protease and Protease Inhibitor Genes in the Regulation of Programmed Cell Death in Plants. **The Plant Cell.** 11:431-443. 1999.

Stubbs, M.T., Laber, B., Bode, W., Huber, R., Jerala, R., Lenarcick, B. & Turk, V. The refined 2.4 Å x-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. **EMBO Journal**, 9, 1939-1947. 1990.

Syntichaki, P., Xu, K., Driscoll, M., Tavernarakis, N. Specific Aspartyl and Calpain Proteases are Required for Neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, 419, 939-944. 2002.

Tanskul, S., Oda, K., Oyama, H., Noparatnaraporn, N., Tsunemi, M., Takada, K. Substrate Specificity of Alkaline Serine Protease Isolated from Photosintetic Bacterium, *Rubrivivax gelatinosus* KDD51. **Biochem. and Biophys. Res. Comm.** 309, 547-551. 2003.

Telang, M., Srinivasan, A., Patankar, A., Harsulkar, A., Joshi, V., DamLe, A., Deshpande, V., Sainani, M., Ranjekar, P., Gupta, G., Birah, A., Rani, S., Kachole, M., Giri, A., Gupta, V. Bitter ground proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *spodoptera Litura*. **Phytochem.** 63:643-652. 2003.

Teles, R. C. L., Souza, E. M. T., Calderon, L. A., Freitas, S. M. Purification and Ph stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. **Phytochemistry.** 65:793-799. 2004.

Terra, W., Ferreira, C. & De Bianchi, A. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance. **J. Insect. Physiol.**, 25, 487-494. 1979.

Terra, W., Cristofolletti, P. Midgut proteinases in three divergent species of Coleoptera. **Comp. Biochem. Physiol.** 113(4):725-730. 1996.

Terra, W. Evolution of digestive systems of insects. **Ann. Ver. Entomol.**, 35, 181-200. 1990.

Tornero, P., Conejero, V., Vera, P. Identification of a New Patogen-Induced Member of the Subtilisin-Like Processing Protease Family from Plants. **J. Biol. Chem.**, 272(22), 14412-14419. 1997.

Troncoso, M. F., Zolezzi, P. C., Hellman, U., Wolfenstein-Todel, C. A novel trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds, with lectin-like properties, triggers rat lymphoma cell apoptosis. **Arch. Biochem. Biophys.** 411:93-104. 2003.

Turk, V. & Bode, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. **FEBS Lett.** 22;285(2):213-9. 1991.

Vaeck, M., Reynaerts, A., Höfte, H. Transgenic plants protected from insect attack. **Nature.** 327:33-37. 1987.

Valueva, T. A., Revina, T. A., Kladnitskaya, G. V., Mosolov, V. V. Kunitz-type Proteinase Inhibitors from Intact and *Phytophthora*-Infected Potato Tubers. **FEBS Lett.** 426:131-134. 1998.

Van der Hoorn, R. A. L. & Jones, J. D. G. The Plant Proteolytic Machinery and its Role in Defence. **Curr. Opin. In Plant Biol.** 7:400-407. 2004.

Vázquez-arista, M., Smith, R. H., Martínez-gallardo, N. A., Blanco-Labra, A. Enzymatic differences in the digestive system of the adult and larva of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). **J. Stored. Prod. Res.** 35(2):167-174. 1999.

Wagner, W., Mohrlen, F., Schnetter, W. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabaeidae). **Insect Biochem Mol Biol.** 32(7):803-14. 2002.

Walder, J. M. M. Produção de moscas-das-frutas e seus inimigos naturais: associação de moscas estéreis e controle biológico. In: Controle biológico no Brasil: Parasitóides e predadores. José Roberto Pastoli Parra ed. Ed. Manole, São Paulo, 2002.

Walker, A. J., Ford, L., Majerus, M. E. N., Geoghegan, a. e., Birch, N., Gatehouse, J. A. & Gatehouse, A. M. R. Characterization of the Mid-gut Digestive Proteinase Activity of the Two-spot Ladybird (*Adalia bipunctata*) and its Sensitivity to Proteinase Inhibitors. **Insect Biochem. And Mol. Biol.**, 28, 173-180. 1997.

Wigglescoorth, V. The Principles of Insect Physiology, 6th ed., London: Methuen. 1972.

Williams, B. L., Wilson, K. A Biologist's Guide to Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Edward Arnold Publishers Ltd. Londres. 1975.

Wong R.C. H., Fong, W.P., Ng, T.B. Multiple trypsin inhibitors from *Momordica cochinchinensis* seeds, the Chinese drug mubiezhi. **Peptides**, 25:163-169. 2004.

Wu, Y., LLeveLLyn, D., Mathews, A., Dennis, E. S. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. **Plant Cell Rep.** 16:696-699. 1997.

Xavier-Filho, J. The Biological Roles of Serine and Cysteine Proteinase Inhibitors in Plants. **R. Bras. Fisiol. Veg.** 4(1):1-6. 1992.

Xavier-Filho, J. Sementes e Suas Defesas Contra Insetos. Imprensa da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE. 1993.

Zeng, F., Zhu, Y. C., Cohen, A. C. Molecular cloning and partial characterization of a trypsin-like protein in salivary glands of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). **Insect Biochem Mol Biol.** 32(4):455-64. 2002.

<http://www.fao.org/docrep/006/Y5160E/y5160e00.HTM>. State of Food and Agriculture – FAO, 2003-2004. 2004.

<http://www.cnpa.embrapa.br/algodao/arboreopragas.html>

<http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/leguminosas/crotalaria.html>