



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

CHAYENNE ALVES DE SÁ

**AVALIAÇÃO DE RISCO PRECOCE DO JABURETOX: UM PEPTÍDEO
INSETICIDA DERIVADO DA UREASE DE *Canavalia ensiformis* COM FINS DE
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA**

FORTALEZA

2018

CHAYENNE ALVES DE SÁ

AVALIAÇÃO DE RISCO PRECOCE DO JABURETOX: UM PEPTÍDEO
INSETICIDA DERIVADO DA UREASE DE *Canavalia ensiformis* COM FINS DE
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Davi Felipe Farias

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S111a Sá, Chayenne Alves de.
Avaliação de risco precoce do Jaburetox: Um peptídeo inseticida derivado da urease de *Canavalia ensiformis* com fins de aplicação biotecnológica / Chayenne Alves de Sá. – 2018.
63 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Davi Felipe Farias.
Coorientação: Prof. Dr. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho.
1. Feijão-de-porco. 2. peptídeo inseticida. 3. biossegurança alimentar. 4. culturas transgênicas. I. Título.
CDD 572
-

CHAYENNE ALVES DE SÁ

AVALIAÇÃO DE RISCO PRECOCE DO JABURETOX: UM PEPTÍDEO
INSETICIDA DERIVADO DA UREASE DE *Canavalia ensiformis* COM FINS DE
APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Davi Felipe Farias (Orientador)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

Dr. Murilo Siqueira Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus, a meu orientador Prof^o Dr. Davi Felipe Farias, a minha co-orientadora Prof^a Dr^a Ana de Fátima, aos meus pais, minha irmã, meu esposo, minha filha e a todos que fizeram parte deste projeto.

AGRADECIMENTOS

A Deus que permitiu que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida e que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

A minha mãe Geyza de Sá, por todo amor e apoio dedicado a mim e por sempre me mostrar com respeito, humildade e coragem que existe um mundo cheio de possibilidades de realizações pessoais e profissionais.

Ao meu orientador Prof. Dr. Davi Felipe Farias por ter me recebido com tanto carinho. Obrigada por toda paciência para comigo, todos os ensinamentos e confiança no meu trabalho. Todo seu comprometimento e entusiasmo me inspiram à reflexão, questionamento e busca pelo crescimento pessoal e profissional. Gratidão por ter sido meu mestre!

A minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Ana de Fátima Fontenele Urano Carvalho, por ter me acolhido em seu laboratório e dedicado parte do seu tempo para me ensinar, todos os dias, como cada atitude, cada palavra, cada gesto. Obrigada por ter feito parte da realização deste trabalho.

A Universidade Federal do Ceará por ser o local da realização de um sonho e pelas lições que aqui aprendi.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica na pessoa do coordenador Prof. Dr. Bruno Anderson Matias da Rocha, representando todos os docentes e colaboradores que contribuíram para o fechamento deste ciclo acadêmico.

Ao Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias nas estimadas pessoas de Íris Flávia, Danton Luís, Marília da Guia e Filipi Calbaizer, mesmo pela distância e pouco tempo de convivência, conseguiram criar um vínculo muito especial para mim.

Ao Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais, onde este trabalho foi desenvolvido principalmente aos que me auxiliaram na concepção deste projeto, Leonardo Rogério Vieira e Luiz Carlos Pereira Almeida Filho.

Ao laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia na pessoa da professora Dr^a. Denise Cavalcanti Hissa e Dr^a. Mirela Leite Pereira por todo apoio, ensinamentos e disponibilidade de me ajudar na realização e discussão desse trabalho.

Ao laboratório de Toxinas Vegetais, na pessoa de Helen Paula por sempre me receber e me ajudar com a realização deste projeto.

Ao professor Dr. Murilo Siqueira Alves e a professora Dr^a. Ana Cristina de Oliveira Monteiro Moreira por gentilmente aceitarem o convite de compor a banca examinadora deste trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais: Joaquim Lopes, Profa. Dr^a. Érika Mota, Wendell Cavalcante, Jackeline Medeiros, Lady Clarissa, Leonardo Vieira, Luiz Carlos, Thaís Borges, Pedro Matheus, Rute Xavier, Fernando Moreira, Berenice Alves, Felipe Castro, Emanuel Francelino, Thiago Almeida. Cada um com seu jeito próprio me conquistaram e alegraram meus dias. Obrigada por todos os ensinamentos e convivência.

A Pedro Jonas, que foi para mim um desafio grande e temeroso. Obrigada por ter acreditado e confiado em mim.

A seu Valdenor, por todas as conversas e incentivos diários, Oss!

Aos queridos da turma de mestrado 2016.2, Leonardo Lopes, Valéria Chaves, Halisson Araújo, Cinthia Queiroz, Valéria Freitas, Paulo Vinicius e Mighay Lovera que tanto foram companheiros nessa jornada. Nós conseguimos!

ESTE TRABALHO FOI REALIZADO GRAÇAS AO AUXÍLIO DAS SEGUINTE UNIDADES E INSTITUIÇÕES

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará;

Laboratório de Avaliação de Risco de Novas Tecnologias, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba;

Laboratório de Bioprospecção de Recursos Regionais, Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará;

Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia, Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará;

Laboratório de Toxinas Vegetais, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

RESUMO

Jaburetox (JBTX) é um peptídeo derivado de uma isoforma da urease de *Canavalia ensiformis* que apresenta potente atividade inseticida e, portanto, tem sido considerado como um candidato promissor para o desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas (GM). Entretanto, para garantir a segurança de uso de culturas transgênicas expressando novos peptídeos e proteínas exógenos, testes de biossegurança alimentar devem ser realizados para identificar riscos associados a essas moléculas bioativas. Dentre as abordagens mais utilizadas para avaliação de risco de proteínas recombinantes, tem sido amplamente aceito o método de duas etapas baseado em pesos de evidência, proposto pelo Instituto Internacional de Ciências da Vida (ILSI). Essa abordagem destaca-se das demais por levar em conta a análise dos dados obtidos de maneira holística. A etapa I consiste em: 1. Pesquisa do histórico de uso seguro; 2. Análises de bioinformática; 3. Modo de ação e especificidade da proteína; 4. Análises de digestibilidade *in vitro* e testes de estabilidade à temperatura; e, 5. Estimativa segura dos níveis de expressão e de ingestão dietética dos grãos transformados. Já na etapa II é recomendado um estudo caso-a-caso para cada proteína. Aliada a essa abordagem, o nosso grupo também tem proposto que a avaliação de segurança de novas proteínas seja realizada precocemente dentro da cadeia produtiva de transgênicos. Assim, a avaliação de segurança deixa de ser realizada após o desenvolvimento do transgênico para ser executada ainda nas etapas de prospecção e caracterização da nova proteína, o que efetivamente pode detectar propriedades antinutricionais, tóxicas e/ou alergênicas e, portanto, conduzir a decisões como a exclusão da proteína de uma potencial aplicação biotecnológica ou promover modificações estruturais. Neste contexto, este estudo objetivou realizar a avaliação de risco precoce do peptídeo inseticida JBTX, de sua proteína parental, a urease de *C. ensiformis* (JBU), e da isoforma JBURE II. Para tanto, foi empregada a abordagem do ILSI, com algumas modificações. A partir desta pesquisa, a *C. ensiformis*, JBU e suas proteínas derivadas mostraram ter um histórico de uso seguro; o peptídeo JBTX não mostrou similaridade significativa de sua sequência de aminoácidos primária com proteínas alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais; esse peptídeo mostrou possuir modo de ação pouco compreendido, entretanto, apresentou elevada especificidade contra insetos; JBTX e JBU foram altamente susceptíveis à digestão em fluido gástrico simulado. Tendo como base esses resultados, foi possível concluir que não é esperado risco associado ao consumo desse peptídeo.

Palavras-chave: feijão-de-porco; peptídeo inseticida; biossegurança alimentar; culturas transgênicas.

ABSTRACT

Jaburetox (JBTX) is a peptide derived from a *Canavalia ensiformis* urease isoform which exhibits potent insecticidal activity, and therefore it has been considered a promising candidate for development of genetically modified (GM) crops. However, to ensure the safe use of transgenic cultures expressing new exogenous peptides and proteins, food safety tests have to be performed to identify risks associated to these bioactive molecules. Among the most used approaches to evaluate the risk of recombinant proteins, the two-tiered weight-of-evidence method proposed by the International Life Sciences Institute (ILSI) has been widely accepted. This approach stands out from the others by taking into account the analysis of the data obtained in a holistic way. The stage I consists of: 1. History of safe use research; 2. Bioinformatics analysis; 3. Mode of action and protein specificity; 4. *In vitro* digestibility analysis and temperature stability tests; and, 5. Safe estimation of the levels of expression and dietary intake of the processed grains. In the stage II, a case-by-case study is recommended for each protein. In addition to this approach, our group has also proposed that the safety assessment of new proteins be performed precociously inside of the transgenic production chain. Thus, the safety evaluation is no longer carried out after the development of the transgenic but in the stages of prospecting and characterization of the new protein, which effectively can detect antinutritional, toxic and/or allergenic properties and, therefore, lead to decisions such as the exclusion of the protein from a potential biotechnological application or to promote structural modifications. In this context, this study aimed to perform the early risk assessment of the insecticidal peptide JBTX, its parental protein, the urease of *C. ensiformis* (JBU), and the JBURE II urease isoform. For that, the ILSI approach was used, with some modifications. From this research, *C. ensiformis* species, JBU and its derivative proteins have shown a history of safe use; the JBTX peptide did not show significant similarity of its primary amino acid sequence with allergenic, toxic and/or antinutritional proteins; this peptide showed to have mode of action little understood, however, it presented high specificity against insects. Based on these results, it was possible to conclude that no risk associated with the consumption of this peptide is expected.

Keywords: Jackbean; insecticidal peptide; food safety; transgenic crops.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo tridimensional (A) e sequência primária de aminoácidos (B) do peptídeo Jaburetox (JBTX)	17
Figura 2 - Efeito dos mutantes do JBTX sobre lipossomas unilamelares e atividade inseticida.....	18

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aa	Aminoácidos
BLASTP	“Basic Local Alignment Search Tool protein” (Ferramenta Básica de Alinhamento Local)
BLOSUM	“Blocks of Amino Acid Substitution Matrix” (Matriz de Substituição em Blocos de Aminoácidos)
ConA	Concanavalina A
CNTX	Canatoxina
CTNBio	Brazilian National Technical Commission on Biosafety (Comissão Técnica Nacional de Biossegurança)
FAO	“Food and Agriculture Organization of the United Nations” (Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas)
GM	Geneticamente Modificado
HOSU	“History of safe use” (Histórico de uso seguro)
ILSI	“International Life Sciences Institute” (Instituto Internacional de Ciências da Vida)
JBU	“Jack bean urease”
JBURE II	“Jack bean urease” isoforma II
JBTX	Jaburetox
MEME	“Multiple Em for Motif Elicitation” (Múltiplos Em para Elicitação de Motivo)
MAST	“Motif Alignment and Search Tool” (Ferramenta de Alinhamento e Pesquisa de Motivos)
NCBI	“National Center for Biotechnology Information” (Centro Nacional para Informação sobre Biotecnologia)
OMS	“World Health Organization” (Organização Mundial da Saúde)
PubMed	“Public/Publisher MEDLINE”
SDAP	“Structural Database of Allergenic Proteins” (Banco de Dados Estrutural de Proteínas Alergênicas)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	Bioinseticidas	14
2.2	Jaburetox: peptídeo rocombinante obtido a partir da urease de <i>C. ensiformis</i>	16
2.3	Avaliação de segurança de proteínas biotecnológicas	18
3	ARTIGO	22
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
	REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de culturas transgênicas é um acontecimento recente, assim como o consumo por humanos e animais de seus derivados. Ao passo da explosão de crescimento mundial, há uma predisposição em substituir as proteínas de origem animal nos alimentos e rações por proteínas de origem vegetal, que apresentam melhor eficiência de custo, chegando a corresponder a 40% do peso seco da semente (YAVARI *et al.*, 2016).

Um evento de fundamental importância nesta área foi a inserção de genes que expressam as proteínas entomotóxicas de *Bacillus thuringiensis* que conferem resistência ao ataque de lepidópteros para a planta de *Nicotiana tabacum* (VAECK *et al.*, 1987). Contudo, há dificuldades de aceitação desta nova tecnologia pelos consumidores e surgem, com isso, inquietações acerca da sua biossegurança em humanos e animais (CRAIG *et al.*, 2008; ROCCA & ANDERSEN, 2017; HARTLEY *et al.*, 2016). Desde esse acontecimento, diferentes genes de proteínas que atribuem propriedades de resistência ao ataque de patógenos estão sendo introduzidos em diversas colheitas (CARLINI; GROSSI DE SÁ, 2002; DELANEY *et al.*, 2008; FARIAS *et al.*, 2015).

Nesse contexto, Jaburetox (JBTX) mostrou-se ser tóxico para diferentes insetos pragas tais como *Rhodnius prolixus* e *Oncopeltus fasciatus* (MARTINELLI *et al.*, 2014) e tem sido visto como uma alternativa para criação de plantas geneticamente modificadas.

Porém, para que novos genes sejam introduzidos em culturas, há a necessidade de realização de avaliação de risco com o objetivo de assegurar seu uso seguro (FARIAS, 2013; FARIAS, *et al.*, 2015; PINTO, *et al.*, 2015). Para tanto, nosso grupo tem proposto uma metodologia de avaliação chamada de “avaliação de risco precoce” que tem se mostrado bastante eficaz na identificação de riscos indesejáveis (p. ex. potencial alergênico) dessas moléculas. A avaliação de risco precoce deve acontecer ainda nas etapas de prospecção e caracterização da proteína candidata (PINTO, *et al.*, 2015).

As metodologias de avaliação de risco de proteínas que são candidatas ao desenvolvimento de plantas transgênicas são realizadas de acordo com as recomendações da FAO - “Food and Agriculture Organization of the United Nations” (Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas) e OMS - “World Health Organization” (Organização Mundial da Saúde) que estão sumarizados no documento “Codex Alimentarius Foods Derived from Modern Biotechnology” (Codex, 2009). Uma abordagem para avaliação de risco que tem sido bastante reconhecida foi proposta pelo Instituto Internacional de Ciências da Vida (ILSI). A etapa I compreende em: 1. Pesquisa do histórico de uso seguro; 2. Análises de bioinformática;

3. Modo de ação e especificidade da proteína; 4. Análises de digestibilidade *in vitro* e testes de estabilidade à temperatura; e, 5. Estimativa segura dos níveis de expressão e de ingestão dietética dos grãos transformados. Já na etapa II é recomendado um estudo caso- a-caso para cada proteína. Entretanto, é recomendado que seja realizado um teste de toxicidade aguda em uma espécie de roedor quando se tratar de proteínas inseticidas (DELANEY *et al.*, 2008).

Nesta conjuntura, este estudo teve como objetivo realizar a avaliação de risco precoce do peptídeo inseticida JBTX, de sua proteína parental, a urease de *C. ensiformis* e de uma de suas isoformas a JBURE II. Os testes aqui empregados foram baseados no ILSI, com algumas modificações. Ademais, este projeto contribuiu para o conhecimento sobre a biossegurança alimentar dessas importantes ferramentas biotecnológicas, garantindo a segurança de sua expressão em plantas e assim, minimizando os riscos para o ambiente e sociedade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Proteínas bioinseticidas

Proteínas ditas bioinseticidas são aquelas produzidas por organismos vivos tais como animais, plantas e microorganismos. São utilizados, principalmente, no combate de insetos-praga e possuem as características de serem específicos aos alvos e ditos inócuos aos insetos não-alvo. Quando se fala em segurança ambiental, os bioinseticidas se destacam por apresentarem capacidade de atuação eficaz em pouca quantidade e não possibilitarem o desenvolvimento de resistência quando comparado aos inseticidas químicos (SENTHIL-NATHAN, 2015).

Existem diferentes tipos de bioinseticidas, derivados de diferentes organismos como bioinseticidas derivados da bactéria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que apresentam como característica a produção de cristais entomotóxicos que são utilizados na agricultura em diferentes culturas tais como milho, algodão e soja. O modo de ação específico e a segurança dos produtos à base de *Bt* (FARIAS, 2015) estão relacionados pelo menos, em parte, com a produção de uma inclusão cristalina parasporal na célula bacteriana durante a esporulação ou na fase estacionária (VILAS-BÔAS *et al.* 2007; VILAS-BÔAS, 2012). A produção destes cristais protéicos representa uma característica típica dessa bactéria e confere atividade entomopatogênica a diferentes espécies pertencentes a muitas ordens de insetos, destacando-se Lepidoptera, Diptera e Coleoptera. Os cristais de *Bt* são formados principalmente por proteínas denominadas Cry (Crystal), anteriormente chamadas δ -endotoxinas, liberadas prioritariamente ao final da esporulação (BRAVO *et al.* 2007, ANGELO *et al.*, 2010; VILAS-BÔAS, 2012). A toxicidade de *Bt* é comumente atribuída à inclusão parasporal (δ -endotoxinas), essas toxinas, quando ingeridas pelas larvas, podem danificar o tecido intestinal, levando ao não mais funcionamento do intestino. Depois disso, a larva morre em decorrência do efeito de fome e comprometimento do epitélio intestinal (BETZ *et al.*, 2000; DARBOUX *et al.*, 2001; SENTHIL-NATHAN, 2015).

Dentro desta classe também se destacam as lectinas, que são proteínas ou glicoproteínas que tem capacidade de se ligarem reversivelmente a mono/oligossacarídeos através de ligações de hidrogênio e interações de Van der Waals (LANNOO & VAN DAMME, 2010). A expressão de lectinas em plantas se dá devido a ação de injúrias ou fitopatógenos. Essas lectinas, presentes no citosol, atuam diretamente na defesa da planta (PROCÓPIO *et al.*, 2017). Lectinas também desempenham a função de aglutinar eritrócitos e também podem

apresentar papel antimicrobiano indireto, por meio da interferência no processo de aderência e invasão na célula hospedeira, impedido que o patógeno se estabeleça e se reproduza, tornando-o alvo para as defesas presentes na corrente sanguínea (PROCÓPIO, 2017). Em insetos, as lectinas apresentam atividade inseticida por meio da inibição do crescimento através de interações com a região epitelial do intestino do inseto, dificultando o trânsito intestinal (SILVA, 2017).

Outro exemplo são as proteínas inativadoras de ribossomos de plantas (RIPs) que exibem atividade de *N*-glicosidase de RNA ribossômico (RNAr) altamente específica e são capazes de inativar cataliticamente ribossomos de células eucarióticas. Essa inativação ocorre pela clivagem de um resíduo específico de adenina do RNAr (SCHROT; WENG; MELZIG, 2015; SHANG, *et al*, 2015). Existem basicamente dois tipos diferentes de RIPs: tipo 1 (RIP 1) e tipo 2 (RIP 2). As RIPs de tipo 1 são proteases de cadeia única, enquanto as RIPs de tipo 2 consistem em duas cadeias polipeptídicas (cadeias A e B) que são ligadas por uma ponte dissulfureto. A cadeia A contém a função enzimática e a cadeia B apresenta propriedades de lectina, permitindo que essas proteínas se liguem a resíduos de galactose na superfície celular (SCHROT; WENG; MELZIG, 2015).

Outra classe de grande diversidade compreende o grupo dos inibidores de proteases. Proteases são enzimas que hidrolizam irreversivelmente uma ligação peptídica por meio de um ataque nucleofílico e posterior hidrólise. Elas são classificadas de acordo com o grupo presente no sítio catalítico: serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), aspartato (Asp), glutamato (Glu) ou zinco, nas chamadas metaloproteases. As enzimas também podem ser classificadas em endo- e exopeptidases de acordo com a posição de clivagem da ligação peptídica (SIKLOS; BENAÏSSA; THATCHER, 2015). Os inibidores de proteases agem por meio da inibição das enzimas digestivas de insetos, trazendo prejuízos dentre os quais, a deficiência de aminoácidos e consequente atraso no desenvolvimento, seguido de morte. Também são evidenciados hiperprodução de proteases por meio do inseto a fim de suprir a carência deixada pelo inibidor, levando a depleção de aminoácidos essenciais (ZHU-SALZMAN; ZENG, 2015)

Proteínas que também apresentam efeito inseticida têm sido estudadas ao longo dos anos, são as ureases. A urease de *Canavalia ensiformis* foi a primeira enzima a ser cristalizada, feito conseguido por James Sumner (1887-1955) em 1946. Esse marco rendeu a Sumner o prêmio Nobel de Química devido à grande contribuição para a enzimologia moderna, ao mostrar a natureza proteica das enzimas (FOLLMER, 2008). A urease (EC 3.5.1.5; ureia amidohidrolase) é uma enzima dependente de níquel que cataliza a hidrólise da ureia em duas

moléculas de amônia e uma de dióxido de carbono (SUMNER, 1926). As ureases estão presentes em todos os organismos vivos, mas são predominantemente encontradas em espécies vegetais das famílias Cucurbitaceae e Leguminosae (Fabaceae) (LOPÉZ, 2012).

A urease de *C. ensiformis* é a enzima melhor e mais caracterizada dentre as ureases. Ela apresenta três isoformas bem descritas: 1) A “Jack bean urease” do tipo I (JBURE-I ou JBU) que é a principal enzima e se apresenta formando hexâmeros de subunidades idênticas de 90 kDa e dois átomos de níquel em cada subunidade (FOLLMER, 2008); 2) A Canatoxina (CNTX), uma isoforma neurotóxica, é uma proteína dimérica com subunidades idênticas de 95 kDa capaz de promover convulsões e morte em animais quando injetada intraperitonealmente (CARLINI; GUIMARÃES, 1981) e também causa mortalidade em insetos com digestão baseada em proteases do tipo catepsina (CARLINI, *et al.*, 1997); 3) A “jack bean urease” do tipo II (JBURE-II) que é uma isoforma menor que as demais, apresentando 78 kDa (PIRES-ALVES, 2003; MULINARI, 2011).

2.2 Jaburetox: peptídeo rocombinante obtido a partir da urease de *C. ensiformis*

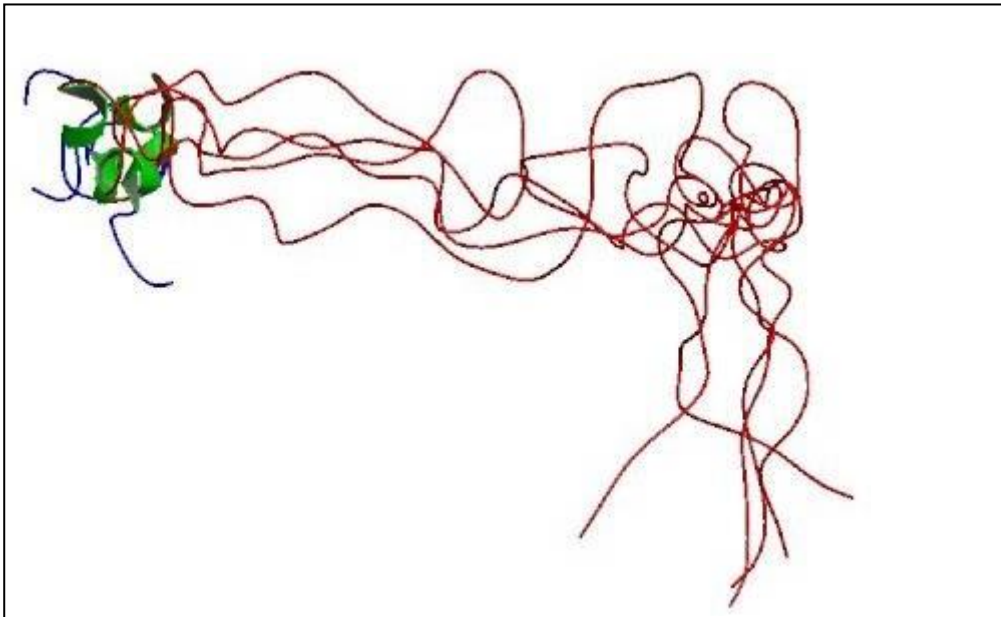
Anos após a sua descoberta, foi demonstrado que o efeito inseticida da CNTX é dependente da liberação de um peptídeo tóxico a partir da hidrólise de ligações peptídicas específicas pela ação de proteases do tipo catepsina (proteases cisteínicas), que são características do trato digestivo de algumas espécies de insetos. Esse peptídeo de 10 kDa foi isolado e, então, denominado de Pepcanatox (FERREIRA-DASILVA *et al.*, 2000). Desde então, ficou estabelecido que o Pepcanatox é o responsável pela letalidade da urease em insetos que possuem enzimas digestivas do tipo catepsina (CARLINI, *et al.*, 1997).

O efeito entomotóxico da CNTX, dependente da liberação do Pepcanatox por enzimas do tipo catepsinas dos insetos, foi demonstrado para os insetos praga *Callosobruchus maculatus*, *Dysdercus peruvianus* e *Oncopeltus fasciatus* (Ferreira Dasilva *et al.*, 2000, Staniscuaski *et al.* al., 2005; Defferrari *et al.*, 2011). A partir da sequência N-terminal do Pepcanatox e utilizando o cDNA da isoforma II de JBU (JBURE-IIb) como molde, o peptídeo recombinante denominado Jaburetox-2Ec foi obtido por expressão heteróloga em *Escherichia coli* contendo o epítipo viral V5 e uma cauda contendo 6 histidinas. Este peptídeo apresentou um amplo espectro de atividade inseticida, incluindo insetos não suscetíveis a CNTX, como *Spodoptera frugiperda* (Mulinari *et al.*, 2007). Posteriormente, uma variante do peptídeo Jaburetox-2Ec foi clonada e expressa em *E. coli* sem o epítipo viral V5. Esse peptídeo, chamado de Jaburetox (JBTX) apresenta em sua sequência completa 93 aminoácidos

(POSTAL, *et al*, 2012). Na Figura 2 (A), encontramos uma representação da estrutura deste peptídeo e na Figura 2 (B), a sequência de aminoácidos

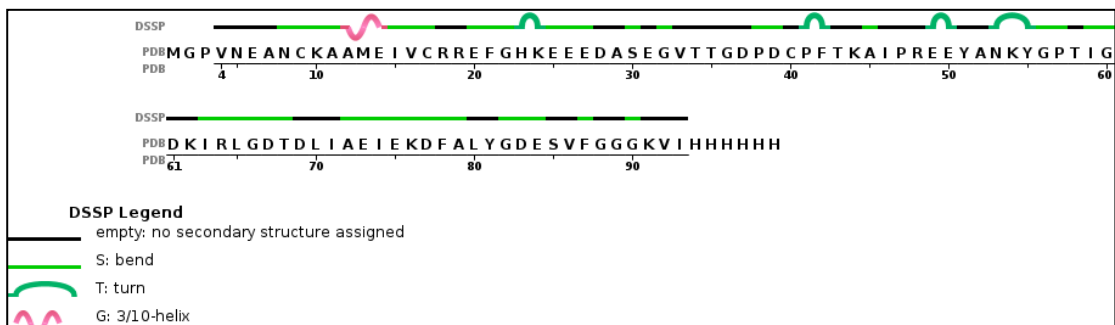
Figura 1 – Modelo tridimensional (A) e sequência primária de aminoácidos (B) do peptídeo Jaburetox (JBTX);

A



Fonte: Disponível em: <https://www.rcsb.org/3d-view/2MM8/1>

B

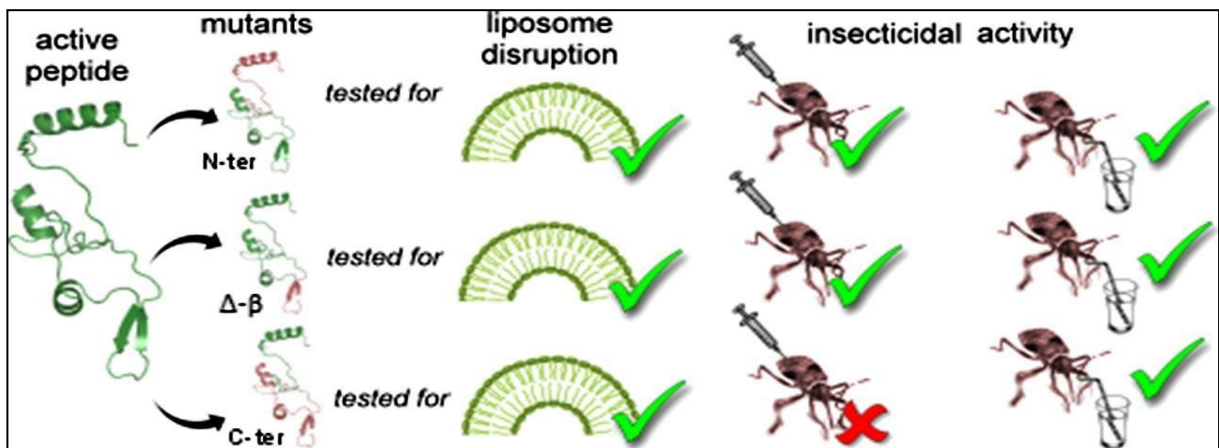


Fonte: HELEN, *et al*, 2000. Disponível em: <https://www.rcsb.org/pdb/explore/remediatedSequence.do?structureId=2MM8>

Estudos que buscam maior entendimento sobre o modo de ação desse peptídeo vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de identificar qual região do peptídeo está diretamente relacionada aos efeitos tóxicos. Para tanto, foram desenvolvidas três formas variantes denominadas Jbtx $\Delta\beta$, Jbtx N-ter e Jbtx C-ter. Sendo, o Jbtx $\Delta\beta$ uma variação do peptídeo sem a porção β -grampo (aminoácidos 61-74), o Jbtx N-ter apenas a porção N-terminal do peptídeo (aminoácidos 1-44) e o Jbtx C-terminal contendo apenas a porção C-terminal da sequência

(aminoácidos 45-93). A partir deste estudo pôde-se inferir que a porção N-terminal é a responsável pela atividade entomotóxica, entretanto, a porção referente à região do C-terminal favorece, de maneira significativa, a interação com membranas celulares. (MARTINELLI, *et al.*, 2014) (Figura 3). Corroborando com os dados de interação do peptídeo Jaburetox com membranas, outros resultados mostraram que tanto o peptídeo selvagem, quanto as formas variantes são capazes de adentrar em bicamadas lipídicas e formar canais iônicos cátion seletivos (PIOVESAN, *et al.*, 2014). A toxicidade do Jaburetox é restrita a insetos e não desempenha nenhum tipo de reação adversa sobre camundongos ou ratos quando administrado por via oral (STANISÇUASKI, *et al.*, 2005).

Figura 2 – Representação esquemática da abordagem experimental realizada para avaliar os efeitos de mutantes do peptídeo JBTX sobre lipossomas unilamelares e mortalidade dos insetos. $\Delta\beta$ - forma mutante com deleção do grampo β ; N-ter – forma mutante correspondente a porção N-terminal do peptídeo; C-ter – forma mutante do peptídeo correspondente a porção C-terminal e que contém o grampo β .



Fonte: MARTINELLI *et al.*, 2014.

Por apresentar essa característica, JBTX têm sido visto como uma proteína candidata para o desenvolvimento de plantas Geneticamente Modificadas (GM) a fim de conferir resistência a insetos praga. Entretanto, para utilização de novas proteínas com potencial biotecnológico, devem ser realizados testes de avaliação de risco a fim de garantir o seu uso seguro (FARIAS, 2013).

2.3 Avaliação de segurança de proteínas biotecnológicas

Para se atender a necessidade de alimentos da população mundial há urgência em se desenvolver culturas que apresentem propriedades de proteção contra pragas agrícolas, tais

como insetos e fungos fitopatogênicos, para que cada vez menos seja necessária a aplicação produtos químicos e, assim, diminuir os impactos sobre a saúde dos consumidores e do ambiente (CARLINI; GROSSI DE SÁ, 2002; YOUNG, *et al.*, 2012). Para tanto, a utilização do próprio mecanismo de defesa das plantas tem sido levado em consideração. A partir disso, vários genes exógenos que codificam para diferentes proteínas que conferem características de proteção a predadores e patógenos têm sido inseridos no genoma de diversas colheitas. Entretanto, antes que essas culturas transgênicas sejam liberadas para comercialização é necessário que as proteínas exógenas sejam rigorosamente avaliadas quanto a sua segurança de consumo para humanos e animais, o que é chamado de avaliação de biossegurança alimentar ou apenas de avaliação de risco (CARLINI; GROSSI DE SÁ, 2002; DELANEY *et al.*, 2008; FARIAS *et al.*, 2015).

O termo “biossegurança alimentar”, trata de todas as questões referentes à segurança do consumo de alimentos GMs e seus derivados por animais e humanos, sendo, seu consumo, tão seguro quanto sua contraparte convencional (FARIAS, *et al.*, 2013).

O conjunto de parâmetros utilizados para identificar se há um perigo associado ao consumo, preocupação nutricional ou de segurança relativo a um OGM (organismo geneticamente modificado) é chamado de Equilavência Substancial. Evidências obtidas de diferentes tipos de informações de segurança coletadas sobre o novo alimento são utilizadas na abordagem desta avaliação, visto que não há um critério fixo estabelecido. A princípio são considerados conhecimentos acerca de potenciais reações alérgicas associadas a espécie fonte do gene exógeno utilizado. Posteriormente, são realizadas comparações de homologia de sequências com alérgenos conhecidos. As proteínas recombinantes também são analisadas quanto a sua estabilidade quando submetidas a ensaios de digestibilidade *in vitro*, preferivelmente com pepsina, no intuito de simular o trato gástrico humano, tendo como conclusão a probabilidade de a proteína ser ou não um alérgeno alimentar (FAO/WHO, 2001) A Organização de Alimentos e Agricultura das Nações Unidas e a Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO) determinaram metodologias para avaliação de segurança de culturas geneticamente modificadas dentro da análise de risco geral, compreendendo aspectos como o risco associado à saúde humana, social e ambiental a serem implantados pelos órgãos regulamentadores de cada país (FAO/WHO, 2001), tal como a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) no Brasil. Esta Comissão foi criada através da Lei nº 11.105, de 24 de março de 2005, a fim de prestar assistência, consultoria técnica e assessoramento ao Governo Federal em todos os aspectos relativos à Política Nacional de Biossegurança no que se refere a OGMs. A CTNBio é responsável pela elaboração de normas técnicas de segurança e pareceres

técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do ambiente, bem como diretrizes para construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados (CTNBio, 2018).

Os parâmetros de segurança empregados para avaliações de segurança de OGMs visam minimizar ou até mesmo extinguir a chance do consumo de um produto que ofereça riscos ao ambiente e a comunidade. Para tanto, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas e praticadas para avaliação de segurança de produtos de origem transgênica por organizações internacionais tais como, “Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)”, “World Health Organization (WHO)” e “International Life Sciences Institute (ILSI)” (OLIVEIRA; WATANABE, 2004).

Um consórcio da FAO/WHO elaborou um documento, o Codex Alimentarius, que visa proteger a saúde dos consumidores e garantir práticas igualitárias no comércio internacional de alimentos. A Comissão do Codex Alimentarius estabeleceu a Força Tarefa Intergovernamental sobre Alimentos Derivados de Biotecnologia (“TFFBT - Intergovernmental Task Force on Food Derived from Biotechnology”) a fim de produzir referências, regras ou recomendações para alimentos derivados da biotecnologia moderna ou características inseridas em alimentos por meio dessa tecnologia, com base em evidências científicas e análise de risco (CODEX ALIMENTARIUS, 2009). O Codex Alimentarius é adotado em muitos países membros da Organização Mundial do Comércio (OMC) para regulamentação da segurança de consumo de transgênicos (HAMMOND *et al.*, 2013; FARIAS, 2013).

Diante do exposto, a inserção de proteínas exógenas merece destaque, visto que, proteínas que são inseridas em culturas por meio da tecnologia do DNA recombinante não fazem parte, tradicionalmente, da alimentação de humanos e/ou animais e podem produzir compostos distintos da sua contraparte convencional. Formação de padrões de metabólitos novos ou modificados, silenciamento, ativação ou desativação de genes, são exemplos de efeitos não intencionais que podem ser provocados pela modificação genética (AALBERSE, 2000). Dessa maneira, é de fundamental importância que seja realizada avaliação de risco dessas proteínas com o intuito de prevenir a inserção de proteínas alergênicas, tóxicas, antinutricionais ou com outros efeitos adversos já descritos.

Para tanto, o Instituto Internacional de Ciências da Vida (ILSI) propôs uma abordagem alternativa que tem sido bastante aceita. Essa abordagem destaca-se das demais por levar em conta a análise dos dados obtidos de maneira holística. Compreende duas etapas, que

abragem análises distintas e recomenda que o valor preditivo de cada evidência deva ser bem compreendido a fim de conferir a certos dados, maior relevância que a outros no decorrer da avaliação, adicionando significância maior para a avaliação total (DELANEY *et al.*, 2008).

A etapa I compreende a identificação do perigo potencial: 1. Pesquisa do histórico de uso seguro (“HOSU - History of Safe Use”) (CONSTABLE *et al.*, 2007); 2. Análises de bioinformática; 3. Modo de ação e especificidade da proteína; 4. Análises de digestibilidade *in vitro* e testes de estabilidade à temperatura; e, 5. Estimativa segura dos níveis de expressão e de ingestão dietética dos grãos transformados. Os resultados obtidos a partir da primeira etapa podem revelar dados suficientes sobre a segurança da proteína a ser inserida para expressão, e assim assegurar sua utilização para alimentação humana e/ou animal.

Já na etapa II é recomendado um estudo caso-a-caso. Todavia, no caso de proteínas inseticidas, é recomendado que seja realizado um teste de toxicidade aguda (dose única e/ou doses repetidas), em uma espécie de roedor, realizados por administração oral, por se tratar da via de exposição mais provável de interação com a proteína transgênia (DELANEY *et al.*, 2008; CODEX ALIMENTARIUS, 2009).

A metodologia sugerida pelo ILSI contempla a todas as exigências propostas pelo Codex Alimentarius no que diz respeito à avaliação de biossegurança alimentar de novas proteínas. Além disto, o órgão responsável por conduzir e assentir a liberação de OGMs, a CTNBio, também emprega esta abordagem para a avaliação de risco de novas proteínas.

Uma variação desse método tem sido proposta pelo nosso grupo, denominada de “avaliação de risco precoce”, que ocorre ainda nas etapas de descrição da proteína “candidata”, auxiliando no reconhecimento de potenciais riscos (p. ex. potencial alergênico) antes de sua utilização no desenvolvimento de culturas transgênicas. Este modelo tem se mostrado bastante eficaz (FARIAS *et al.*, 2015; PINTO, *et al.*, 2015).

Assim, esse método foi escolhido para a avaliação de biossegurança da proteína candidata à transgenia, JBTX, objeto de estudo deste trabalho.

3 ARTIGO

**ESTE TRABALHO SERÁ SUBMETIDO A REVISTA FOOD AND
CHEMICAL TOXICOLOGY, QUE POSSUI FATOR DE IMPACTO 3,97
(QUALIS A2 NO COMITÊ DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS II DA CAPES)**

Risk assessment of the antifungal and insecticidal peptide Jaburetox and its parental protein the Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease

Chayenne Alves Sá^a, Leonardo Rogério Vieira^a, Luiz Carlos Pereira Almeida Filho^b, Fernanda Cortez Lopes^c, Ilka Maria Vasconcelos^a, Fernanda Staniscuaski^{c,d}, Célia Regina Carlini^{c,e}, Ana Fontenele Urano Carvalho^{a,b} and Davi Felipe Farias^{a,f*}

^aGraduate Program in Biochemistry, Federal University of Ceará, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil.

^bDepartment of Biology, Federal University of Ceará, 60440-900, Fortaleza, CE, Brazil.

^cCenter of Biotechnology and Graduate Program in Cellular and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, building 43431, 91501-970, Porto Alegre, Brazil.

^dDepartment of Molecular Biology and Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, building 43431, 91501-970, Porto Alegre, Brazil.

^eBrain Institute (Instituto do Cérebro-INSCER), Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga 6690, building 63, CEP 90610-000, Porto Alegre, Brazil.

^fLaboratory for Risk Assessment of Novel Technologies – LabRisk, Department of Molecular Biology, Federal University of Paraíba, 58051-900, João Pessoa, Brazil.

*Corresponding author:

E-mail: davi@dbm.ufpb.br; Phone: +55 83 3216 7633

Abbreviations:

AA – amino acids

CNTX – Canatoxin

CTNBio - Brazilian National Technical Commission on Biosafety

HOSU – History of safe use

JBU- Jack bean urease

JBURE II- Jack bean urease isoform II

JBTX– Jaburetox

SGF – Simulated Gastric Fluid

SIF – Simulated Intestinal Fluid

SDAP – Structural Database of Allergenic Proteins

Highlights

- Jaburetox is an antifungal and insecticidal peptide derived from jack bean urease.
- An early risk assessment of the peptide Jaburetox was performed.
- Jaburetox showed no significant similarity to any allergenic protein.
- Jaburetox was rapidly degraded by pepsin.
- No significant risk may be associated with the consumption of Jaburetox.

ABSTRACT

Jaburetox (JBTX) is an insecticidal and antifungal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease that has been considered a promising candidate for developing genetically modified crops. Thus, an early risk assessment on the food safety of JBTX could provide important information to support its use for biotech purposes. This study aimed to perform the risk assessment of the peptide JBTX following the general recommendations of the two-tiered weight-of-evidence approach proposed by International Life Sciences Institute. The urease of *C. ensiformis* (JBU) and its isoform JBURE IIb (the JBTX parental protein) were also assessed. The history of safe use revealed no hazard reports for the studied proteins. With respect to the mode of action/specificity, the available information shows that JBTX possesses selective activity against insects and fungi. JBTX and JBU primary amino acids sequences showed no relevant similarity to any known toxic, antinutritional or allergenic proteins, while the JBURE IIb sequence matched (> 35% identity) with allergens from *Hevea brasiliensis* and *Oryza sativa* by using the search parameter of 80 amino acids sliding window. Additionally, JBTX and JBU were susceptible to *in vitro* digestibility. Taken these results together, no relevant risk is expected to be associated with the consumption of the JBTX peptide.

Keywords: allergen prediction; candidate protein; food safety assessment; Genetically Modified crops; *in vitro* digestibility.

1. INTRODUCTION

Jack bean (*Canavalia ensiformis*) has historically been a source of interesting proteins (Carlini; Ligabue-Braun, 2016). The jack bean urease (JBU) which was the first enzyme to be crystallized (Sumner, 1926) and the widely studied lectin Concanavalin A (Sridhar; Seena, 2006) are notable examples of the importance of this plant species for the biochemical knowledge. Joining this group, in the early 80's, a toxic protein called Canatoxin (CNTX) was isolated from *C. ensiformis* seeds which is lethal to mice when injected intraperitoneally ($LD_{50} = 2 \text{ mg/kg}$) as well as to insects (Carlini; Guimarães, 1981; Carlini *et al.*, 1997; Follmer *et al.*, 2001). The insecticidal activity of CNTX, selective to insects with cathepsin-based digestion (Carlini, *et al.* 1997), has elicited discussions about its role in plant defense (Stanisçuaski; Carlini, 2012). Years after its isolation, it was discovered that CNTX is actually one of the isoforms of urease found in *C. ensiformis* (Follmer *et al.*, 2001). JBURE-II, later renamed as JBURE-IIb, was identified as a third isoform of *C. ensiformis* urease (Pires-Alves *et al.*, 2003; Mulinari *et al.*, 2011).

The entomotoxic effect of CNTX is partly dependent on the release by insect cathepsins of a 10 kDa internal peptide, called Pepcanatox, as demonstrated for the pest insects *Callosobruchus maculatus*, *Dysdercus peruvianus* and *Oncopeltus fasciatus* (Ferreira Dasilva, *et al.*, 2000, Stanisçuaski *et al.*, 2005; Defferrari *et al.*, 2011). From the N-terminal sequence of Pepcanatox and using the cDNA of the JBU isoform II (JBURE-IIb) as template, the recombinant peptide called Jaburetox-2Ec was obtained by heterologous expression in *Escherichia coli* containing in its sequence a V5 viral epitope and 6 His-tag. This peptide presented a broad spectrum of insecticidal activity including to insects not susceptible to CNTX such as *Spodoptera frugiperda* (Mulinari *et al.*, 2007). Thereafter, a variant of the Jaburetox-2Ec polypeptide was cloned and expressed in *E. coli* without the V5 viral epitope. This peptide with 93 amino acids residues was named Jaburetox (JBTX) (Postal *et al.*, 2012).

JBTX revealed similar insecticidal activity as its V5-containing version and the list of insects affected by the recombinant peptide is continuously increasing, to include other hemipterans such as *O. fasciatus* (Defferrari *et al.*, 2011; Martinelli *et al.*, 2014) and also cockroaches, such as *Blattella germanica*, *Phoetalia pallidum* and *Nauphoeta cinerea* (Martinelli *et al.*, 2014; unpublished results). JBTX shows also remarkable deterrent effects against yeasts and filamentous fungi (Postal *et al.*, 2012; Carlini; Ligabue-Braun, 2016). Because of these features, JBTX has been seen as an alternative for the biological control of agricultural pests through the development of genetically modified (GM) crops.

The development of a transgenic plant follows a sequence of stages ranging from the selection of the biocidal genes to be used in the plant transformation to the risk assessment of the new cultivar for human and environmental health. Often, the safety assessment of the exogenous proteins and the whole plant has been performed only in the later stages. Certainly, this is not an effective approach, because it can lead to the production of plants containing proteins that may potentially present risks to non-target organisms (Farias *et al.*, 2015a). In recent years, our group has proposed that the safety evaluation of recombinant proteins could be done even before obtaining the first transgenic plants in greenhouse, through a process we named early risk assessment of candidate proteins. This approach has been shown to be quite effective in identifying undesirable risks (e.g. allergenic potential) of these molecules prior to their use for the development of biotech products (Farias *et al.*, 2015b; Pinto *et al.*, 2015). Besides, the early risk assessment approach can prevent time and effort consuming activities, as it can help to envisage changes to the protein structure in order to reduce its potential risks (Pinto *et al.*, 2015).

The current strategies for assessing the risk of consumption of recombinant proteins are essentially carried out based on FAO (Food and Agriculture Organization) and WHO (World Health Organization) guidelines presented in the 2nd edition of Codex Alimentarius - Foods Derived from Modern Biotechnology (Codex, 2009). Alternatively, the International Life Sciences Institute (ILSI) proposed a two-tiered (Tier I and II) approach based on weights of evidence that is well accepted (Delaney *et al.*, 2008). This approach stands out from the others by taking into account all data obtained in a holistic way. The first step (Tier I) includes the history of safe use (HOSU) of the protein and the gene-donor species, comparisons of amino acids sequence in protein databases, descriptions of the mode of action and specificity, *in vitro* digestibility and temperature stability tests, as well as the expression level and dietary intake of the recombinant proteins. When the data from Tier I are not conclusive, it is recommended to perform the Tier II that comprises acute and repeated dose toxicological studies and/or hypothesis-based testing (Delaney *et al.*, 2008).

The ILSI two-tiered approach has been initially proposed for recombinant proteins in the later stages of developing transgenic crops. However, this approach has proved to be suitable for early risk assessment of candidate proteins and help to support the safe use of these molecules for developing biotech products. In this context, this study aimed to perform an early risk assessment of JBTX insecticidal peptide and of *C. ensiformis* ureases, JBU and JBURE-IIb (from which JBTX derived), following the general recommendations of ILSI. Adjustments of this approach were proposed, which comprised the exclusion of temperature stability test and

measurements of the expression levels of the recombinant protein in the transgenic plant. On the other hand, the inclusion of additional bioinformatics tools was favored.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. JBTX and JBU samples

The recombinant peptide Jaburetox (JBTX) containing the 6 His-tag and molecular mass of 11.03 kDa was produced following the protocol described by Broll *et al.*, 2017, with some modifications. *Escherichia coli* BL21(DE3)-RIL cells containing pET23a-Jaburetox plasmid were cultured in 15 mL LB (Luria Bertani) broth, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ampicillin e 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chloramphenicol for 16 h, 37 °C and 200 rpm. All the content was inoculated in 1 L of autoinduction medium (tryptone 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, yeast extract 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, glycerol 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, KH_2PO_4 6,8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Na_2HPO_4 7,1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, glucose 0,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, lactose 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and MgSO_4 0.12 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ampicillin and 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ chloramphenicol and cultured at 37 °C, 200 rpm, until $A_{600\text{nm}}$ reaches 0.7. The induction conditions were 16 h, 20 °C and 200 rpm. After, the culture was centrifuged at 8,000 x g for 10 min at 4 °C and the pellet was resuspended in 100 mL of buffer A (tris-HCl 50mM, NaCl 500 mM and imidazole 20 mM, pH 7.5) and the cell suspension was sonicated (20 cycles of 1 min, 20 kHz frequency). The supernatant was separated by centrifugation at 15,000 x g for 40 min at 4 °C and purified in a Ni²⁺-loaded Chelating Sepharose (GE Healthcare) previously equilibrated with buffer A. Unbound proteins were washed with buffer A. We performed a second washing with buffer B (tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM and imidazole 70 mM, pH 7.5) and Jaburetox elution with buffer C (tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM and imidazole 500 mM, pH 7.5). The eluted fraction was loaded in a Hiload Superdex 200 26/60 prep grade, equilibrated with buffer D (sodium phosphate 50 mM, EDTA 1 mM and tris(2-carboxyethyl)phosphine) – TCEP 1 mM, pH 7.5) mounted in an Äkta Purifier system (GE Life Technologies). Urease type C-III from Jack bean (JBU) (hexameric form of Mr 540 kDa) was commercially acquired from Sigma Aldrich Co. (St. Louis, USA). The quality of both samples was assessed by SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The protein samples presented purity > 90%.

2.2. History of safe use of *C. ensiformis* and derived proteins

A literature review on the history of safe use (HOSU) of *C. ensiformis* species, its

ureases and JBTX peptide was performed as described by Constable *et al.* (2007). For the search, the PubMed database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) was accessed from February 21 to May 20, 2018 using the following keywords and their combinations: (a) “Jaburetox”; (b) “Jack bean urease”; (c) “*Canavalia ensiformis*” and “food use”; (d) *Canavalia ensiformis* and “antinutrient”; (e) “*Canavalia ensiformis*” and “allergenicity”; (f) “*Canavalia ensiformis*” and “toxicity”; (g) “*Canavalia ensiformis*” and “review”.

2.3. Bioinformatics analysis

2.3.1. Amino acid sequences of JBTX and *C. ensiformis* ureases

The amino acids sequences of JBTX and *C. ensiformis* ureases, JBU and JBURE Iib, are deposited at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) and presented in Figure 1, with accession numbers of 2MM8A, AAA83831.1 and ACL14297.1, respectively. The sequences were analyzed in FASTA format, and for sequence 2MM8A the histidine tag was removed.

2.3.2. Similarity searches in NCBI non-redundant database

The NCBI non-redundant (NR) general protein database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) was used to search similarities of the full-length amino acid sequences of JBTX and *C. ensiformis* ureases (JBU and JBURE Iib) with those of proteins described as allergenic, toxic and antinutritional. The algorithm used was BLASTP 2.2.31 + and the scoring matrix was BLOSUM62. Specific details of the alignments were carefully checked [E-value <0.01, shared identity > 50%, alignment size and gap frequency ≤ 6] to indicate the relevance of any similarity found, since there is no defined method for the investigation of toxic substances and antinutritional proteins (Herouet-Guicheney *et al.*, 2009). The protein identifiers (ID) of relevant matches were then submitted to the UniProt database (<https://www.uniprot.org/>) in order to find the protein name. Then, the protein was screened in NCBI for reports of adverse effects that could be associated with the consumption of this protein. The NR database was also assessed for comparisons of JBTX, JBU and JBURE Iib sequences by using the limiting keywords "allergen", "antinutrient" and "toxin" for each sequence tested. These data are shown in Table 2. All comparisons were run in the period from March 10 to 18, 2019.

2.3.3. Similarity searches in allergen databases

The full-length amino acid sequences of JBTX, JBU and JBURE IIb were analyzed for checking similarities with known allergenic proteins using the criteria established by FAO/WHO (2001). The sequences were compared to those of allergens deposited in the databases Structural Database of Allergenic Proteins (SDAP) (<http://fermi.utmb.edu/SDAP/>), updated on February 25, 2013; and AllergenOnline, version 19 database (<http://www.allergenonline.com/>), updated on February 10, 2019.

The parameters analyzed were: (1) Full FASTA comparisons using as filter E-value cut-off of 0.01 for detection of identity > 50% (Aalberse, 2000); (2) Comparisons using an 80 aa window for detection of identity > 35%; and (3) Search of short sequences of eight, seven or six contiguous amino acids identical to those of allergenic proteins (Codex, 2009). Additionally, the database of the Subcommittee on Allergen Nomenclature of the WHO and International Union of Societies of Immunology (www.allergen.org) was used in order to verify the presence of allergens related to *C. ensiformis* species. All research was carried out on March 10, 2019.

2.3.4. Searches of N-glycosylation sites

The full-length amino acid sequences of the JBTX, JBU and JBURE IIb were analyzed for the presence of N-glycosylation sites by accessing the NetNGlyc 1.0 Server program (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) as described by Xu *et al.* (2009). The search was run on March 10, 2019.

2.3.5. Searches of allergen motifs

The sequences in FASTA format were also submitted to the AlgPred server, (<http://www.imtech.res.in/raghava/algpred/>) (Saha; Raghava, 2006). This server allows the prediction of allergens based on five approaches. Here, the MEME/MAST approach was employed for JBTX, JBU and JBURE II analysis, where MEME identifies the motifs in a sequence using a position-dependent probability matrix while MAST uses as input a file which shows the descriptions of one or more motifs, in the output format of MEME, and searches in a database of sequences for those that correspond to the allergenic motifs. The search was run on March 10, 2019.

2.4. Mode of action and specificity

A literature review was carried out to gather informations on the mode of action and specificity of JBTX and *C. ensiformis* ureases against insects. For this purpose, the Pubmed database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) was consulted in July 17, 2018 using selected keywords and their combinations, as follows: (1) “Jaburetox”; (2) “mode of action” and “Jaburetox”; (3) “mode of action” and “Jaburetox” and “specificity”; (4) “mode of action” and “Jack bean urease”; (5) “mode of action” and “Jack bean urease” and “specificity”; (6) “mode of action” and “Jack bean urease isoform II”; (7) “mode of action” and “Jack bean urease isoform II” and “specificity”.

2.5. Susceptibility to *in vitro* digestion

The susceptibility to *in vitro* digestion of JBTX and JBU was tested as described by Farias *et al.* (2015b), with minor modifications. The samples were individually incubated in simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) at a concentration of 1 mg/mL in a sequential manner. Briefly, JBTX and JBU were incubated in SGF [34 mM NaCl, 0.07% HCl, pH 2.0 and 1 mg/mL of pepsin (Sigma P7012)] at 37 °C under stirring. Aliquots of 100 µL were collected at different incubation times and mixed with the stopping buffer (2% SDS, 10% Glycerol, 6% β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue, 200 mM DTT and 500 mM Tris-HCl pH 2.0) in ratio of 1:1 (v/v). Then, the remaining solution was adjusted to pH 8.0 with 1 M Tris-HCl and SIF (50 mM potassium phosphate, pH 8.0 and 1 mg/mL pancreatin - Sigma P7545) was added. The mixture was incubated again at 37 °C under stirring, and aliquots of 100 µL were collected and mixed with the stopping buffer (3% SDS, 17% glycerol, 8.5% β-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue, 170 mM DTT, 6 mM PMSF, 200 mM Tris-HCl pH 7.2). For JBTX digestion, the aliquots were collected at 2, 10, 15, 30 min, 1 and 2 h for both fluids. For JBU digestion the aliquots were collected at 30 min, 1 and 2 h incubation in SGF and SIF. The digestibility of JBU and JBTX was monitored by SDS-PAGE (15%) (Laemmli, 1970) and by Tricine-SDS-PAGE (15%) (Schagger; Von Jagow, 1987), respectively.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. History of safe use

Table 1 shows the main results found in the scientific literature for the construction of the history of safe use for *C. ensiformis* species as well as the urease-related proteins (JBU, JBURE-IIb and CNTX) and the derived peptide JBTX. Concerning *C. ensiformis*, the main adverse effects reported were related to the ingestion of Concanavalin A (Con A), a lectin detected in feeding trials with mammals (Kaefer *et al.*, 2013). Indeed, lectins are hemagglutinins, known to be classical antinutritional and toxic proteins, that when ingested cause harmful local and systemic reactions in the consumers (Vasconcelos; Oliveira, 2004). Despite the common origin, *C. ensiformis* ureases and JBTX are distinct proteins/peptide from Con A, and they do not present lectin activity. Several studies with the ureases and the peptide were also gathered. CNTX is lethal to mice but only if administered by intraperitoneal route (Carlini; Guimarães, 1981; Carlini *et al.*, 1984). JBU and CNTX are toxic to insects due in part to the release of a 10 kDa peptide from the native proteins by cathepsin-like enzymes present in the insect midgut (Piovesan *et al.*, 2008; Defferrari *et al.*, 2011; Stanisçuaski *et al.*, 2010; Stanisçuaski; Carlini, 2012), which potentially contribute to increase the specificity of their entomotoxic activity. It is important to mention that the JBTX peptide did not cause acute toxicity in rodents, either when administered intraperitoneally in mice or orally in neonatal rats (Mulinari *et al.*, 2007). Thus, the HOSU of *C. ensiformis* ureases and JBTX do not show greater risks associated to these molecules.

3.2. Bioinformatics results

In silico analysis of the amino acid sequences of JBTX peptide and the JBU and JBURE IIb proteins carried out in the NCBI nr database did not identify relevant match to any known allergenic, toxic and/or antinutritional proteins (Table 2). In detail, JBTX, JBU and JBURE IIb showed similarity to several hypothetical proteins with > 50% identity, but these proteins are mostly ureases and no adverse effects were found related to them. Likewise, when the limiting keyword "toxin" was used many results were found with > 50% identity with alpha-, beta- and/or gamma subunits of ureases from different bacteria species and strains (Supplementary Table 1). When the keywords "Allergen" and "Antinutrient" were used, no significant results were obtained.

The prediction of allergenicity performed in allergen protein databases (AllergenOnline and SDAP) showed no identity > 50% for JBTX peptide, JBU and JBURE IIb proteins to any allergenic protein by using the Full-FASTA search parameter (Table 3). According to Aalberse (2000) it is likely that a protein will cross-react or share the same

epitopes only if they have between 50-70% similarity throughout their amino acid sequence. Using the FAO/WHO identity criterion > 35% in a 80 aa sliding window, the peptide and the JBU did not show identity with any known allergenic proteins (Table 1), differently from the JBURE IIb isoform which showed similarity with a protein in the SDAP database, where 6 alignments corresponded to the Ory s 33 KD allergen of the *Oryza sativa* species, and in AllergenOnline, where an alignment corresponded to the allergen Enolase 2, allergen of the *Hevea brasiliensis*.

The similarity with allergenic proteins was also analyzed using as a parameter searches of six, seven and eight identical contiguous amino acids (Table 3). The six and seven searches were carried out only in SDAP. Using as a parameter the identity of six contiguous amino acids, JBU revealed similarity to seven known allergens being: Per a 3.0201 (*Periplaneta americana* partial allergen), Har a 2.0101 (*Harmonia axyridis* allergen), Gly m 6.05101 (allergen subunit of glycinin A3B4 from *Glycine max*), Pas n 10101 (allergen precursor of *Paspalum notato*), Zea m 1 (*Zea mays* pollen allergen), Ory s 1 (*Oryza sativa* beta-expansin allergen). The JBURE IIb isoform showed similarity with nine allergens, including: Pen ch 35.0101 (*Penicillium chrysogenum* allergen), Tri a 25.0101 (*Triticum aestivum* allergen), Per a 3.0201 (*Periplaneta americana* allergen), Har a 2.0101, Gly m 6.0501, Gly m 6.0401 (Glycine A5A4B3 allergen from *G. max*), Blo t 2.0104 (*Blomia tropicalis* allergen), Ole and 1.0101 (*Olea europaeus* allergen), Tri r 4.0101 (*Trichophyton rubrum* allergen) (Table 1). Using as a parameter the identity of seven contiguous amino acids, only JBU and JBURE IIb showed similarity with the allergen Har to 2.0101 from the lady beetle *H. axyridis*.

Using the search criterium of eight contiguous amino acids, for JBTX, JBU and JBURE IIb no match in the searched databases was found (Table 4). Likewise, when the database of the Subcommittee on Allergens Nomenclature of the WHO and International Union of Societies of Immunology was accessed, no allergen report was found concerning *C. ensiformis* species.

In the search of allergen linear motifs, the MEME/MAST analysis tool of Algpred was accessed, and no match to allergen was identified. For Rathinam *et al.* (2017) linear motifs are characteristic features of allergenic proteins that are difficult to find in non-allergenic proteins.

For Garrido-Arandia (2014), proteins, carbohydrates and lipids constitute a complex group that aid in the recognition of allergens by the human immune system. The physical, biochemical and immunological attributes of plant allergens have been increasingly studied; however, no definitive conclusion has been generated about what makes a protein an

allergen. In this perspective, the *N*-glycosylation pattern is a unique attribute of plant allergens that are not found in mammals and may be related to allergenic sensitization (Garrido-Arandia, 2014). The search for *N*-glycosylation sites using the NetNGlyc 1.0 Server program showed the presence of potential *N*-glycosylation sites for the JBU isoform at positions 31, 233, 572 and 735 and for the JBURE IIb isoform at position 31, 89, 524, 572, 735 and 801. However, no potential *N*-glycosylation sites for the JBTX peptide were found.

3.3. Entomotoxic mode of action and specificity

For a better understanding of the mode of action of Jaburetox, molecular modeling studies have been performed and they suggested the presence of a β -hairpin motif in peptide's the C-terminal portion, subsequently observed in the JBU's crystallographic structure, suggesting that this motif could be implicated in the JBTX's insecticidal and membrane disrupting activities (Mulinari *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2009). However site-directed mutagenesis performed on JBTX for deletion of this β -hairpin motif indicated that it is not necessary for the entomotoxic activity of the peptide (Martinelli *et al.*, 2014). Furthermore NMR studies revealed that this β -hairpin motif disassembles when JBTX is in aqueous medium, where it behaves as an intrinsically disordered molecule (Lopes *et al.*, 2015). Concerning the entomotoxic mode of action of JBTX, Galvani *et al* (2015) were the first to describe the neurotoxicity of the peptide in the kissing bug *Triatoma infestans*. After feeding on a JBTX-containing diet, the peptide was immunolocalized in the insect's brain, where it caused a pronounced inhibition of NOS (nitric oxide synthase) activity. Furthermore, using immunoprecipitation followed by proteomic analysis, JBTX was found to bind to UAP (UDP-*N*-acetylglucosamine pyrophosphorylase) in the insect's brain. Later Fruttero *et al.* (2017) demonstrated that JBTX also targeted the central nervous system of *R. prolixus*, both *in vivo* or *in vitro*, inducing changes of the enzymatic activities of NOS and of UAP, and promoting changes in the levels of UAP and chitin synthase genes expression. The peptide also affected *R. prolixus*' immune system causing hemocyte aggregation and prophenoloxidase activation in a prostaglandin-mediated fashion, thereby rendering the insect more susceptible to bacterial infection (Fruttero *et al.*, 2016; Moyetta *et al.*, 2017).

In the case of *C. ensiformis* ureases, besides canatoxin, JBU was also found to be toxic to insects (Follmer *et al.*, 2004). Several studies were conducted to characterize the insect's proteinase(s) involved in the proteolytic activation of the ureases that lead to the release of entomotoxic peptides in different insects (Carlini *et al.*, 1997; Ferreira-daSilva *et al.*, 2000,

Stanisçuaski *et al.*, 2005; Piovesan *et al.*, 2008; Defferrari *et al.*, 2011; Real-Guerra *et al.*, 2013). Using *R. prolixus* as model, the ureases were shown to disrupt water transport leading to inhibition of diuresis (Stanisçuaski *et al.*, 2009), to alter the muscle contractility of the crop (Stanisçuaski *et al.*, 2010), to induce hemocyte aggregation (Defferrari *et al.*, 2014a) and to cause the death of the insect through a phospholipase A2-mediated mode of action (Defferrari *et al.*, 2014b). The alterations promoted by JBU in cockroaches (*Nauphoeta cinerea*) lowered the heart rate and caused behavioral changes, probably by interfering with cholinergic, octopaminergic and GABAergic neurotransmission at the insect's central nervous system (Carrazoni *et al.*, 2016). Finally JBU was shown to modulate neurotransmitter release at insect neuromuscular junctions, probably by disrupting on the Ca²⁺ machinery at the pre-synaptic region of the neurons (Carrazoni *et al.*, 2018).

3.4. *In vitro* digestibility

Figure 2 shows the high susceptibility of the JBTX peptide to *in vitro* digestion, with extensive degradation in the first 2 min of SGF incubation, and no longer perceived at the end of SGF digestion. As was shown in Figure 3, JBU was also susceptible to *in vitro* digestion but was more resistant to pepsin degradation than JBTX, still being visible in the SDS-PAGE after 2 h of SGF incubation. JBU had its digestion completed in the sequential incubation with pancreatin already in the first 30 min.

Collectively, digestibility studies do not comprise a direct correlation between allergenicity and resistance to digestion (Bøgh; Madsen, 2016). However, when this test is associated with other characteristics of the protein, such as amino acid sequence similarities, it has been pointed out as suitable for assessing the allergenicity potential of a new protein (Codex, 2009). One particularity shared by many food allergens is the ability to resist to gastric and intestinal digestion. Proteins that are resistant to this process have a high probability of reaching the intestinal mucosa where the absorption occurs. Thus, the ability to remain intact in the gastrointestinal tract of monogastric animals is considered a condition for allergenicity (Do *et al.*, 2016).

Most proteins, including the toxic ones, are sensitive to degradation by digestive enzymes and end up losing their activity. The toxic proteins are relatively large which prevents them from being absorbed intact. When they are degraded by digestive enzymes, amino acids are used for nutritional purposes, similarly to dietary proteins (Delaney, 2017).

With the exception of the evaluation of thermal stability and acute toxicity in

rodents, the other tests suggested by the ILSI approach were performed. The thermal stability test has been discouraged because resistance to heat treatment does not correlate with allergenicity and, therefore, it does not provide reliable evidences to the allergenicity of candidate proteins (PRIVALLE *et al.*, 2011). Although there is a recommendation from some regulatory agencies for performing oral acute toxicity test in rodents with insecticidal proteins, we did not perform it because there are already published data reporting that JBTX and JBU are not toxic to mammals when administered by this route (Mulinari *et al.*, 2017). This was reinforced by the data obtained in the present work which showed that these proteins are digested by gastrointestinal proteases. It is important to highlight that the set of tests performed, mostly *in silico*, was enough to reach a robust conclusion about the safety of JBTX.

4. CONCLUSIONS

The data gathered from the risk assessment of the insecticidal peptide Jaburetox supported its safe use in the context of agricultural biotechnology, considering its great potential for the development of transgenic plants resistant to insect and fungal attack. The history of safe use revealed no hazard reports for the peptide and proteins studied. *C. ensiformis* ureases and JBTX possess selective activity against insects and fungi, and JBTX primary amino acid sequence showed no relevant similarity to any known toxic, antinutritional or allergenic proteins. Additionally, JBTX were quite susceptible to degradation in simulated gastric fluid. Therefore, no relevant expected risk is associated with the consumption of JBTX peptide. However, it is noteworthy that the results herein do not exempt JBTX from additional functional characterizations within the scope of the commercial release activities of transgenic plants expressing this peptide.

Acknowledgements

We thank to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, for supporting this research with grants (Grant number 461182-9) and scholarships.

Declaration-of-interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

- Aalberse, R. C. (2000). Structural biology of allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 106(2), 228-238. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.108434>
- Akrapunam, M. A., & Sefa-Dedeh, S. (1997). Jack bean (*Canavalia ensiformis*): Nutrition related aspects and needed nutrition research. *Plant Foods for Human Nutrition*, 50(2), 93-99.
- Barros, P.R., Stassen, H., Freitas, M.S., Carlini, C.R., Nascimento, M.A., & Follmer C. (2009). Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1794(12), 1848-54. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.09.001>.
- Becker-Ritt, A. B., Portugal, C. S., & Carlini, C. R. (2017). Jaburetox: update on a urease-derived peptide. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 23(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0122-y>
- Bøgh, K. L., & Madsen, C. B. (2016). Food allergens: is there a correlation between stability to digestion and allergenicity? *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(9), 1545-1567. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.779569>
- Broll, V., Martinelli, A. H. S., Lopes, F. C., Fruttero, L. L., Zambelli, B., Salladini, E., ... & Carlini, C. R. (2017). Structural analysis of the interaction between Jaburetox, an intrinsically disordered protein, and membrane models. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 159, 849-860. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.08.053>
- Carlini, C. R., & Guimarães, J. A. (1981). Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. *Toxicon*, 19(5), 667-675. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(81\)90104-5](https://doi.org/10.1016/0041-0101(81)90104-5)
- Carlini, C.R., Gomes, C., Guimarães, J.A., Markus, R.P., Sato, H., Trolin, G. (1984). Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 54(3), 161-6. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1984.tb01912.x>
- Carlini, C. R., Oliveira, A. E., Azambuja, P., Xavier-Filho, J., & Wells, M. A. (1997). Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin like enzymes. *Journal of economic entomology*, 90(2), 340-348. <https://doi.org/10.1093/jee/90.2.340>
- Carlini, C. R., & Ligabue-Braun, R. (2016). Ureases as multifunctional toxic proteins: a review. *Toxicon*, 110, 90-109. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.020>
- Carrazoni, T., de Avila Heberle, M., Perin, A. P. A., Zanatta, A. P., Rodrigues, P. V., dos Santos, F. D. M.,... & da Costa, J. C. (2016). Central and peripheral neurotoxicity induced by the Jack Bean Urease (JBU) in *Nauphoeta cinerea* cockroaches. *Toxicology*, 368, 162-171. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.09.007>
- Carrazoni, T., Nguyen, C., Maciel, L.F., Delgado-Cañedo, A., Stewart, B.A., Lange, A.B.,... & Orchard, I. (2018). Jack bean urease modulates neurotransmitter release at insect

neuromuscular junctions. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 146, 63-70.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.02.009>.

Codex Alimentarius. **Food derived from modern biotechnology**. Rome, Italy, Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards programme, food and agriculture Organization of the United Nations. Second Edition. 2009. Disponível em:
<http://www.fao.org/docrep/011/a1554e/a1554e00.htm>. Acesso em: 13 out. 2016.

Constable, A., Jonas, D., Cockburn, A., Davi, A., Edwards, G., Hepburn, P., ... & Samuels, F. (2007). History of safe use as applied to the safety assessment of novel foods and foods derived from genetically modified organisms. *Food and Chemical Toxicology*, 45(12), 2513-2525. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.05.028>

Defferrari, M. S., Demartini, D. R., Marcelino, T. B., Pinto, P. M., & Carlini, C. R. (2011). Insecticidal effect of *Canavalia ensiformis* major urease on nymphs of the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* and characterization of digestive peptidases. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41(6), 388-399. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.008>

Defferrari, M. S., da Silva, R., Orchard, I., & Carlini, C. R. (2014a). Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease induces eicosanoid-modulated hemocyte aggregation in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Toxicon*, 82, 18-25.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.02.006>

Defferrari, M.S., Lee, D.H., Fernandes, C.L., Orchard, I., & Carlini CR. (2014). A phospholipase A2 gene is linked to Jack bean urease toxicity in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(1), 396-405.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.09.016>.

Delaney, B., Astwood, J. D., Cunny, H., Conn, R. E., Herouet-Guicheney, C., MacIntosh, S., ... & Levine, M. (2008). Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. *Food and Chemical Toxicology*, 46, S71-S97.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.01.045>

Delaney, B. (2017). *In vitro* studies with human intestinal epithelial cell line monolayers for protein hazard characterization. *Food and Chemical Toxicology*, 110, 425-433.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.09.029>

Do, A. B., Williams, K., & Toomer, O. T. (2016). *In vitro* digestibility and immunoreactivity of bovine milk proteins. *Food chemistry*, 190, 581-587.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.05.113>

FAO/WHO. 2001. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. FAO, Rome.

Farias, D. F., Peijnenburg, A. A., Grossi-de-Sá, M. F., Carvalho, A. F. (2015a). Food safety knowledge on the *Bt* mutant protein Cry8Ka5 employed in the development of coleopteran-resistant transgenic cotton plants. *Bioengineered*, 6, 323-7. doi:
 10.1080/21655979.2015.1109755.

- Farias, D. F., Viana, M. P., Oliveira, G. R., Santos, V. O., Pinto, C. E. M., Viana, D. A., ... & Carvalho, A. F. U. (2015b). Food safety assessment of Cry8Ka5 mutant protein using Cry1Ac as a control Bt protein. *Food and Chemical Toxicology*, *81*, 81-91. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.04.008>
- Ferreira-DaSilva, C. T., Gombarovits, M. E. C., Masuda, H., Oliveira, C. M., & Carlini, C. R. (2000). Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America*, *44*(4), 162-171. [https://doi.org/10.1002/1520-6327\(200008\)44:4<162::AID-ARCH3>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1520-6327(200008)44:4<162::AID-ARCH3>3.0.CO;2-#)
- Follmer, C., Real-Guerra, R., Wasserman, G.E., Olivera-Severo, D., & Carlini, C.R. (2004). Jackbean, soybean and *Bacillus pasteurii* ureases: biological effects unrelated to ureolytic activity. *European Journal of Biochemistry*, *271*(7), 1357-63. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04046.x>
- Fruttero, L.L., Moyetta, N.R., Uberti, A.F., Grahl, M.V., Lopes, F.C., Broll, V.,... & Carlini, C.R. (2016). Humoral and cellular immune responses induced by the urease-derived peptide Jaburetox in the model organism *Rhodnius prolixus*. *Parasites & Vectors*, *9*(1), 412. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1710-3>.
- Fruttero, L. L., Moyetta, N. R., Krug, M. S., Broll, V., Grahl, M. V. C., Real-Guerra, R.,... & Carlini, C. R. (2017). Jaburetox affects gene expression and enzyme activities in *Rhodnius prolixus*, a Chagas' disease vector. *Acta tropica*, *168*, 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.01.009>
- Follmer, C., Barcellos, G. B., Zingali, R. B., Machado, O. L., Alves, E. W., Barja-Fidalgo, C., ... & Carlini, C. R. (2001). Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5. 1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. *Biochemical Journal*, *360*(1), 217-224. <https://doi.org/10.1042/bj3600217>
- Galvani, G.L., Fruttero, L.L., Coronel, M.F., Nowicki, S., Demartini, D.R., Defferrari, M.S.,... & Settembrini, B.P. (2015). Effect of the urease-derived peptide Jaburetox on the central nervous system of *Triatoma infestans* (Insecta: Heteroptera). *Biochimica et Biophysica Acta*, *1850*(2), 255-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.11.008>
- Garrido-Arandia, M., Murua-García, A., Palacin, A., Tordesillas, L., Gómez-Casado, C., Blanca-Lopez, N.,... & Sánchez-Monge, R. (2014). The role of N-glycosylation in kiwi allergy. *Food science & nutrition*, *2*(3), 260-271. <https://doi.org/10.1002/fsn3.99>
- Herouet-Guicheney, C., Rouquié, D., Freyssinet, M., Currier, T., Martone, A., Zhou, J., ... & Rouan, D. (2009). Safety evaluation of the double mutant 5-enol pyruvylshikimate-3-phosphate synthase (2mEPSPS) from maize that confers tolerance to glyphosate herbicide in transgenic plants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *54*(2), 143-153. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2009.03.005>
- Kaefer, C., Komninou, E. R., Campos, V. F., de Leon, P. M., Arruda, F. V. S., Nascimento, K. S.,... & Seixas, F. K. (2013). Binding pattern and toxicological effects of lectins from genus *Canavalia* on bovine sperm. *Reproductive Toxicology*, *38*, 72-80.

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.03.003>

Kappaun, K., Piovesan, A.R., Carlini, C.R., & Ligabue-Braun, R. (2018). Ureases: historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – a review. *Journal of Advanced Research*, 13, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.05.010>

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680. <https://doi.org/10.1038/227680a0>

Lopes, F. C., Dobrovolska, O., Real-Guerra, R., Broll, V., Zambelli, B., Musiani, F., ... & Ciurli, S. (2015). Pliable natural biocide: Jaburetox is an intrinsically disordered insecticidal and fungicidal polypeptide derived from jack bean urease. *The FEBS journal*, 282(6), 1043-1064. <https://doi.org/10.1111/febs.13201>

Martinelli, A. H., Kappaun, K., Ligabue-Braun, R., Defferrari, M. S., Piovesan, A. R., Stanisçuaski, F., ... & Verli, H. (2014). Structure–function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(3), 935-944. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.11.010>

Moyetta, N. R., Broll, V., Perin, A. P. A., Uberti, A. F., Grahl, M. V. C., Stanisçuaski, F., ... & Fruttero, L. L. (2017). Jaburetox-induced toxic effects on the hemocytes of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 200, 17-26. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.06.001>

Mulinari, F., Stanisçuaski, F., Bertholdo-Vargas, L. R., Postal, M., Oliveira-Neto, O. B., Rigden, D. J., ... & Carlini, C. R. (2007). Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. *Peptides*, 28(10), 2042-2050. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.08.009>

Mulinari, F., Becker-Ritt, A.B., Demartini, D.R., Ligabue-Braun, R., Stanisçuaski, F., Verli, H., ... & Grossi-de-Sá, M.F. (2011). Characterization of JBURE-IIb isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC urease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814(12), 1758-68. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.07.022>

Postal, M., Martinelli, A. H., Becker-Ritt, A. B., Ligabue-Braun, R., Demartini, D. R., Ribeiro, S. F., ... & Carlini, C. R. (2012). Antifungal properties of *Canavalia ensiformis* urease and derived peptides. *Peptides*, 38(1), 22-32. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.010>

Pinto, C. E., Farias, D. F., Carvalho, A. F., Oliveira, J. T., Pereira, M. L., Grangeiro, T. B., ... & Vasconcelos, I. M. (2015). Food safety assessment of an antifungal protein from *Moringa oleifera* seeds in an agricultural biotechnology perspective. *Food and Chemical Toxicology*, 83, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.05.012>

Piovesan, A. R., Stanisçuaski, F., Marco-Salvadori, J., Real-Guerra, R., Defferrari, M. S., & Carlini, C. R. (2008). Stage-specific gut proteinases of the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus*: role in the release of entomotoxic peptides from *Canavalia ensiformis* urease. *Insect biochemistry and molecular biology*, 38(11), 1023-1032. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2008.09.004>

- Pires-Alves, M., Grossi-de-Sá, M.F., Barcellos, G.B., Carlini, C.R., & Moraes, M.G. (2003). Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [*Canavalia ensiformis* (L.) DC]. *Plant & Cell Physiology*, 44(2), 139-45. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcg018>
- Privalle, L., Bannon, G., Herman, R., Ladics, G., McClain, S., Stagg, N., Ward, J., & Herouet-Guicheney, C. (2011). Heat stability, its measurement, and its lack of utility in the assessment of the potential allergenicity of novel proteins. *Regul Toxicol Pharmacol*, 61(3), 292-5. <https://doi:10.1016/j.yrtph.2011.08.009>. Epub 2011 Aug 28
- Rathinam, M., Singh, S., Pattanayak, D., & Sreevathsa, R. (2017). Comprehensive *in silico* allergenicity assessment of novel protein engineered chimeric Cry proteins for safe deployment in crops. *BMC Biotechnology*, 201717, 64. <https://doi.org/10.1186/s12896-017-0384-z>
- Real-Guerra, R., Carlini, C.R., Stanisçuaski, F. (2013). Role of lysine and acidic amino acid residues on the insecticidal activity of Jackbean urease. *Toxicon*, 71, 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.05.008>
- Saha, S., & Raghava, G. P. S. (2006). AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. *Nucleic acids research*, 34(suppl_2), W202-W209. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl343>
- Sasipriya, G., & Siddhuraju, P. (2013). Evaluation of growth performance, serum biochemistry and haematological parameters on broiler birds fed with raw and processed samples of *Entada scandens*, *Canavalia gladiata* and *Canavalia ensiformis* seed meal as an alternative protein source. *Tropical animal health and production*, 45(3), 811-820. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0293-z>
- Schägger, H., & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical biochemistry*, 166(2), 368-379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Sprawka, I., Goławska, S., Parzych, T., Goławski, A., Czerniewicz, P., & Sytykiewicz, H. (2014). Mechanism of entomotoxicity of the Concanavalin A in *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Insect Science*, 14(1). <https://doi.org/10.1093/jisesa/ieu094>
- Stanisçuaski, F., Ferreira-Dasilva, C. T., Mulinari, F., Pires-Alves, M., & Carlini, C. R. (2005). Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). *Toxicon*, 45(6), 753-760. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.01.014>
- Stanisçuaski, F., Te Brugge, V., Carlini, C. R., & Orchard, I. (2009). In vitro effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec on *Rhodnius prolixus* Malpighian tubules. *Journal of insect physiology*, 55(3), 255-263. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2008.12.002>
- Stanisçuaski, F., Te Brugge, V., Carlini, C.R., & Orchard, I. (2010). Jack bean urease alters serotonin-induced effects on *Rhodnius prolixus* anterior midgut. *Journal of Insect Physiology*,

56(9),1078-86. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.03.002>.

Stanisçuaski, F., & Carlini, C. R. (2012). Plant ureases and related peptides: understanding their entomotoxic properties. *Toxins*, 4(2), 55-67. doi:10.3390/toxins4020055

Sridhar, K. R., & Seena, S. (2006). Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus *Canavalia* – A comparative study. *Food Chemistry*, 99(2), 267-288. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.049>

Sumner, J. B. (1926). The isolation and crystallization of the enzyme urease preliminary paper. *Journal of Biological Chemistry*, 69(2), 435-441.

Vasconcelos, I. M., Oliveira, J.T. (2004). Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, 15, 385-403. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.05.005>

Xu, W., Cao, S., He, X., Luo, Y., Guo, X., Yuan, Y., & Huang, K. (2009). Safety assessment of Cry1Ab/Ac fusion protein. *Food and chemical toxicology*, 47(7), 1459-1465. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.03.029>

Figure captions

Figure 1. Amino acids sequences of the (A) Jaburetox peptide, (B) Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease and (C) Jack bean (*C. ensiformis*) urease isoform IIb.

Figure 2. Tricine-SDS-PAGE (15%) of Jaburetox (JBTX) peptide at an initial concentration of 1 mg/mL after crescent periods of incubation in simulated gastric fluid (gastric phase of digestion) followed by simulated intestinal fluid (intestinal phase of digestion). M: molecular mass markers (phosphorylase B–97.0 kDa; bovine serum albumin–66.0 kDa; ovalbumin–45.0 kDa; carbonic anhydrase–30.0 kDa; soybean trypsin inhibitor–20.1 kDa and lactalbumin –14.4 kDa). Continuous arrow indicates pepsin and dashed arrow indicates pepsin + pancreatin.

Figure 3. SDS-PAGE (15%) of Jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease (JBU) at an initial concentration of 1 mg/mL after crescent periods of incubation in simulated gastric fluid (gastric phase of digestion) followed by simulated intestinal fluid (intestinal phase of digestion). M: molecular mass markers (phosphorylase B – 97.0 kDa; bovine serum albumin – 66.0 kDa; ovalbumin – 45.0 kDa; carbonic anhydrase – 30.0 kDa; soybean trypsin inhibitor – 20.1 kDa and lactalbumin –14.4 kDa). Continuous arrow indicates pepsin and dashed arrow indicates pepsin + pancreatin.

Table 1. Literature review on the history of safe use of Jack bean (*Canavalia ensiformis*), its urease and derived proteins

Species or protein/peptide studied	Protocol of administration	Concentration/administration route	Exposure time	Observed effects	Organism tested	Reference
<i>Canavalia ensiformis</i>	Seed flour added to soy-based diet	30% of seed flour/oral diet	42 days	No significant effects	Cornish rock chicken, <i>Gallus gallus domesticus</i>	Sasipriya; Siddhuraju, 2013.
	Source of starch; P, Ca, Mg, Zn, Cu, Ni; Source of essential amino acids, except metionin and cysteine	-*	-	-	-	Akrapunam; Sefaddeh, 1997
	Synthetic liquid diet containing Concanavalin A	50, 500, 1,000 and 1,500 µg/mL/oral diet	15 days	Increase of the pre-productive period, mortality and average time of development of generation (T) and decrease of the fecundity and the intrinsic rate of natural increase (rm). Reduction of sperm motility, production of reactive oxygen species (ROS)	The wheat aphid, <i>Rhopalosiphum padi</i> L.	Sprawka <i>et al.</i> , 2014
	Concanavalin A purified lectin	5,10 and 15 µg/ <i>in vitro</i>	0, 0.5, 1 and 2 h		Bull nelore, <i>Bos taurus</i>	Kaefer <i>et al.</i> , 2013

	Seed crude extract	100-200mg/kg/ Intraperitoneal injection	0.5 and 24h	dyspnea, hypothermia, coma and death	Rat, <i>Rattus norvergicus</i>	Carlini; Guimarães, 1981
	Artificial diet containing CNTX	0,25% (w/w) CNTX/oral diet	72h	Weight loss in 3rd instar nymphs and mortality of 80- 100%	Kissing bug, <i>Rhodnius prolixus</i>	Carlini <i>et al.</i> , 1997
Canatoxin (CNTX)	Artificial diet containing CNTX	2,5µg/mg/body weight/oral diet	48h	100% mortality in 3rd instar nymphs	<i>Rhodnius prolixus</i>	Ferreira-dasilva <i>et al.</i> , 2000
	Artificial diet containing CNTX	0.01%/oral diet	10 days	Reduction of weight gain and delay in the development of 3rd instar nymphs and mortality of 90- 100%	Cotton stainer bug, <i>Dysdercus peruvianus</i>	Stanisçuaski <i>et al.</i> , 2005
	Purified CNTX	Single dose of CNTX (3 mg/kg)/ orally	5 days	Adults and newborns showed no signs of toxicity 5 days after ingestion	Adult and newborn Wistar rats, <i>Rattus norvergicus</i>	Mulinari, <i>et al.</i> , 2007

	Urease (Sigma)	6 µg/injection into the hemocele	6 h	Aggregation of hemocytes	<i>Rhodnius prolixus</i>	Defferrari <i>et al.</i> , 2014a
	Cotton seed meal-based diet containing urease (Sigma)	0.01-0.04% (w/w) of urease/oral diet	11 days	100% mortality of 3rd instar nymphs	<i>Disdercus peruvianus</i>	Piovesan <i>et al.</i> , 2008
Jack bean urease (JBU)	Urease (Sigma)	0.36 µM/ <i>in vitro</i>	24 h	Inhibition of proliferation, morphological changes with formation of pseudohyphas, changes in the transport of H(+), carbohydrate metabolism and permeabilization of membranes	Filamentous fungi and yeasts	Postal <i>et al.</i> , 2012
	Cotton seed meal-based diet containing urease (Sigma)	0.01% and 0.2% (w/w) of urease/oral diet	14 days	Mortality of nymphs > 80%	Large milkweed bug, <i>Oncopeltus fasciatus</i>	Defferrari <i>et al.</i> , 2011
	Urease (Sigma)	5×10^{-10} M / <i>in vitro</i> dissected whole tubules	20 min	No changes in the transepithelial potential of the Malpighi tubules 5th instar nymphs	<i>Rhodnius prolixus</i>	Stanisçuaski <i>et al.</i> , 2009

	Urease (Sigma)	0.25 µg/mg body weight/injection into the hemocele	24 h	96% mortality	<i>Rhodnius prolixus</i>	Staniscuaski <i>et al.</i> , 2010
Jaburetox-2Ec	Cotton seed meal-based diet containing Jaburetox-2Ec; solution containing Jaburetox-2Ec	0.01% (w/w) of Jaburetox-2Ec; 20 µL of a solution containing 16,3 µg of Jaburetox-2Ec; single dose of Jaburetox-2Ec (10 mg/kg)/orally	15 days; 8 days; 5 days	100% mortality of 3rd instar nymphs; reduction of 30% in the weight of 3rd instar larvae; adults and newborns showed no signs of toxicity 5 days after ingestion	<i>Disdercus peruvianus</i> ; <i>Spodoptera frugiperda</i> ; adult and newborn Wistar rats, <i>Rattus norvegicus</i>	Mulinari <i>et al.</i> , 2007
Jaburetox (JBTX)	Purified JBTX	JBTX injected in the proportion of 2 µg/inset/ injection into the hemocele	18 h	Increase in gene expression of UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase (UAP), chitin synthase and nitric oxide synthase (NOS)	<i>Rhodnius prolixus</i>	Moyetta <i>et al.</i> , 2017
	Purified JBTX	23µM/ <i>in vitro</i>	1 h	Jbtx-FITC interacts with the membrane debris obtained after cell lysis of <i>S. cerevisiae</i> and tissue homogenates of nerve cord of <i>N. cinerea</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; lobster cockroach, <i>Nauphoeta cinerea</i>	Broll <i>et al.</i> , 2017.

<i>Escherichia coli</i> cells expressing JBTX	Fish diet soaked with a suspension of lyophilized <i>E. coli</i> cells containing 100µg JBTX /oral diet	6 days	97.5% mortality of larvae	Yellow fever mosquito, <i>Aedes aegypti</i>	Becker-Ritt; Portugal; Carlini, 2017.
Purified JBTX	0.05 µg/mg b.w./ injection into the hemocele; 0.1 µg/mg b.w./oral diet; 1×10^{-15} M/ <i>in vitro</i> ; 0.015 µg/mg b.w./injection into the hemocele; 32 µg/g b.w./ <i>in vivo</i> nerve–muscle preparation	96 h; 24 h; 1 mim; 96 h; 120 min	> 90% (injection) and > 40% (oral diet) mortality of fifth instar of <i>R. prolixus</i> ; inhibition of fluid secretion in Malpighian tubules of <i>R. prolixus</i> ; > 60% mortality of fifth instar of <i>O. fasciatus</i> ; neuromuscular paralysis in <i>Phoetalia pallida</i>	<i>Rhodnius prolixus</i> ; <i>Oncopeltus fasciatus</i> ; pallid cockroach, <i>P. pallida</i>	Martinelli <i>et al.</i> , 2014

*(-): information not available.

Table 2. Protein matches for the full-length amino acids sequences of Jaburetox (JBTX) peptide, jack bean urease (JBU) and JBU isoform IIb (JBURE IIb) in the NCBI non-redundant (nr) protein sequences database*

Protein/peptide	Protein matched; ID; [Species]	Protein name ^z	Adverse effects reported ^λ
	Hypothetical protein CR513_30655; ID: RDX87828.1; [<i>Mucuna pruriens</i>]	Uncharacterized protein	-
	Hypothetical protein TSU_325140; ID: GAU41300. 1; [<i>Trifolium subterraneum</i>]	NA ^γ	NP [§]
	Hypothetical protein GLYMA_11G248700; ID: KHR31453.1; [<i>Glycine max</i>]	NA	NP
	Hypothetical protein TanjilG_25242; ID: OIW01134.1; [<i>Lupinus angustifolius</i>]	Urease	-¶
	Hypothetical protein Ahy_A10g050566 isoform B; ID: RYR35419.1; [<i>Arachis hypogea</i>]	NA	NP
JBTX	Hypothetical protein Ahy_A10g050566 isoform A; ID: RYR35418.1; [<i>Arachis hypogea</i>]	NA	NP
	Hypothetical protein LR48_Vigan03g314300; ID: KOM39761.1; [<i>Vigna angularis</i>]	Urease	-
	Hypothetical protein PHAVU_001G260000g; ID: XP_007163737. 1; [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	Urease	-
	Hypothetical protein CR513_22907, partial; ID: RDX94687.1; [<i>Mucuna pruriens</i>]	Uncharacterized protein	-
	Hypothetical protein Ahy_B10g101599 isoform A; ID:RYQ82990.1; [<i>Arachis hypogea</i>]	NA	NP

Hypothetical protein Ahy_B10g101599 isoform B; ID:RYQ82988.1; [<i>Arachis hypogea</i>]	NA	NP
Hypothetical protein Ahy_B10g101599 isoform C; ID:RYQ82989.1; [<i>Arachis hypogea</i>]	NA	NP
Hypothetical protein DVH24_041023; ID: RXH79876.1; [<i>Malus domestica</i>]	NA	NP
Hypothetical protein PHAVU_001G260000g; ID: XP_007163737.1; [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	Urease	-
BnaA02g1322OD; ID: CDY12654. 1; [<i>Brassica napus</i>]	Urease	-
Unnamed protein product; ID: VDD22196.1; [<i>Brassica oleracea</i>]	Uncharacterized protein	-
BnaC02g4582OD; ID: CDY51608.1; [<i>Brassica napus</i>]	Urease	-
Unnamed protein product; ID: VDC87778.1; [<i>Brassica rapa</i>]	Uncharacterized protein	-
Hypothetical protein BRARA_B017; ID: RID74641.1; [<i>Brassica rapa</i>]	Urease	-
Hypothetical protein C5167_033175; ID: RZC70029.1; [<i>Papaver somniferum</i>]	NA	NP
Hypothetical protein POPTR_0086177900; ID: PNT25284.2; [<i>Populus trichocarpa</i>]	NA	NP
Hypothetical protein GLYMA_08G103000; ID: KRH42647.1; [<i>Glycine max</i>]	Uncharacterized protein	-
Hypothetical protein AALP_AA2G093800; ID: KFK41162.1; [<i>Arabis alpina</i>]	Urease	-
Hypothetical protein AQUCO_01200284v1; ID: PIA50886.1; [<i>Aquilegia coerulea</i>]		-

		Urease	
	Hypothetical protein EUGRSUZ_B03469; ID: KCW86884.1; [<i>Eucalyptus grandis</i>]	Uncharacterized protein	-
	Hypothetical protein AQUUCO_01200284v1; ID: PIA50887.1; [<i>Aquilegia coerulea</i>]	Urease	-
	Hypothetical protein LR48_Vigan03g314300; ID: KOM39761.1; [<i>Vigna angularis</i>]	Urease	-
JBU	Hypothetical protein PHAVU_001G260000g; ID: XP_007163737.1; [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	Urease	-
	Hypothetical protein CRG98_001272; ID: PKI78329.1; [<i>Punica granatum</i>]	Urease	-
	Hypothetical protein LR48_Vigan03g314300; ID: KOM39761.1; [<i>Vigna angularis</i>]	Urease	-
JBURE IIb	Hypothetical protein PHAVU_001G260000g; ID: XP_007163737.1; [<i>Phaseolus vulgaris</i>]	Urease	-
	Hypothetical protein CRG98_001272; ID: PKI78329.1; [<i>Punica granatum</i>]	Urease	-

*NCBI nr protein database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) results that met the search criteria: E-value <0.01, shared identity> 50%, alignment size and gap frequency ≤ 6 . No limiting keywords were used in the search.

‡Accessed at UniProt database (<https://www.uniprot.org/>) using the ID number.

^Searched through the combination of the species name source of the protein and the protein name in PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

‡Not Available.

§Not Performed.

¶Not found.

Table 3. Bioinformatics analysis for the prediction of potential allergenicity of the jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease (JBU), JBU isoform IIb (JBURE-IIb) and its derived peptide Jaburetox (JBTX)

Protein/ Peptide	Full length FASTA search*		80mer sliding window search [‡]		Short contiguous amino acids sequences search ^λ				Allergen motifs search [§]	N-glycosylation sites [¶] Number (position in the aa sequence)
	Identity % Allergen name (Accession number) <i>Species</i>		Identity % Allergen name (Accession number) <i>Species</i>		Allergen name (Accession number) <i>Species</i>					
	Allergen Online [†]	SDAP [‡]	Allergen Online	SDAP	Allergen Online ^γ		SDAP			
					8 aa	6 aa	7 aa	8aa		
JBTX	No matches	No matches	No matches	No matches	No matches	No matches	No matches	No matches	No matches	No matches
JBU	No matches	No matches	No matches	No matches	No matches	Per a 3.0201 (AAB09632) <i>Periplaneta americana</i> Har a 2.0101 (17291858) <i>Harmonia axyridis</i> Gly 6.0501 (Q76C77) <i>Glycine max</i> Gly m 6.0401	Har a 2.0101 (17291858) <i>Harmonia axyridis</i>	No matches	No matches	

						(Q9SB11) <i>Glycine max</i> Pas n 1.0101 (ACA2387) <i>Paspalum notatum</i> Zea m 1 (P58738) <i>Zea mays</i> Ory s 1 (AAF7.2990) <i>Oryza sativa</i>				(31, 233, 572 and 735)
				36.25%		Pen c35.0101 (ADK47483) <i>Penicillium chrysogenum</i>				
				Ory s 33 Kd (BAB71741) <i>Oryza sativa</i>		Tri a 25.0101 (G9LDX4) <i>Triticum aestivum</i>				
			35.30%	37.50%		Per a 3.0201 (AAB09632) <i>Periplaneta americana</i>	Har a 2.0101 (17291858) <i>Harmonia axyridis</i>	No matches	No matches	
JBURE IIb	No matches	No matches	Enolase 2 (2- phosphoglycerate) (14423687) <i>Hevea brasiliensis</i>	Ory s 33 Kd (BAB71741) <i>Oryza sativa</i>	No matches	Har a 2.0101 (17291858) <i>Harmonia axyridis</i>				
				37.50%		Gly m 6.0501 (Q7GC77) <i>Glycine max</i>				
				Ory s 33 Kd (BAB71741) <i>Oryza sativa</i>		Gly m 6.0401				6 (31, 89, 524, 572,

36.25%	(Q9SB11)	735 and
Ory s 33 Kd	<i>Glycine max</i>	801)
(BAB71741)	Blot t 2.0104	
<i>Oryza sativa</i>	(A6XEP6)	
	<i>Blomia</i>	
	<i>tropicalis</i>	
	Ole e 1.0101	
	(S75766)	
	<i>Oleo europea</i>	
	Tri 4.0101	
	(AAD52012)	
	<i>Trichophyton</i>	
	<i>rubrum</i>	

*Full FASTA comparisons using as filter E-value < 0.01 for detection of identity > 50% (AALBERSE, 2000).

Figure 1

- A** >pdb|2MM8|A Chain A, Structural And Biochemical Characterization Of Jaburetox
MGPVNEANCKAAMEIVCRREFGHKEEEDASEGVTTGDPDCPFTKAIPREEYA
NKYGPTIGDKIRLGDIDLIAEIEKDFALYGDES VFGGGKVIHHHHHH
- B** >AAA83831.1 urease [*Canavalia ensiformis*]
MKLSPREVEKLGHLNAGYLAQKRLARGVRLNYTEAVALIASQIMEYARDGE
KTVAQLMCLGQHLLGRRQVLPAVPHLLNAVQVEATFPDGTCLVTVHDPISRE
NGELQEALFGSLLPVPSLDKFAETKEDNRIPGEILCEDECLLNIGRKAVILKVT
SKGDRPIQVGSYHFIENPYLTFDRRKAYGMRLNIAAGTAVRFEPGDCKSVT
LVSIEGNKVRGGNAIADGPVNETNLEAAMHAVRSKGFGEHEEKDASEGFITK
EDPNCPFNTFIHRKEYANKYGPTTIGDKIRLGDITNLLAEIEKDYALYGDECVFG
GGKVIDGMSGQSCGHPAISLDTVITNAVIIDYTGIIKADIGIKDGLIASIGKAG
NPDIMNGVFSNMIIIGANTEVIAGEGLIVTAGAIDCHVHYICPQLVYEAISSGITT
LVGGGTGPAAGTRATTCTPSPTQMRLMLQSIDYLPLNFGFTGKGSSSKPDELH
EIKAGAMGLKLHEDWGSTPAIDNCLTAEHHDIQNIHTDTLNEAGFVEHSI
AAFKGRTHIYHSEGAGGGHAPDIKVCGIKNVLPSSNTTRPLTSNTIDEHLD
MLMVCHHLDREIPEDLAFASRIRKKTIAAEDVLNDIGAISSSDSQAMGRVG
EVISRTWQTADPMKAQTGPLEKCDSSDNDNFRIRRYIAKYTINPAIANGFSQYV
GSVEVGKLADLVMWKPSFFGTPKPEMVIKGGMVAWADIGDPNASIPTPEPVKM
RPMYGTLGKAGGALSIAFVSKAALDQRVNVLYGLNKRVEAVSNVRKLTKLD
MKLNDALPEITVDPESYTVKADGKLLCVSEATTVPLSRNYFLF
- C** >ACL14297.1 urease JBURE-IIB [*Canavalia ensiformis*]
MKLSPREVEKISLHNAGFLAQKRLARGVRLNYSVALIASQILEHARDGEKTV
AQLMSIGKHLGRRQVLPAVPHLLNIIQVEATLPNGTKLTVVHDPANENGDL
EALYGSFLPVPSLDKFAESKEEHKIPGEIICADGRLLNPGRKAVFLKVVNHGDR
PIQVGSYHFIENPYLTFDRRKAYGMRLNIAAGDSVRFEPGDHKTVNLVSI
NKIIRGGNAIADGPVNEANCKAAMEIVCRREFGHKEEEDASEGVTTGDPDCP
TKAIPREEYANKYGPTIGDKIRLGDIDLIAEIEKDFALYGDES VFGGGKVIDG
MGQSSGHPAMS LDTVITSAVIIDYTGIIKADIGIKDGLIASIGKAGNPDIMNGV
PNMIIIGVNTVICGEGEGLIVTAGGIDCHVHYICPQLDEAISSGITT VVGGGTGPT
DGSRATTCTPAPTQMKLMLQSIDDIPLNFGFTGKGSGSHPDELHEIKAGAMGL
KLHEDWGCPTAAIDNCLVAEQHDIQVNIHTDTVNESGFVEHTIAAFNGRTHI
YHSEGAGGGHAPDIKVCSMKNVLPSSNTTRPLTSNTVDEHLDMLMVCHKL
NREIPEDLAEASSRVREQTIAAEDLHDI GGISISSDAQAVGRIGEVISCTWQTAD
KMKAERGPLQPDGSDNDNFRIRRYIAKYTINPAIVNGISQYVGSVEVGKLADLV
IWKPSFFGAKPDIVIKGGSIWADMGPNGSIPTEPEVLMRPMYGTLGKAGSAL
SIAFVSKAALDLGKLVLYGLNKRVEAVSNVRKLTKLDLKLNSLPEITVCPETF
TVTVDGQALSSEAVTTLPLSQNYFIF

Figure 2

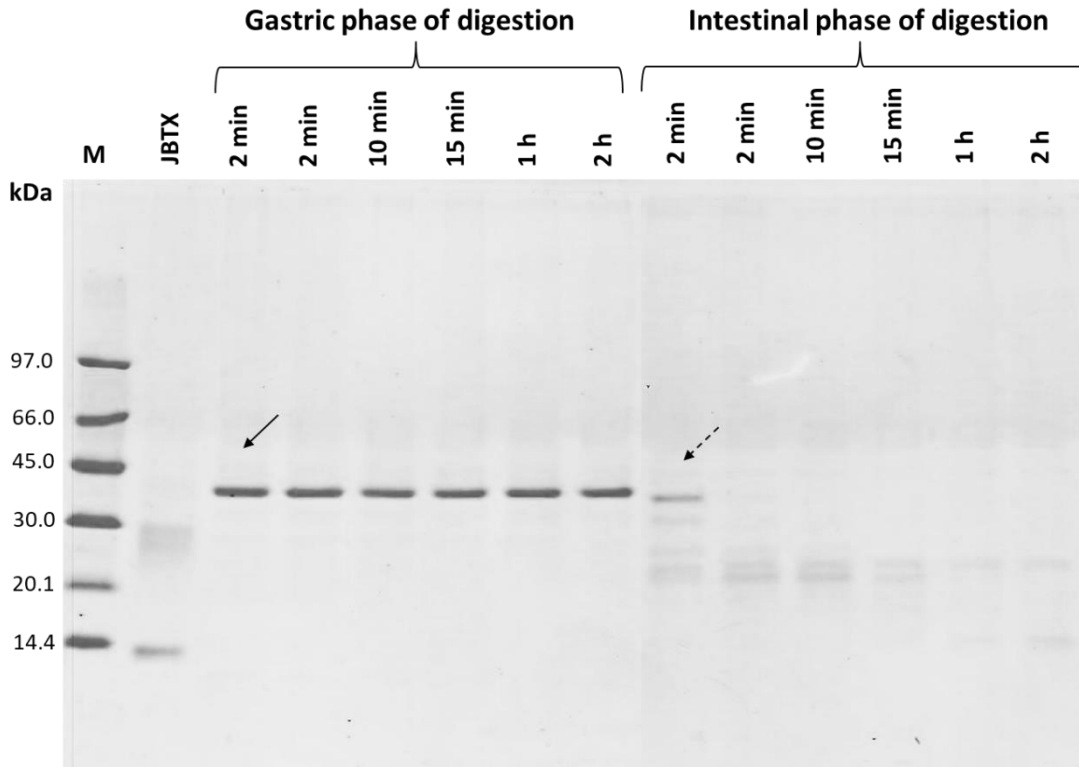
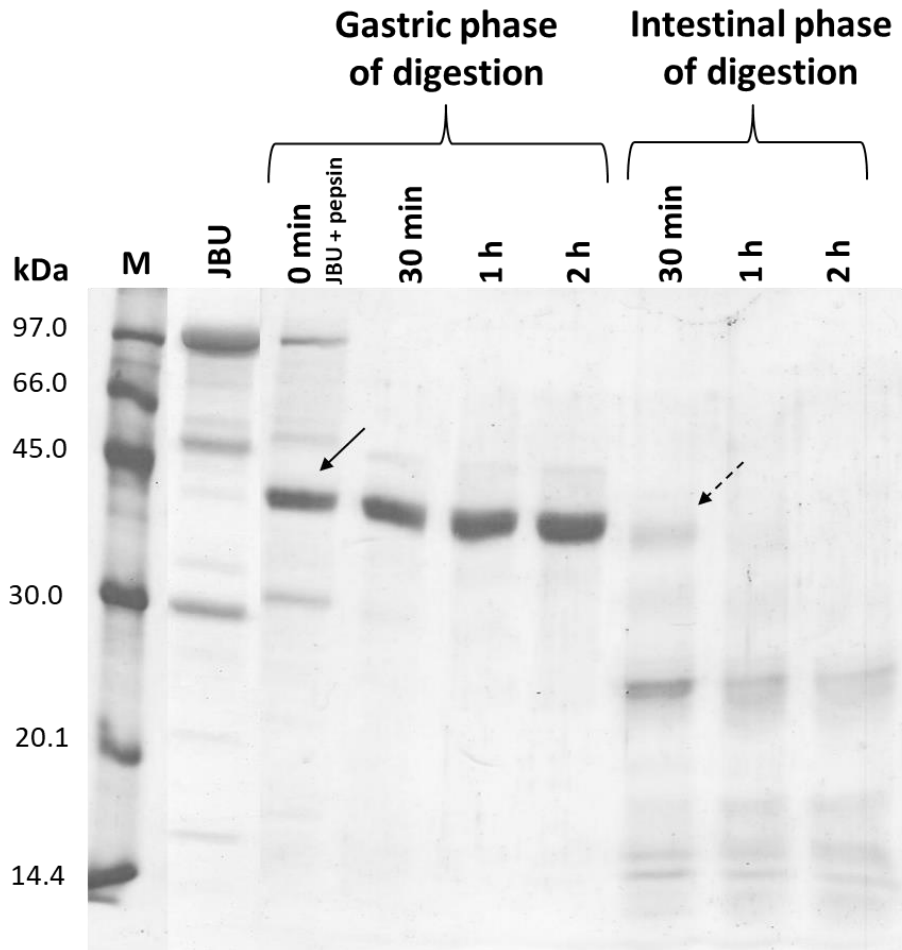


Figure 3



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O peptídeo inseticida JBTX, derivado da urease de *C. ensiformis*, apresentou características promissoras no que diz respeito à segurança de consumo para o desenvolvimento de culturas geneticamente modificadas. Neste sentido, as análises realizadas neste trabalho, que seguiram as recomendações para avaliação de segurança alimentar em duas etapas, baseada em pesos de evidência, proposta pelo ILSI, não evidenciaram nenhum risco potencial associado ao consumo de JBTX por humanos.

Esta afirmação é suportada, dentre os aspectos, pelo fato de que a espécie *C. ensiformis* ter mostrado um longo histórico de uso seguro. Além disso, as análises *in silico* do peptídeo JBTX não revelaram qualquer similaridade significativa com proteínas alergênicas, tóxicas e/ou antinutricionais conhecidas. Apenas para a urease (JBU) e sua isoforma II (JBURE II) é que foram encontradas identidades revelantes com proteínas alergênicas na pesquisa na janela de 80 aa para JBURE II e na busca de 6 e 7 aa contíguos para a JBU e JBURE II.

Também não foram encontrados motivos lineares de alérgenos, nem a presença de sítios potenciais de *N*-glicosilação para o JBTX. Do mesmo modo em que JBTX se mostrou bastante susceptível a degradação em fluido gástrico simulado, não sendo mais percebido após 2 minutos de incubação.

A partir dos dados reunidos por este estudo de avaliação da biossegurança alimentar do peptídeo Jaburetox, é possível garantir o seu uso seguro no contexto da biotecnologia agrícola devido ao seu alto potencial para conferir resistência ao ataque de insetos. Entretanto, vale ressaltar que os resultados aqui não isentam esta proteína de uma caracterização funcional adicional no âmbito das atividades para a liberação comercial de uma planta transgênica que expressando essa proteína.

REFERÊNCIAS

- AALBERSE, Rob C. “Structural Biology of Allergens.” **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 106, n. 2, 2000, pp. 228–238., doi:10.1067/mai.2000.108434. Disponível em: [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(00\)47206-4/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(00)47206-4/fulltext). Acesso em: 12 jan. 2017.
- ALTSCHUL, Stephen F., *et al.* “Basic Local Alignment Search Tool.” **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, 1990, pp. 403–410., doi:10.1016/s0022-2836(05)80360-2. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022283605803602>. Acesso em 28 ago. 2018.
- ANDRADE, Débora Aparecida Verde de. **Caracterização morfológica e citogenética de sementes e plântulas de algumas espécies de plantas tóxicas**. 2007. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/92681>. Acesso em: 25 ago. 2018.
- BALLIANA, Amanda Gailit. **Avaliação morfofisiológica de *Canavalia ensiformis* (L.) DC.(Fabaceae) em substrato contaminado com óleo diesel**. 2015. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/39325>. Acesso em: 04 fev. 2018.
- BERMAN, Helen M. *et al.* The protein data bank. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, v. 58, n. 6, p. 899-907, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12037327/>. Acesso em 04 fev. 2018.
- BETZ FS, HAMMOND BG, FUCHS RL (2000) **Safety and advantages of *Bacillus thuringiensis*-protected plants to control insect pests**. *Regul Toxicol Pharmacol* 32:156–173. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11067772/>. Acesso em: 13 mar. 2018.
- CARLINI, Celia R. *et al.* Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsinlike enzymes. **Journal of economic entomology**, v. 90, n. 2, p. 340-348, 1997. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9145031/>. Acesso em: 03 jul. 2017.
- CARLINI, Célia R.; GROSSI-DE-SÁ, Maria Fátima. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, n. 11, p. 1515-1539, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12419503/>. Acesso em 23 out. 2017.
- CHOUDHURI, Supratim. “Sequence Alignment and Similarity Searching in Genomic Databases.” **Bioinformatics for Beginners**, 2014, pp. 133–155., doi:10.1016/b978-0-12-410471-6.00006-2.
- CRAIG, Wendy, *et al.* “An Overview of General Features of Risk Assessments of Genetically Modified Crops.” **Euphytica**, v. 164, no. 3, Oct. 2008, pp. 853–880., doi:10.1007/s10681-007-9643-8. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/225521794_An_overview_of_general_features_of_risk_assessments_of_genetically_modified_crops. Acesso em: 02 mar. 2017.
- CODEX ALIMENTARIUS. **Foods derived from modern biotechnology**. Rome, Italy, Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Food and

Agriculture Organization of the United Nations. Second Edition. 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/011/a1554e/a1554e00.htm>. Acesso em: 10 jan. 2017.

CONSTABLE, A. I. *et al.* 'History of safe use' as applied to the safety assessment of novel foods and foods derived from genetically modified organisms. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2513-2525, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17692450/>. Acesso em: 07 fev. 2017.

COORDINATORS, NCBI Resource. Database resources of the national center for biotechnology information. **Nucleic acids research**, v. 44, n. Database issue, p. D7, 2016. Acesso em 25 ago. 2018.

CTNBio – **Comissão Técnica Nacional de Biossegurança**. Disponível em: www.ctnbio.gov.br Acesso em: 04 fev. 2018.

DARBOUX I, NIELSEN-LEROUX C, CHARLES J-F, PAURON D (2001) The receptor of Bacillus sphaericus binary toxin in Culex pipiens (Diptera: Culicidae) midgut: molecular cloning and expression. *Insect Biochem Mol Biol* 31:981–990. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11483434/>. Acesso em: 26 ago. 2018.

DELANEY, B. *et al.* Evaluation of protein safety in the context of agricultural biotechnology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. S71-S97. 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18348900/>. Acesso em: 15 jan. 2017.

FAO, WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods: report of a joint FAO/WHO expert consultation on allergenicity of foods derived from biotechnology. **FAO, Rome**, 2001. Disponível em: <https://www.who.int/publications/m/item/evaluation-of-allergenicity-of-genetically-modified-foodsreport-of-a-joint-fao-who-expert-consultation-on-allergenicity-of-foods-derived-from-biotechnology>. Acesso em: 15 jan. 2017.

FOLLMER, Cristian. Insights into the role and structure of plant ureases. **Phytochemistry**, v. 69, n. 1, p. 18-28, 2008. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/6132663_Insights_into_the_role_and_structure_of_plant_ureases. Acesso em: 27 jul. 2018.

FARIAS, D. F. **Biossegurança alimentar de proteínas Cry**: dos métodos clássicos e oficiais à era ômica. 2013. 242 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/10376>. Acesso em: 12 fev. 2017.

FARIAS, Davi Felipe *et al.* Food safety assessment of Cry8Ka5 mutant protein using Cry1Ac as a control Bt protein. **Food and Chemical Toxicology**, v. 81, p. 81-91, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25890087/>. Acesso em: 12 fev. 2017.

MARTINS, N. F. Predição de proteínas alergênicas. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2006. (documento 205). Disponível em: <https://silo.tips/download/documentos-issn-dezembro-2006-prediao-de-proteinas-alergenicass>. Acesso em: 28 ago. 2018.

FERREIRA- DASILVA, Cláudio T. *et al.* Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic

protein, by insect cathepsin- like enzymes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**: Published in Collaboration with the Entomological Society of America, v. 44, n. 4, p. 162-171, 2000. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10918311/>. Acesso em: 12 abr. 2018.

HAMMOND, B. *et al.* Toxicological evaluation of proteins introduced into food crops. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, p. 25-42, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3835160/>. Acesso em: 25 jun. 2017.

HARTLEY, Sarah *et al.* “Essential Features of Responsible Governance of Agricultural Biotechnology.” Ed. Claire Marris. **PLoS Biology** 14.5 (2016): e1002453. PMC. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosbiology/article?id=10.1371/journal.pbio.1002453>. Acesso em 23 jun. 2017.

Heuzé V., Tran G., 2015. *Jack bean (Canavalia ensiformis)*. Feedipedia, a programme by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <https://www.feedipedia.org/node/327> Last updated on September 7, 2015, 13:09. Acesso em 25 jun. 2018.

HOFFMAN, Donald *et al.* Allergen nomenclature. Journal of allergy and clinical immunology, v. 96, n. 1, p. 5-14, 1995. Disponível em: [https://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(95\)70027-7/fulltext](https://www.jacionline.org/article/S0091-6749(95)70027-7/fulltext). Acesso em: 30 jun. 2017.

GOODMAN, Richard E. *et al.* AllergenOnline: A peer- reviewed, curated allergen database to assess novel food proteins for potential cross- reactivity. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 5, p. 1183-1198, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26887584/>. Acesso em: 23 out. 2017.

SILVA-LÓPEZ, Raquel Elisa da *et al.* **Canavalia ensiformis (L) DC (Fabaceae)**. 2012. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/handle/icict/15134/5.pdf;jsessionid=159D0CC10E71AFFFC2E61C3DCB5C7236?sequence=2>. Acesso em: 24 out. 2017.

LOPES, O.M.N. Feijão-de-porco. **Leguminosa para controle de mato e adubação verde do solo**. Altamira: Embrapa Comunicado Técnico 12, 1-4, 2000. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/407266/feijao-de-porco-leguminosa-para-controle-de-mato-e-adubacao-verde-do-solo>. Acesso em: 12 set. 2017.

LIPMAN, D., and W. PEARSON. “Rapid and Sensitive Protein Similarity Searches.” **Science**, v. 227, no. 4693, 1985, pp. 1435–1441., doi:10.1126/science.2983426. Disponível em <https://www.science.org/doi/10.1126/science.2983426>. Acesso em: 12 set. 2017.

MARTINELLI, Anne HS *et al.* Structure–function studies on jaburetox, a recombinant insecticidal peptide derived from jack bean (*Canavalia ensiformis*) urease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1840, n. 3, p. 935-944, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24239686/>. Acesso em: 17 set. 2017.

MULINARI, F. *et al.* Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, v. 28, n. 10, p. 2042-2050,

2007. Disponível em:

https://repositorio.ucb.br:9443/jspui/bitstream/123456789/7923/1/Jaburetox_2Ec%20An%20insecticidal%20peptide%20derived%20from%20an.PDF. Acesso em: 24 set. 2017.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. **Advances in Pediatrics., U.S. National Library of Medicine**. Disponível em: www.ncbi.nlm.nih.gov/. Acesso em: 25 mai. 2018.

OLIVEIRA, E. M. M.; WATANABE, E. Revisão: Segurança Alimentar de Produtos Derivados da Biotecnologia Moderna. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 7, p. 201- 213, 2004. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/12252>. Acesso em: 23 set. 2017.

POSTAL, Melissa *et al.* Antifungal properties of Canavalia ensiformis urease and derived peptides. **Peptides**, v. 38, n. 1, p. 22-32, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196978112003622>. Acesso em: 23 set. 2017.

PINTO, Clidia E.M. *et al.* Food safety assessment of an antifungal protein from Moringa oleifera seeds in an agricultural biotechnology perspective. **Food and Chemical Toxicology**, v. 83, p. 1-9, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691515001775>. Acesso em: 02 fev. 2017.

PIRES-ALVES, Melissa *et al.* Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean [Canavalia ensiformis (L.) DC]. **Plant and cell physiology**, v. 44, n. 2, p. 139-145, 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/pcp/article/44/2/139/1844186>. Acesso em: 15 set. 2017.

PIOVESAN, Angela R. *et al.* Canavalia ensiformis urease, Jaburetox and derived peptides form ion channels in planar lipid bilayers. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 547, p. 6-17, 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986114000629>. Acesso em: 18 set. 2017.

PROCÓPIO, Thamara F. *et al.* Antibacterial lectins: action mechanisms, defensive roles and biotechnological potential. **Antibacterials: Synthesis, properties and Biological Activities, Nova Science Publishers Inc., New York**, p69-89,2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Luana-Cassandra-Coelho/publication/312946459_Antibacterial_Lectins_Action_Mechanisms_Defensive_Roles_and_Biotechnological_Potential/links/588ad2c4aca2727ec1191154/Antibacterial-Lectins-Action-Mechanisms-Defensive-Roles-and-Biotechnological-Potential.pdf. Acesso em: 23 mai. 2018.

RAHMAN, M., *et al.* “Safe Use of Cry Genes in Genetically Modified Crops.” **Environmental Chemistry Letters**, vol. 13, no. 3, 2015, pp. 239–249., doi:10.1007/s10311-015-0508-4. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10311-015-0508-4>. Acesso em: 18 set. 2017

ROCCA, Elena, and ANDERSEN, Fredrik. “How Biological Background Assumptions

Influence Scientific Risk Evaluation of Stacked Genetically Modified Plants: An Analysis of Research Hypotheses and Argumentations.” **Life Sciences, Society and Policy** 13 (2017): 11. PMC. Disponível em: <https://isspjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40504-017-0057-7>. Acesso em: 23 mai. 2018.

RODRIGUES, J. E. L. F. *et al.* A importância do feijão de porco (*Canavalia ensiformis* DC) como cultura intercalar em rotação com milho e feijão caupi em cultivo de coqueirais no município de Ponta-de-Pedras/Marajó-PA. **Embrapa Amazônia Oriental- Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2004. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/402411/a-importancia-do-feijao-de-porco-canavalia-ensiformis-dc-como-cultura-intercalar-em-rotacao-com-milho-e-feijao-caupi-em-cultivo-de-coqueirais-no-municipio-de-ponta-de-pedrasmarajo-pa#:~:text=Resumo%3A%20O%20uso%20do%20feij%C3%A3o,pr%C3%A1tica%20tradicional%20dos%20monocultivos%20sucessivos%2C>. Acesso em: 10 jan. 2017.

SAHA, Sudipto; RAGHAVA, G. P. S. AlgPred: prediction of allergenic proteins and mapping of IgE epitopes. **Nucleic acids research**, v. 34, n. suppl_2, p. W202-W209, 2006. Disponível em: https://academic.oup.com/nar/article/34/suppl_2/W202/2505748. Acesso em: 22 mai. 2017.

SCHEIN, Catherine H.; IVANCIUC, Ovidiu; BRAUN, Werner. Structural database of allergenic proteins (SDAP). In: **Food allergy**. American Society of Microbiology, 2006. p. 257-283. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1128/9781555815721.ch11>. Acesso em: 06 mai. 2017.

SCHROT, Joachim; WENG, Alexander; MELZIG, Matthias F. Ribosome-inactivating and related proteins. **Toxins**, v. 7, n. 5, p. 1556-1615, 2015. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2072-6651/7/5/1556>. Acesso em: 13 mai. 2018.

SHANG, Chenjing *et al.* The cytotoxicity of elderberry ribosome-inactivating proteins is not solely determined by their protein translation inhibition activity. **PloS one**, v. 10, n. 7, p. e0132389, 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0132389>. Acesso em: 06 jun. 2018.

SIKLOS, Marton; BENAÏSSA, Manel; THATCHER, Gregory RJ. Cysteine proteases as therapeutic targets: does selectivity matter? A systematic review of calpain and cathepsin inhibitors. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 6, p. 506-519, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26713267/>. Acesso em: 11 jan. 2017.

SILVA, Roberto José Amaro da *et al.* Isolamento e caracterização de uma nova lectina da casca de *Schinus terebinthifolius* (aroeira-da-praia). 2017. Disponível em: <https://www.repositorio.ufal.br/jspui/bitstream/riufal/2442/1/Isolamento%20e%20caracteriza%C3%A7%C3%A3o%20de%20uma%20nova%20lectina%20da%20casca%20de%20Schinus%20terebinthifolius%20%28aroeira-da-praia%29.pdf>. Acesso em: 19 fev. 2018.

SILVANOVIČH, Andre; BANNON, Gary; MCCLAIN, Scott. The use of E-scores to determine the quality of protein alignments. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 54, n. 3, p. S26-S31, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19245824/>. Acesso em 13 mar. 2017.

SUMNER J.B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. *J. Biol. Chem.* 1926; 69:435–441. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021925818845604>. Acesso em: 12 fev. 2017.

SUMNER, James B.; HOWELL, Stacey F. Identification of hemagglutinin of jack bean with concanavalin A. **Journal of Bacteriology**, v. 32, n. 2, p. 227, 1936. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC543784/>. Acesso em: 12 fev. 2017.

SENTHIL-NATHAN S. A Review of Biopesticides and Their Mode of Action Against Insect Pests. In: **Environmental Sustainability**. Nova Deli, Springer, 2015, pp. 49–63. Disponível em: <http://www.mbbcollege.in/db/notes/415.pdf>. Acesso em: 28 ago. 2018.

SRIDHAR, K. R.; SEENA, S. Nutritional and antinutritional significance of four unconventional legumes of the genus *Canavalia*—A comparative study. **Food Chemistry**, v. 99, n. 2, p. 267-288, 2006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/222823455_Nutritional_and_antinutritional_significance_of_four_unconventional_legumes_of_the_genus_Canavalia_-_A_comparative_study. Acesso em: 04 fev. 2018.

STANISÇUASKI, F. *et al.* Insecticidal effects of canatoxin on the cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**, v. 45, n. 6, p. 753-760, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15804524/>. Acesso em: 12 jan. 2017.

VAECK, Mark *et al.* Transgenic plants protected from insect attack. **Nature**, v. 328, n. 6125, p. 33, 1987. Disponível em: <http://www.ask-force.org/web/Bt/Vaeck-Transgenic-Insect-Nature-1987.pdf>. Acesso em: 13 set. 2017.

VILAS-BÔAS, Gislayne Trindade *et al.* Fatores de virulência de *Bacillus thuringiensis*: o que existe além das proteínas Cry. **EntomoBrasilis**, v. 5, n. 1, p. 1-10, 2012. Disponível em: <https://www.entomobrasilis.org/index.php/ebbras/article/view/146>. Acesso em: 04 fev. 2018.

VILAS-BÔAS, G.T., A.P.S. PERUCA & O.M.N. ARANTES, 2007. **Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* and *Bacillus thuringiensis***. *Canadian Journal of Microbiology*, 53: 673–687. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17668027/>. Acesso em 25 jun. 2017.

YOUNG, Gregory J. *et al.* Assessment of possible allergenicity of hypothetical ORFs in common food crops using current bioinformatic guidelines and its implications for the safety assessment of GM crops. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 10, p. 3741-3751, 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512005224>. Acesso em: 10 jan. 2017.

YAVARI, B. *et al.* If There Is Really a Notable Concern about Allergenicity of Genetically Modified Foods. **Journal of food quality and hazards control**, v. 3, n. 1, p. 3-9, 2016. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/323970108_If_there_is_really_a_Notable_Conc

ern_about_allergenicity_of_genetically_modified_foods. Acesso em 19 fev. 2018.

ZHU-SALZMAN, Keyan; ZENG, Rensen. Insect response to plant defensive protease inhibitors. **Annual Review of Entomology**, v. 60, p. 233-252, 2015. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ento-010814-020816>. Acesso em 04 fev. 2018.