

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

**Purificação e Caracterização de Inibidores de
Tripsina da Família Kunitz de Sementes de
Pithecellobium dumosum e Seus Efeitos *In Vitro*
Sobre Insetos Pragas**

ADELIANA SILVA DE OLIVEIRA

FORTALEZA - CEARÁ
2007

ADELIANA SILVA DE OLIVEIRA

**Purificação e Caracterização de Inibidores de Tripsina da
Família Kunitz de Sementes de *Pithecellobium dumosum*
e Seus Efeitos *In Vitro* Sobre Insetos Pragas**

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Pereira de Sales

**FORTALEZA - CEARÁ
2007**

ADELIANA SILVA DE OLIVEIRA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE INIBIDORES DE TRIPSINA DA
FAMÍLIA KUNITZ DE SEMENTES DE *PITHECELLOBIUM DUMOSUM* E SEUS
EFEITOS *IN VITRO* SOBRE INSETOS PRAGAS**

Tese submetida à coordenação do Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica, da Universidade Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Maurício Pereira de Sales
Dept^o de Bioquímica – UFRN
Orientador

Prof^a Dra. Sumika Kiyota
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento
de Sanidade Animal - Instituto Biológico
Examinadora

Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Dept^o de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC
Examinador

Prof^a Dra. Ilka Maria de Vasconcelos
Dept^o de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC
Examinadora

Prof. Dr. Márcio Viana Ramos
Dept^o de Bioquímica e Biologia Molecular - UFC
Examinador

AGRADECIMENTOS

É chegada à hora de agradecer com satisfação, a contribuição, o apoio e o incentivo constante de todos que participaram de vários momentos durante a execução e preparação desta tese.

A DEUS, pela dádiva de vida. Por ter me dado forças para lutar e vencer as dificuldades durante a execução deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro com a manutenção de bolsa de auxílio concedida ao curso de Pós-Graduação em Bioquímica, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Banco do Nordeste (BNB) e Fundo de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNDECI) que contribuíram com recursos financeiros para a realização deste trabalho.

Ao professor Maurício Pereira de Sales do Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas (LQFPB) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), os meus sinceros agradecimentos pela confiança, pelos

valiosos ensinamentos e incentivos, pela credibilidade depositada em minha pessoa, por sua amizade, pela orientação dedicada, muitas vezes firme no sentido de alcançar resultados claros e coerentes, pelas oportunidades que tem me oferecido de crescer profissionalmente e por ser exemplo de profissional competente e incansável.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), pelo fornecimento de sementes de Jurema Branca (Pithecellobium dumosum).

Aos Professores da banca de qualificação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), Dr^a. Ilka Maria de Vasconcelos, Dr^a. Ana Lúcia e Dr. Thalles Barbosa Grangeiro, pela avaliação criteriosa e pertinente.

À professora Dr^a. Sumika Kiyota, Pesquisadora Científica do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, pela orientação, amizade, companheirismo, paciência, pelos momentos agradáveis de lazer e pela contribuição profissional, que resultou na purificação dos inibidores de tripsina de sementes de Jurema Branca (Pithecellobium dumosum).

Ao Professor Dr. Marcelo Porto Bemquerer do Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pelo seqüenciamento e determinação das massas

moleculares dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca (Pithecellobium dumosum).

Ao Professor Francisco de Assis Paiva Campos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), pelo enriquecimento de aprendizagem adquiridos através dos valiosos seminários oferecidos em sua disciplina.

Ao professor Luiz Roberto Diz de Abreu do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) pela grande ajuda e esclarecimento nos estudos cinéticos que foram muito importantes neste trabalho.

Ao Prof. Elizeu Antunes dos Santos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pelo compartilhar de idéias, pelos incentivos constantes e amizade. Agradeço ainda, pelas orientações, sugestões e dicas importantíssimas para a execução desta tese.

A todos os Professores e Funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela atenção quando foi necessário, pela presteza em resolver questões relacionadas à execução deste trabalho e competência profissional.

A todos os Professores e Funcionários do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), pela preciosa amizade, competência profissional, e que de alguma forma contribuíram para a execução dessa tarefa.

À Diretora do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, Dr^a. Josete Garcia Bersano, por ser uma pessoa humilde e humana, pelo entusiasmo, pela amizade e compreensão, pelo apoio e acolhida. Não esquecendo de agradecer também a todos os membros de sua família por permitir que em certos momentos eu fosse parte dela.

Aos estagiários do Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Instituto Biológico, Ana Paula e Felipe Coelho, pela acolhida, amizade e colaboração em parte deste trabalho que jamais serão esquecidos.

Aos colegas e companheiros de disciplinas realizadas no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, pela companhia, amizade e troca de conhecimentos valiosos.

Aos colegas e amigos, Ivan Ruy, Maria Emilia (Mila, mulher que deságua facilmente), Nedinaldo, Eduardo (Duda), pelo carinho, amizade e companhia em muitos sábados e domingos.

A todos os colegas que fazem parte do Departamento de Bioquímica e do curso de pós-graduação em bioquímica da UFRN pela cumplicidade, amizade e companheirismo do dia-a-dia.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas (LQFPB), Gioconda Moura, Kátya Anaya, Lussandra Thaís, Ticiane Amorim, Raniere Moura, Joelma Pitanga (baixinha, filha querida), Carlos Maia (Filho meu), Anne Shyrley, Anny Aquino, Cleysyvan Macedo (Ursinho puff), Norberto Vieira (Norba bombado), Vítor Sampaio (gostozinho), André Vianna (filhão, Magão), Ana Celly, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, onde foi realizado este trabalho, ao Professor de Biofísica do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte e Doutorando, Alexandre Queiroz. A Professora do Departamento de Morfologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Doutora (Oncologista) e Doutoranda, Jacy Maria de Lima Lia Fook, pela amizade e por compartilharem os piores e melhores momentos durante a execução desse trabalho.

Aos meus caríssimos amigos Leonardo Pepino (anjinho, cara legal), Fabiano Teixeira (amigão, companheiro de farra experimental nos feriados, sábados e domingos), Jannison Karlly, Ibson Lucas. Agradeço também aqueles que já sofreram junto comigo em busca da realização desse sonho e que já não fazem parte deste grupo: Albeisa Cleyse, Isabella Monteiro, Gláucia Pollyana, Renato Sousa, Ítalo Menezes, Hugo Henrique pelo apoio, ajuda constante, amizade,

carinho, cumplicidade e por compartilharem efetivamente para a realização desta tese no LQFPB.

Aos meus queridos amigos do LQFPB, Ludovico Migliolo (Robin) e Rodrigo Aquino (Batman), pela amizade, cumplicidade, companheirismo, e pelo auxílio no alinhamento da seqüência de nossas proteínas.

Aos meus mais novos colegas, amigos e funcionários do Instituto Biológico, em particular ao Pedro, Luiza, Cristóvão, Edílson, João Simione e Tereza, pela acolhida e amizade, e por compartilharem momentos de lazer que foram marcantes e importantes.

À família Japonesa, Shiguenori (pai), Julia (mãe sempre alegre e porreta), e filhos (Renato e Paula) pela amizade e por compartilhar muitos momentos de alegria que já mais esquecerei.

Aos colegas e amigos do Alojamento do Instituto Biológico (São Paulo), Luiza Fernandes, Paulo, Zé Carlos, Tiago, Nazareno, Anízio, Ricardo, Carlos Escandiuse, Trivilin, Fabinho, e em especial, à Cleonice Ramalho, por participar de muitas alegrias, tristezas, momentos de solidão pela distancia da família, de minhas decepções pessoais e frustrações profissionais, agradeço pelo companheirismo, por me escutar e compreender, quando tudo parecia não ter fim. Meu muito obrigado de coração.

Aos colegas e amigos da Padaria Pão Familiar (São Paulo), pelos momentos agradáveis e lanches maravilhosos.

À Lucia Betania da Silva Andrade (Beta) e família (Sr. Bosco, Murilo, Ceci, Cieni, e tia Lenita) pela verdadeira amizade e compreensão, agradeço a todos pelo apoio e por permitir que eu tivesse muitos momentos de alegria como em família.

Aos meus familiares, por estarem sempre ao meu lado, e mesmo a distância, contribuíram para a realização deste trabalho.

*"Em tudo daí graças" - PAULO
(TESSALONICENSES 5:18)*

*Saibamos agradecer as dádivas que o SENHOR nos concede
a cada dia:*

A largueza da vida;

O ar abundante;

A graça da locomoção;

A faculdade do raciocínio;

A fulguração da idéia;

A alegria de ver;

O prazer de ouvir;

O tesouro da palavra;

O privilégio do trabalho;

O Dom de aprender;

A conversação do amigo;

O aconchego do amigo;

O contentamento de construir para o futuro;

A renovação das próprias forças....

Nada existe insignificante na estrada que percorremos.

*Todas as concessões do PAI CELESTE são preciosas no
campo de nossa vida*

*Utilizando, pois, o patrimônio que o SENHOR nos empresta,
no serviço incessante ao bem, aprendamos a AGRADECER.*

*“O charme da história e sua lição enigmática
consiste no fato de que, de tempos em tempos,
nada muda e mesmo assim tudo é
completamente diferente. (Aldous Huxley)”*

RESUMO

Cinco inibidores de tripsina da família Kunitz (JB1, JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4) foram purificados de sementes de *Pithecellobium dumosum*, uma árvore da subfamília Mimosoideae, por precipitação com ácido tricloroacético (TCA), cromatografia de afinidade sobre tripsina imobilizada em Sepharose e coluna de fase reversa em sistema de CLAE. Os cinco inibidores possuem massa molecular entre 18 e 20 kDa formados por uma cadeia polipeptídica como determinado por SDS-PAGE na presença ou ausência de β -mercaptoetanol. JB1, JB3-1 e JB3-2 têm massas moleculares de 19,70, 19,69 e 19,69 kDa, respectivamente, por MALDI-TOF. JB2 e JB4 têm massa molecular de 18,08 e 20,85 kDa, respectivamente. A seqüência N-terminal de JB1, JB3-1 e JB3-2 mostrou identidade com outros inibidores da família Kunitz. Os cinco inibidores foram estáveis às variações de temperatura e pH. A inibição da tripsina por JB1, JB2 e JB4 foi do tipo competitivo. JB1, JB2, JB3-1 e JB3-2 tiveram K_{is} de $3,56 \times 10^{-8}$ M, $1,65 \times 10^{-8}$ M, $4,20 \times 10^{-8}$ M, $2,88 \times 10^{-8}$ M, respectivamente para a tripsina bovina. Em comparação com os outros inibidores JB4, com K_i de $5,70 \times 10^{-10}$ M, apresentou maior afinidade para tripsina. Entre os inibidores purificados apenas JB4 inibiu moderadamente a atividade da quimotripsina. A atividade da elastase e bromelaína não foi inibida efetivamente por esses inibidores. A inibição de JB1, JB2, JB3-1 e JB3-2 sobre a papaína variaram entre 32,93 a 48,82% e foi indicativo de sua bifuncionalidade, com exceção de JB4 que inibiu fracamente essa atividade (9,93% de inibição). A inibição da papaína por JB1 e JB2 foi do tipo não competitiva e os valores de K_i foram de $7,6 \times 10^{-7}$ e $5,1 \times 10^{-7}$ M, respectivamente. Ensaio *in vitro* sobre as proteinases digestórias de Lepidoptera, Diptera e Coleoptera foram feitos. Esses inibidores foram efetivos para enzimas digestórias semelhantes à tripsina desses insetos em diferentes graus. As enzimas digestivas de *Zabrotes subfasciatus* e *Ceratitidis capitata* foram inibidas por JB1 em 68,87 e 65,53%, respectivamente, e as enzimas de *Callosobruchus maculatus*, *Alabama argillaceae* e *Plodia interpunctella* foram inibidas entre 29,18 e 44,35%. Enzimas digestórias de *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* e *C. capitata* foram inibidas por JB2 entre 70,04 e 74,54% e as enzimas de larvas de *A. argillaceae* e *P. interpunctella* foram suprimidas em 13,58 e 48,67%, respectivamente. A atividade semelhante à tripsina de larvas de *Z. subfasciatus* foi suprimida em 67,33 e 56,93% por JB3-1 e JB3-2, respectivamente, e a atividade de *C. maculatus*, *A. argillaceae*, *P. interpunctella* e *C. capitata* foram suprimidas por esses inibidores entre 5,17 e 49,00%. JB4 inibiu entre 54,53 a 66,15 % as enzimas digestivas de *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* e *A. argillaceae* e inibiu as enzimas digestivas de larvas de *P. intepunctella* e *C. capitata* em 8,97 e 37,47%, respectivamente. A inibição de proteinases semelhantes à tripsina e à papaína presentes no intestino de vários insetos sugere que esses inibidores possam afetar o crescimento e sobrevivência desses insetos pragas quando incorporados em sementes artificiais e esta bifuncionalidade é indicativo de que estes inibidores possam ser fortes candidatos para os programas de melhoramento de plantas via transgenia.

Palavras-chave: Inibidor de tripsina, *Pithecellobium dumosum*, Insetos praga.

ABSTRACT

Five Kunitz-type trypsin inhibitors (JB1, JB2, JB3-1, JB3-2 and JB4) were purified from *Pithecellobium dumosum* seeds, a tree of the sub-family Mimosoideae, by TCA precipitation, affinity chromatography on immobilized trypsin-Sepharose and reverse phase HPLC using Vydac C-18 column. The five inhibitors had *Mr* between 18 and 20 kDa with a single polypeptide chain as determined by SDS-PAGE with and without reduction. JB1, JB3-1 and JB3-2 had *Mr* of 19.70, 19.69 and 19.69 kDa, respectively, by MALDI-TOF. JB2 and JB4 had *Mr* of 18.08 and 20.85, respectively, by SDS-PAGE. The N-terminal sequences of JB1, JB3-1 and JB3-2 showed identity with others Kunitz-type inhibitors. The five inhibitors were stable over a wide range of temperature and pH. The inhibition of trypsin by JB1, JB2 and JB4 was competitive. JB1, JB2, JB3-1 and JB3-2 showed *K_i* values of 3.56×10^{-8} M, 1.65×10^{-8} M, 4.20×10^{-8} M, 2.88×10^{-8} M, respectively, against bovine trypsin. In comparison with others inhibitors JB4, with *K_i* of 5.70×10^{-10} M, showed a high affinity toward trypsin. Among the inhibitors purified only JB4 inhibited chymotrypsin activity. The activities of elastase and bromelain were not inhibited for these inhibitors. The inhibition of JB1, JB2, JB3-1 and JB3-2 on papain varied between 32.93 to 48.82% of inhibition and was indicative of its bifunctionality with exception of JB4 that inhibited this activity in 9.9%. The papain inhibition by JB1 and JB2 were noncompetitive type and the *K_i*-values were 7.6×10^{-7} and 5.1×10^{-7} M, respectively. *In vitro* assays against digestive proteinases from Lepidoptera, Diptera and Coleoptera pests were carried out. These inhibitors were effective towards trypsin-like digestive enzymes of the insect in different degrees. The digestive enzymes from *Zabrotes subfasciatus* and *Ceratitis capitata* were inhibited by JB1 in 68.87 and 65.53% respectively, and *Callosobruchus maculatus*, *Alabama argillaceae* and *Plodia interpunctella* enzymes were inhibited in the range of 29.18 to 44.35%. Digestive enzymes from *Z. subfasciatus*, *C. maculatus* and *C. capitata* were inhibited by JB2 in the range of 70.04 to 74.54%, and the enzymes of *A. argillaceae* and *P. interpunctella* were suppressed in 13.58 and 48.67%, respectively. Trypsin-like activities of larval from *Z. subfasciatus* were suppressed in 67.33 and 56.93% by JB3-1 and JB3-2, respectively, and the activities of *C. maculatus*, *A. argillaceae*, *P. interpunctella* and *C. capitata* were inhibited by these inhibitors in the range of 5.17-49.00%. JB4 inhibited around 54.53 to 66.15% the digestive enzymes of *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* and *A. argillaceae* and the digestive enzymes from *P. interpunctella* and *C. capitata* larvae in 8.97% and 37.47%, respectively. The inhibition of trypsin-like and papain-like proteinases of several insects suggested that these inhibitors may affect the growth and survival of these insect pests when incorporated into artificial diet and their bifunctionality are indicative that these inhibitors could be strong candidates to plant management programs cross transgenia.

Keywords: Trypsin inhibitor, *Pithecellobium dumosum*, Insect pests.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	- <i>Ceratitis capitata</i> (moscas-das-fruas), inseto adulto (A) e larva infestando mamão (<i>Caryca papaya</i>) (B).....	26
FIGURA 2	- <i>Alabama argillacea</i> (curuquerê-do-algodoeiro), mariposa (A) e larva em folha de algodão (<i>Gossypium hirsutum</i>).....	28
FIGURA 3	- <i>Zabrotes subfasciatus</i> (gorgulho de feijão comum, <i>Phaseolus vulgaris</i>), inseto adulto (A) e larvas infestando sementes de feijão comum (B).....	32
FIGURA 4	- <i>Callosobruchus maculatus</i> (gorgulho do feijão-de-corda, <i>Vigna unguiculata</i>), inseto adulto (A) e adultos infestando sementes de feijão-de-corda (B).....	33
FIGURA 5	- <i>Plodia interpunctella</i> (traça-indiana-da-farinha), inseto adulto (A) e larva (B).....	34
FIGURA 6	- Classificação das exopeptidases.....	36
FIGURA 7	- Estrutura tridimensional de fitocistatina de arroz, <i>Oryza sativa</i> (Orizacistatina I, OC-I) resolvida em RMN (resonância magnética nuclear) (A), alinhamento das fitocistatinas de arroz (OC-I e OC-II) com um único domínio (B) e alinhamento dos três domínios (D1-D3) da multicistatina de girassol, <i>Helianthus annuus</i> (C).....	55
FIGURA 8	- Estrutura primária de inibidor de soja (<i>Glycine max</i>) da família Bowman-Birk, mostrando sete pontes dissulfeto e dois sítios reativos (P1), um para tripsina (lisina16-serina17) e outro para quimotripsina (leucina44-serina45)	59
FIGURA 9	- Estrutura tridimensional de inibidor de tripsina da família Kunitz de <i>Delonix regia</i> (DrTI).....	67
FIGURA 10	- Alinhamento de inibidores da família Kunitz.....	68
FIGURA 11	Superposição estrutural do sítio reativo (resíduos P4-P4') de inibidores da família Kunitz.....	69
FIGURA 12	Modelo de interação entre inibidor da família Kunitz de algaroba (<i>Prosopis juliflora</i>) e a tripsina.....	70
FIGURA 13	- Efeito de incorporação de inibidor de sementes de canafístula (<i>Peltophorm dubium</i>), denominado PDTI, em dieta artificial para <i>Anagasta kuehniella</i>	73

FIGURA 14	- Larvas, pupas e insetos adultos de <i>Anthonomus grandis</i> alimentados sobre dieta contendo 1,15% de SKTI.....	73
FIGURA 15	- Jurema Branca (<i>Pithecellobium dumosum</i>).....	76
FIGURA 16	- Esquema de hidrólise do BApNA.....	83
FIGURA 17	- Esquema da tripsina bovina acoplada a Sepharose.....	85
FIGURA 18	Esquema de isolamento e purificação dos inibidores de tripsina de sementes de Jurema Branca.....	88
FIGURA 19	Esquema de sequenciamento de proteínas por degradação de Edman.....	93
FIGURA 20	- Esquema de hidrolise do BANA pela papaína.....	98
FIGURA 21	- Atividade anti-tríptica e específica (UI/mg proteína) de frações protéicas de sementes de Jurema Branca.....	104
FIGURA 22	- Perfil de eluição de JB14 em Tripsina-Sepharose.....	106
FIGURA 23	- Perfil cromatográfico de JB14Af em CLAE (coluna semi-preparativa C18 Vydac – 2,2 x 25,00 cm).....	108
FIGURA 24	- Análise de purificação de JB1 em CLAE.....	110
FIGURA 25	- Análise de purificação de JB2 em CLAE.....	111
FIGURA 26	- Análise de purificação de JB3 em CLAE.....	112
FIGURA 27	- Análise de purificação de JB4 em CLAE.....	113
FIGURA 28	- Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) das frações protéicas de Jurema Branca.....	115
FIGURA 29	- SDS-PAGE 15% de JB1, JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4 de sementes de Jurema Branca.....	116
FIGURA 30	- Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) dos inibidores purificados de semente de Jurema Branca na presença de β -Me.....	120
FIGURA 31	- Análise da massa molecular de JB1 por MALDI-TOF.....	122
FIGURA 32	- Análise da massa molecular de JB3-1 (A) e JB3-2 (B) por MALDI-TOF.....	123
FIGURA 33	- Determinação da massa molecular de JB2 por SDS-PAGE.....	124

FIGURA 34	- Determinação da massa molecular de JB4 por SDS-PAGE.....	125
FIGURA 35	- Alinhamento das seqüências N-terminal.....	127
FIGURA 36	- Estabilidade de JB1 (A) e JB2 (B) em diferentes pHs.....	129
FIGURA 37	- Estabilidade de JB3-1 (A) e JB3-2 (B) em diferentes pHs..	130
FIGURA 38	- Estabilidade de JB4 em diferentes pHs.....	131
FIGURA 39	- Estabilidade térmica de JB1 (A) e JB2 (B).....	133
FIGURA 40	- Estabilidade térmica de JB3-1 (A) e JB3-2 (B).....	134
FIGURA 41	- Estabilidade térmica de JB4.....	135
FIGURA 42	- Mecanismo de inibição de JB1 (A) e JB2 (B) sobre a atividade catalítica da tripsina.....	139
FIGURA 43	- Mecanismo de inibição de JB4 sobre a atividade catalítica da tripsina.....	140
FIGURA 44	- Mecanismo de inibição de JB1 (A) e JB2 (B) sobre a atividade catalítica da papaína.....	142
FIGURA 45	- Determinação do valor de K_i de JB1 (A) e JB2 (B) sobre a papaína.....	143

LISTA DE TABELAS

TABELA	1	-	Pragas que atacam feijão-de-corda (<i>Vigna unguiculata</i>).....	30
TABELA	2	-	Classificação das endopeptidases ou proteinases.....	37
TABELA	3	-	Família de inibidores de proteinases de plantas.....	48
TABELA	4	-	Inibidores bifuncionais.....	49
TABELA	5	-	Distribuição botânica e propriedades de algumas Fitocistatinas.....	53
TABELA	6	-	Distribuição botânica e propriedades de alguns inibidores da família Kunitz.....	64
TABELA	7	-	Tabela de purificação.....	118
TABELA	8	-	Especificidade de JB1, JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4 para proteinases serínicas e cisteínicas.....	137
TABELA	9	-	Constante de inibição.....	140
TABELA	10	-	Especificidade de JB1, JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4 para enzimas digestórias de insetos.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOH	Ácido acético
ACN	Acetonitrila
BANA	α -N-benzoil-arginina-p-naftilamida
BAPNA	α -N-benzoil-arginina-p-nitroanilina
β -Me	β -Mercaptoetanol
BSA	Albumina sérica bovina
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMACA	4-Dimetilaminocinamaldeido
DMSO	Dimetilsulfóxido
D.O.	Densidade óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etileno dianimotetracético
EtOH	Álcool etílico ou etanol
HCl	Ácido clorídrico
MeOH	Álcool metílico ou metanol
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)
PITC	Fenilisocianato
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
TCA	Ácido tricloroacético
Temed	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TFA	Ácido trifluoroacético

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Aspectos gerais.....	22
1.2	Pragas da agricultura.....	24
1.3	Proteinases de Insetos.....	35
1.4	Mecanismo de defesas de plantas.....	40
1.4.1	Proteínas de defesas de plantas.....	41
1.5	Inibidores de enzimas hidrolíticas.....	42
1.5.1	Inibidores de α -amilase	43
1.5.2	Inibidores de proteinases.....	46
1.5.2.1	Classificação de inibidores de proteinases de plantas.....	47
1.6	Inibidores de proteinases cisteínicas.....	50
1.6.1	Família de inibidores de bromelaína.....	50
1.6.2	Família de inibidores de proteinases cisteínicas da família Kunitz.....	51
1.6.3	Inibidores da família fitocistatina.....	52
1.7	Inibidores de proteinases serínicas.....	58
1.7.1	Inibidores da família Bowman-Birk.....	58
1.7.2	Inibidores da família Kunitz.....	61
1.7.2.1	Estrutura e mecanismo de inibição de inibidores da família Kunitz.....	66
1.7.2.2	Efeito de inibidores da família Kunitz sobre insetos.....	71
2	OBJETIVOS	75
3	MATERIAL	76
3.1	Sementes.....	76
3.2	Insetos.....	77
3.3	Enzimas comerciais.....	78

3.4	Substratos sintéticos.....	79
3.5	Substrato protéico.....	79
3.6	Reagentes.....	79
3.7	Equipamentos.....	80
4	MÉTODOS.....	81
4.1	Preparação do extrato protéico de sementes de Jurema Branca.....	81
4.2	Fracionamento protéico com ácido tricloroacético (TCA).....	81
4.3	Quantificação de proteínas.....	82
4.4	Preparo das soluções usadas como substrato.....	82
4.5	Determinação da atividade anti-trípica.....	83
4.6	Isolamento e purificação.....	84
4.6.1	Cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose.....	84
4.6.2	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	86
4.7	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	89
4.7.1	SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras.....	89
4.7.2	SDS-PAGE em condições desnaturantes e redutoras.....	89
4.7.3	Coloramento com Comassie Blue.....	90
4.7.4	Revelação com nitrato de prata.....	90
4.8	Caracterização dos inibidores purificados.....	91
4.8.1	Determinação da massa molecular por espectrometria de massa.....	91
4.8.2	Seqüenciamento da extremidade N-terminal.....	91
4.8.3	Análise e alinhamento da seqüência N-terminal.....	94
4.9	Estabilidade dos inibidores em variações de pHs e temperatura.....	95
4.9.1	Estabilidade dos inibidores em variações de pH.....	95
4.9.2	Estabilidade térmica dos inibidores.....	95
4.10	Especificidade dos inibidores para proteinases serínicas e cisteínicas.....	96

4.10.1	Inibição da elastase.....	96
4.10.2	Inibição da quimotripsina.....	96
4.10.3	Inibição da bromelaína.....	97
4.10.4	Inibição da papaína.....	97
4.11	Determinação do mecanismo e da constante de inibição dos inibidores.....	99
4.11.1	Sistema enzimático tripsina x BApNA.....	99
4.11.2	Sistema enzimático papaína x BANA.....	100
4.12	Preparo das enzimas digestórias de insetos.....	101
4.12.1	Ensaio <i>in vitro</i> com <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Zabrotes subfasciatus</i>	101
4.10.1.2	Ensaio <i>in vitro</i> para <i>Ceratites capitata</i> , <i>Alabama argillacea</i> e <i>Plodia interpunctella</i>	102
5	RESULTADOS.....	103
6	DISCUSSÃO.....	146
7	CONCLUSÕES.....	163
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	164
9	APÊNDICES.....	204
9.1	APÊNDICE A - Identification of a Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from <i>Pithecellobium dumosum</i> Seeds with Insecticidal Properties and Double Activity.....	204
9.2	APÊNDICE B - Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from <i>Pithecellobium dumosum</i> seeds and its <i>in vitro</i> effects towards digestive of enzyme insect pests.....	213

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais

Uma planta é considerada saudável ou normal quando pode executar todas as suas funções fisiológicas, de acordo com seu potencial genético. Essas funções incluem fotossíntese e reprodução, entre outras. Se uma planta sofre distúrbios em uma ou mais de suas funções ela é considerada doente (AGRIOS, 1988). As doenças podem ser causadas por fatores abióticos, quando é produzida por temperaturas extremas, excesso ou falta de água, luz ou oxigênio, poluição, etc., ou por fatores bióticos, quando causadas pelo ataque de pragas ou patógenos (KOGAN, 1986).

As pragas e os patógenos (fungos, bactérias, vírus e nematóides), por se alimentarem dos tecidos de plantas, são responsáveis por grandes prejuízos na agricultura mundial. As perdas chegam a 37%, sendo 13% desta causadas por insetos e doenças (GATEHOUSE; BOULTER; HILDER, 1992). Ao se alimentarem de tecidos de plantas, os predadores utilizam enzimas digestórias como carboidrases e proteases (exopeptidases e endopeptidases) para digerir o conteúdo da dieta e, dessa forma, obter nutrientes essenciais que irão garantir seu ciclo de vida (HAQ; ATIF; KHAN, 2004; SILVA *et al.*, 2006). No entanto, as plantas possuem certo grau de resistência; e elas utilizam vários compostos químicos para deter a herbivoria dos predadores. Atualmente, sabe-se que esses compostos são encontrados em vários tecidos vegetais, onde são expressas constitutivamente e indutivamente várias moléculas como antibióticos, alcalóides, terpenos e proteínas. Entre as proteínas relacionadas à defesa, encontram-se enzimas (quitinases e β -glucanases), lectinas e inibidores de enzimas digestórias (inibidores de amilases e de proteinases) (RYAN, 1990). Em vários tecidos de plantas já foram identificados, isolados e purificados inibidores para todos os tipos de proteinases conhecidas, serínicas, cisteínicas, metaloproteinases e proteinases aspárticas, sendo que as pesquisas enfatizam os inibidores de proteinases das classes serínica e cisteínica (RYAN, 1990; JOUANIN *et al.*, 1998). As pesquisas relacionadas aos inibidores de proteinases e amilases vêm se intensificando nos últimos anos como uma tentativa

de elucidar questões concernentes à sua estrutura, papel fisiológico, mecanismo de ação, evolução e, principalmente, seu envolvimento nos mecanismos de defesa de plantas (BRZIN; KIDRIC, 1995; SONG; SUH, 1998; BODE; HUBER, 1992, 2000; KRAUCHENCO *et al.*, 2003, 2004; GOMES *et al.*, 2005a; ARAÚJO *et al.*, 2005a; BHATTACHARYYA *et al.*, 2006).

A agricultura tem constantemente passado por transformações a fim de atender a demanda alimentar que cresce de forma espantosa, bem como a busca por novas alternativas de controle visando minimizar os prejuízos causados por pragas e patógenos. Neste sentido, os inibidores de amilases e proteinases apresentam grande potencial no controle de pragas por reduzir ou impedir a atividade de enzimas digestórias de insetos (JOUANIN *et al.*, 1998; SCHULER *et al.*, 1998; FRIZZAS; CUNHA; MACEDO, 2004), por meio de métodos de transgenia.

O uso de plantas modificadas geneticamente remonta da década de oitenta, quando genes de inibidores de proteinases foram transferidos para plantas de tabaco, *Nicotiana tabacum* (HILDER *et al.*, 1987). Atualmente, várias plantas de interesse comercial já foram transformadas com genes de inibidores de proteinases, que atuam naturalmente como compostos de defesa de plantas contra pragas (HILDER *et al.*, 1987; JOUANIN *et al.*, 1998; SCHULER *et al.*, 1998; HILDER; BOULTER, 1999). Dessa forma, a busca de novos genes codificadores de proteínas de defesa de plantas tem se intensificado e, nesse contexto, os inibidores de enzimas digestórias vêm despertando interesses, sendo indicados como potenciais candidatos para obtenção de plantas cultivadas resistentes. Em consequência, a geração de conhecimentos sobre as propriedades moleculares desses inibidores, bem como a determinação de sua especificidade sobre enzimas digestórias de insetos, são passos importantes para a indicação de um inibidor que possa ser usado para produção de plantas transgênicas resistentes a pragas (HILDER *et al.*, 1987; JOUANIN *et al.*, 1998; SCHULER *et al.*, 1998; HILDER; BOULTER, 1999; HAQ; ATIF; KHAN, 2004).

1.2 Pragas da agricultura

Na agricultura, o conceito de praga está diretamente relacionado com os efeitos econômicos produzidos por vários organismos. Assim, consideram-se pragas, quaisquer animais (insetos, ácaros, nematóides, roedores e pássaros) que competem com o homem pelo alimento por ele produzido (ZUCCHI; VENDRAMIM; BERTI, 1992).

Durante o desenvolvimento vegetativo e reprodução, aumenta a ocorrência de pragas que atacam folhas e vagens. As pragas iniciais ou de solo alimentam-se de sementes, plântulas e da parte subterrânea das plantas. Com o aumento da área foliar, há maior incidência de lagartas desfolhadoras e insetos sugadores que afetam o crescimento das plantas através da desfolha excessiva ou da injeção de toxinas. Entre os principais sugadores estão os pulgões, as cochonilhas, as moscas brancas, as cigarrinhas, os percevejos e os tripses. Os insetos mastigadores, como os gafanhotos, grilos, esperanças, paquinhas, cupins, formigas, besouros, coleobrocas, lagartas, larvas minadoras e broqueadoras, mariposas, borboletas, traças, abelhas e vespas, destroem os tecidos de qualquer parte da planta causando lesões que podem ser a porta de entrada para microorganismos (ZUCCHI; VENDRAMIM; BERTI, 1992; XAVIER-FILHO, 1993; UCHOA *et al.*, 2002). Os danos produzidos por pragas podem ocasionar queda de valor comercial, comprometer a população final de plantas e o rendimento da lavoura (ZUCCHI; VENDRAMIM; BERTI, 1992).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas frescas no mundo, produzindo aproximadamente 35 milhões de toneladas anuais, gerando 4 milhões de empregos diretos e um PIB (Produto Interno Bruto) agrícola de US\$ 11 bilhões, segundo o Instituto Brasileiro de frutas (IBRAF) (2001a). As moscas-das-frutas (Díptera: Tephritidae) são insetos praga que se alimentam de grande variedade de espécies vegetais produzindo danos de grande proporção às culturas de mamão, citros, maçã, maracujá, nectarina, nêspira, pêra, acerola e ameixa. Podem afetar flores, ramos, sementes e frutos, mas os danos causados em frutos representam os maiores prejuízos para a fruticultura de diversos países de clima tropical e subtropical, pois, nesse grupo, compreendem espécies que vivem sob as mais adversas condições climáticas e ecológicas do globo além de elevada capacidade de adaptação. Os tefritídeos possuem ciclo de vida relativamente curto, porém

apresentam metamorfose completa (holometabólicos). Durante o ciclo biológico passam por quatro estágios até completar seu desenvolvimento: ovo, larva, pupa e adulto (MALAVASI; BARROS, 1988; MORGANTE, 1991; SALES *et al.*, 2000). A fêmea deposita seus ovos no interior do fruto, de onde, depois de determinado tempo, eclodem as larvas que passam a se alimentar da polpa por todo o período larval. É nessa fase que ocorre o prejuízo direto causado ao fruto, tornando-o impróprio para o consumo *in natura*, bem como para comercialização ou industrialização (MALAVASI; BARROS, 1988; MACEDO, 2005). No Brasil existem quatro gêneros de moscas-das-frutas (Díptera: Tephritidae) de importância econômica: *Anastrepha*, *Bactrocera*, *Ceratitis* e *Rhagoletis*. A mosca do mediterrâneo (FIGURA 1), *Ceratitis capitata*, é a espécie que representa o gênero *Ceratitis* no Brasil.

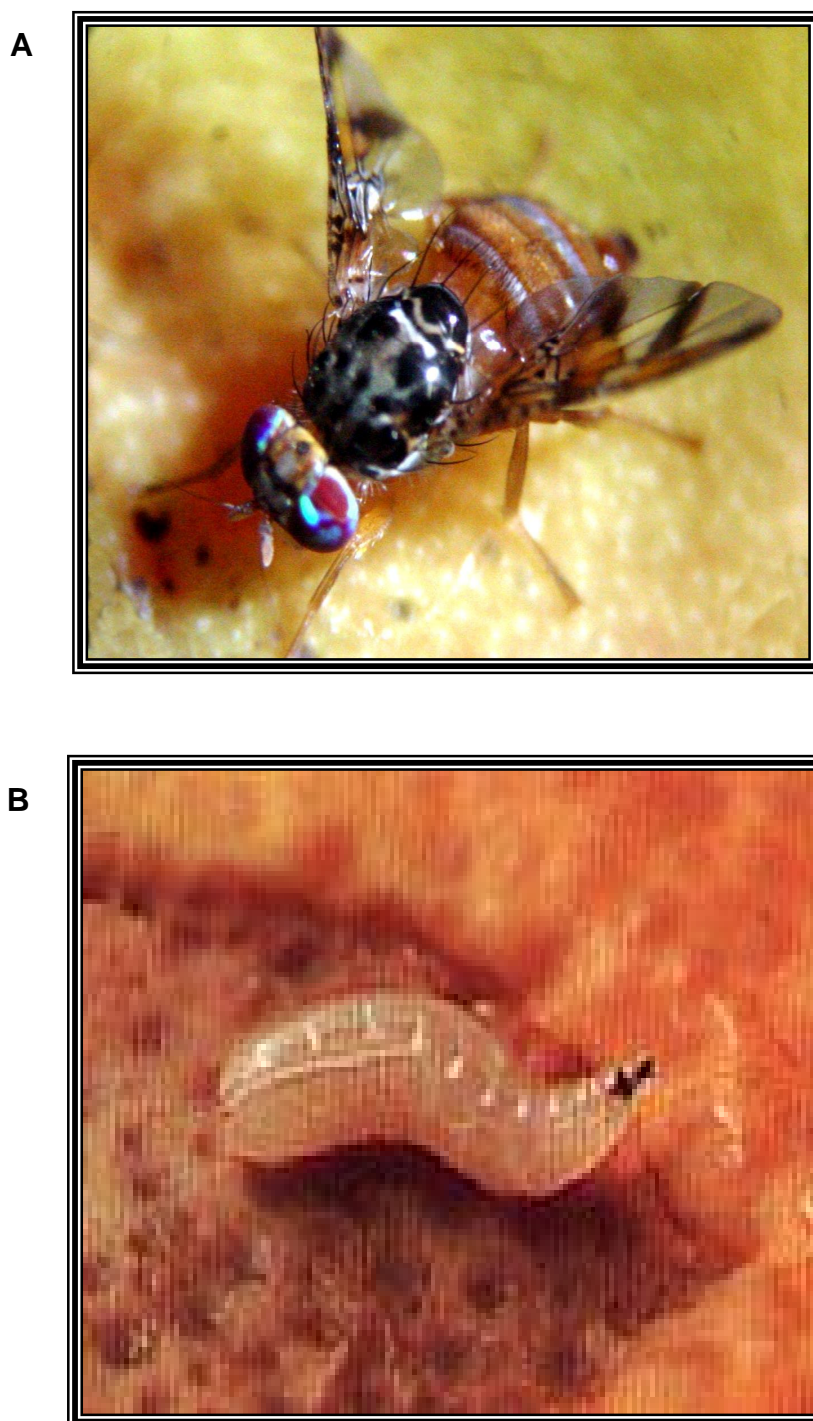


FIGURA 1: *Ceratitidis capitata* (moscas-das-frutas), inseto adulto (A) e larva infestando mamão (*Caryca papaya*) (B).

Fonte: MACEDO, 2005

O algodão pertencente à família *Malvaceae*, que é uma das principais culturas utilizadas para a produção de fibras no mundo. Sua fibra é utilizada na produção de fibra têxtil, de outros produtos não têxteis e é fonte de celulose industrial para diversos produtos. As espécies de algodão cultivadas comercialmente no Brasil são *Gossypium hirsutum* e em menor área *G. barbadense*. No entanto, para o agronegócio nordestino, a cultura do algodão herbáceo (*Gossypium hirsutum*), destaca-se como uma das mais importantes para a região, em especial para os pequenos e médios produtores. Uma das grandes vantagens desta atividade é que mais de 75 % do custo de produção é com mão-de-obra o que significa ocupação para milhares de trabalhadores rurais. O algodão produzido pelas pequenas propriedades na região Nordeste é todo colhido à mão, o que proporciona a obtenção de um produto de elevada qualidade (AMORIM NETO; BELTRÃO, 1999; BELTRÃO; BEZERRA, 1994). Todavia, as pragas constituem-se um dos fatores limitantes para sua exploração. Entre as principais pragas da conicultura destacam-se o pulgão-do-algodoeiro (*Aphis gossypii* – Hemiptera: Aphididae), o percevejo rajado (*Horcias nobilellus*), a mosca-branca (*Bemisia tabaci* - Hemiptera: Aleyrodidae), o bicudo do algodoeiro (*Anthonomus grandis* – Coleoptera: Curculionidae), a lagarta-da-maçã (*Heliothis virescens* - Lepidoptera: Noctuidae), a lagarta-rosada (*Pectinophora gossypiella* - Lepidoptera: Gelechiidae), a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda* - Lepidoptera: Noctuidae) e o curuquerê-do-algodoeiro (*Alabama argillacea* – Lepidoptera: Noctuidae). *A. argillacea* é uma praga desfolhadora exclusiva do algodoeiro (FIGURA 2), também conhecido como lagarta das folhas do algodoeiro e lagarta “mede-palmo” do algodoeiro. Os ovos são postos sobre as folhas pelas mariposas. Ao nascerem, as lagartas alimentam-se do parênquima das folhas e à medida que tornam-se maiores, passam a devorar todos os tecidos das folhas deixando somente as nervuras. O desfolhamento da planta resulta na redução da cultura do algodão e qualidade da fibra (LEONARD; GRAVES; ELLSWORTH, 1999; RAMALHO, 1994).

A



B



FIGURA 2: *Alabama argillacea* (curuquerê-do-algodoeiro), mariposa (A) e larvas em folha de algodão (*Gossypium hirsutum*) (B).

Fontes:

http://www.inra.fr/internet/produits/papillon/noctuid/ophideri/textfr/a_argill.htm (A)

VIDAL *et al.*, 2005 (B)

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores mundiais de feijão (FAO, 2004). O cultivo dessa leguminosa encontra-se distribuído em praticamente todo o território nacional, sendo os gêneros, *Phaseolus* e o *Vigna*, os mais cultivados (WANDER, 2005). Para as populações rurais, o feijão apresenta-se como uma das principais alternativas sociais e econômicas; do suprimento alimentar, sendo ele ainda a principal fonte protéica vegetal para a população, à geração de emprego. (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2004; FUSCALDI; PRADO, 2005). Contudo a produtividade do feijão é considerada baixa devido a alguns fatores, entre eles, encontram-se as doenças causadas por patógenos (vírus, fungos e bactérias, nematóides) e insetos, as quais influenciam qualitativamente e quantitativamente no feijão produzido (PONTE, 1988; XAVIER-FILHO, 1993; SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2000; UCHÔA *et al.*, 2002; EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2004). Devido à diversidade de pragas que atacam o feijoeiro, todas às estruturas da planta como raízes, troncos, ramos, folhas, flores, frutos, vagens e sementes são susceptíveis ao ataque dessas pragas (GALLO *et al.*, 1988), que podem ser agrupadas em duas principais categorias: onde uma delas compreende as pragas subterrâneas, que atacam as sementes, raízes e o colo da planta; e a outra, as pragas das partes aéreas. Neste último caso, encontram-se as pragas das folhas, que consomem ramos e folhas; pragas dos órgãos reprodutivos, que utilizam flores e vagens como hospedeiros; e as pragas dos grãos armazenados (EMBRAPA MEIO-NORTE, 2003; ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2003). A TABELA 1 mostra várias pragas que atacam o feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) uma importante cultura de subsistência na Região Nordeste, também conhecido como feijão-miúdo, feijão-da-colônia, feijão-de-praia, feijão-de-estrada, feijão-catador, feijão-gurutuba, feijão-fradinho, feijão-macaçar e feijão-caupi (XAVIER-FILHO, 1993).

TABELA 1 - Pragas que atacam feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*)

Pragas	Insetos	Ordem: Família
Subterrâneas	<i>Neocurtilla hexadactyla</i> (paquinha)	Orthoptera: Gryllotalpidae
	<i>Elasmopalpus lignosellus</i> (lagarta elasmó)	Lepidoptera: Pyralidae
	<i>Agrotis ipsilon</i> (lagarta-rosca)	Lepidoptera: Noctuidae
Das folhas	<i>Diabrotica speciosa</i> (vaquinha)	Coleoptera: Chrysomelidae
	<i>Cerotoma arcuata</i> (vaquinha)	Coleoptera: Chrysomelidae
	<i>Spodoptera frugiperda</i> (lagarta-militar)	Lepidoptera: Noctuidae
	<i>Mocis latipes</i> (lagarta-dos-capinzais)	Lepidoptera: Noctuidae
	<i>Spodoptera latifascia</i> (lagarta-preta-das-folhas)	Lepidoptera: Noctuidae
	<i>Empoasca kraemeri</i> (cigarrinha verde)	Hemiptera: Cicadellidae
	<i>Aphis gossypii</i> (pulgão-do-algodoeiro)	Homoptera: Aphididae
	<i>A. craccivora</i> (pulgão-preto-do-feijoeiro)	Homoptera: Aphididae
	<i>A. fabae</i> (pulgão-negro-da-fava)	Homoptera: Aphididae
	<i>Liriomyza sativae</i> (minador-das-folhas)	Díptera: Agromyziidae
Dos órgãos reprodutivos	<i>Crinocerus sanctus</i> (percevejo-vermelho-do-caupi)	Hemiptera: Coreidae
	<i>Piezodorus guildinii</i> (percevejo pequeno da soja)	Hemiptera: Pentatomidae
	<i>Nezara viridula</i> (percevejo-verde-da-soja)	Hemiptera: Pentatomidae
	<i>Etiella zinckenella</i> (broca-da-vagem)	Lepidoptera: Phycitidae
	<i>Maruca testulales</i> (lagarta das vagens)	Lepidoptera: Phycitidae
	<i>Chalcodermus bimaculatus</i> (manhoso)	Coleoptera: Curculionidae
	<i>Frankliniella schultzei</i> (tripes)	Thysanoptera: Thripidae
Dos grãos armazenados	<i>Plodia interpunctella</i> (traça-indiana-da-farinha)	Lepidoptera: Pyralidae
	<i>Callosobruchus maculatus</i> (caruncho do feijão-de-corda)	Coleoptera: Bruchidae
	<i>C. analis</i>	Coleoptera: Bruchidae
	<i>C. chinensis</i>	Coleoptera: Bruchidae
	<i>Zabrotes subfasciatus</i> (Caruncho do feijão comum)	Coleoptera: Bruchidae
	<i>Acanthoscelides obtectus</i> (Caruncho do feijão comum)	Coleoptera: Bruchidae
	<i>A. clandestinus</i>	Coleoptera: Bruchidae

Fontes: EMBRAPA MEIO-NORTE, 2003; ANDRADE JUNIOR *et al.*, 2003.

Além de todas as pragas presentes nas áreas de cultivo de feijão, esta cultura enfrenta, também, sérios problemas quanto à sua conservação em armazéns. A principal ordem de inseto envolvida na contaminação dos grãos armazenados é a Coleoptera, sendo todas as espécies pertencentes à família Bruchidae. As principais são: *Acanthoscelides obtectus*, *Zabrotes subfasciatus* (FIGURA 3), *Callosobruchus analis*, *C. chinensis* e *C. maculatus* (FIGURA 4), também conhecidos como carunhos ou gorgulhos de feijão. Na infestação, as fêmeas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* aderem seus ovos firmemente sobre as vagens ou sementes, enquanto as fêmeas de *A. obtectus* colocam seus ovos livremente nas trincas e rachaduras das sementes ou vagens. Depois da eclosão, as larvas furam e entram imediatamente no grão, quando já instaladas, destróem os cotilédones e os germes. Antes de empupar, a larva faz um orifício para a saída dos adultos que tem vida curta e não se alimentam, e fora dos grãos, os adultos, reiniciam o ciclo biológico (<http://www.centreinar.org.br/pragas/index.html>; EMBRAPA MEIO-NORTE, 2003). Os danos causados por esses bruquídeos são a perda de peso, a redução do poder germinativo e nutritivo, comprometendo o valor comercial dos grãos (BASTOS, 1973; GALLO *et al.*, 2002), além de facilitar a entrada de microrganismos e ácaros e o aquecimento dos grãos (ROSOLEM; MARUBAYASHI, 1994).

Insetos da ordem Lepidoptera (mariposas e traças) também são encontrados atacando grãos e subprodutos armazenados, no entanto, os adultos por terem o corpo mole, permanecem na superfície dos grãos, principalmente aqueles trincados ou quebrados. As larvas são muito ativas e não causa, somente, danos ao produto como também pode servir de entrada para fungos e bactérias (REES *et al.*, 2004; MOHANDASS *et al.*, 2006). O Lepidoptera da família Pyralidae, *Plodia interpunctella*, comumente conhecido como traça-indiana-da-farinha ou traça-dos-cereais (FIGURA 5), ataca o milho, trigo, arroz em casca, soja, amendoim e uma grande variedade de produtos farináceos, frutas secas, nozes, chocolates, rações para animais, amêndoas e feijão-de-corda em condições de armazenamento (SIMMONS; NELSON, 1975; MBATA, 1987; COX; BELL, 1991; JOHNSON *et al.*, 1992, 1995a; NA; RYOO, 2000; EMBRAPA MEIO-NORTE, 2003).



FIGURA 3: *Zabrotes subfasciatus* (gorgulho de feijão comum, *Phaseolus vulgaris*), inseto adulto (A) e larvas infestando sementes de feijão comum (B).

Fontes:

<http://www.padil.gov.au/comparePestImages.aspx?pestIds=402,385,405,409,413,403,376,389,404,394,393,390,388,536,595,129&diag=6&over=1,2,4&Mode=Images> (A)

MOURA, 2006 (B)



FIGURA 4: *Callosobruchus maculatus* (gorgulho de feijão-de-corda, *Vigna unguiculata*), inseto adulto (A) e adultos infestando sementes de feijão-de-corda (B).

Fontes:

<http://www.padil.gov.au/comparePestImages.aspx?pestIds=402,385,405,409,413,403,376,389,404,394,393,390,388,536,595,129&diag=6&over=1,2,4&Mode=Images> (A)

EMBRAPA MEIO-AMBIENTE, 2003 (B)

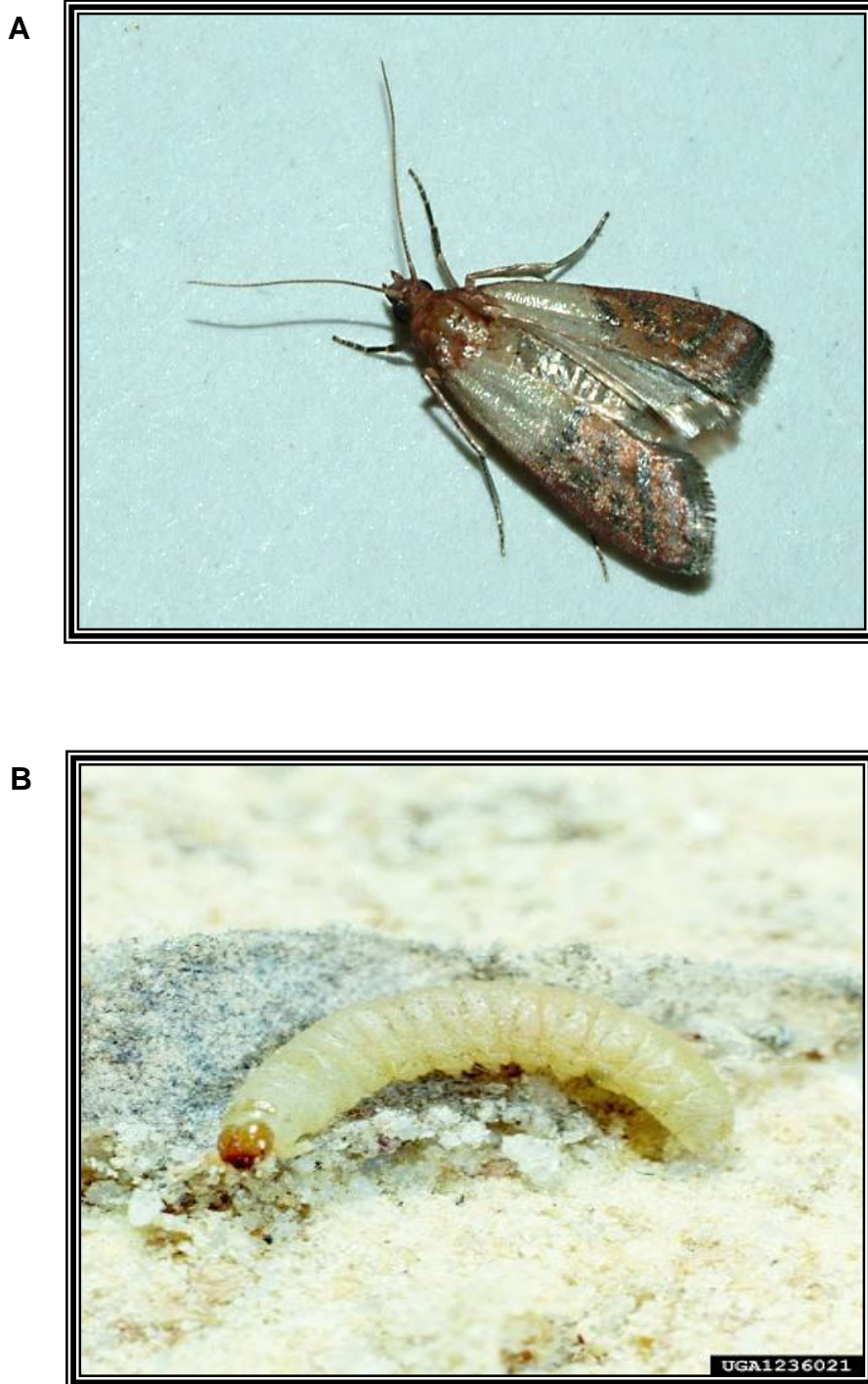


FIGURA 5: *Plodia interpunctella* (traça-indiana-da-farinha), inseto adulto (A) elarva (B).

Fontes:

<http://www.invasive.org/browse/detail.cfm?imgnum=1236021> (A)

http://www.jpmoth.org/Pyralidae/Phycitinae/Plodia_interpunctella.html (B)

1.3 Proteinases de insetos

Para se propor o uso biotecnológico de novos inibidores de enzimas de insetos-pragas, é necessário o conhecimento das classes mecanísticas das enzimas usadas nos processos digestórios destas pragas. Segundo o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB, 1992), as enzimas proteolíticas ou proteases, as hidrolases, hidrolisam ligações peptídicas em proteínas, pertencem a classe 3 (EC 3.) e subclasse 3.4. (EC 3.4.). Essas enzimas se encontram subdivididas em duas grandes classes, as exopeptidases e endopeptidases (STOREY; WAGNER, 1986; NEURATH, 1996; FAN; WU, 2005).

As exopeptidases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas N-terminal ou C-terminal e são convenientemente classificadas com base na especificidade pelo substrato (STOREY; WAGNER, 1986). A FIGURA 6 resume a classificação das exopeptidases mais estudadas.

As endopeptidases ou proteinases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas internas e, o sistema de classificação é baseado nos mecanismos de ação, estrutura tridimensional, e resíduo de aminoácido do sítio ativo envolvido com a catálise. Com isso quatro classes mecanísticas de proteinases foram estabelecidas (TABELA 2), as serínicas- (EC 3.4.21), cisteínicas- (EC 3.4.22), aspárticas- (EC 3.4.23) e metalo-proteinases (EC 3.4.24) (STOREY; WAGNER, 1986; NEURATH, 1996; FAN; WU, 2005).

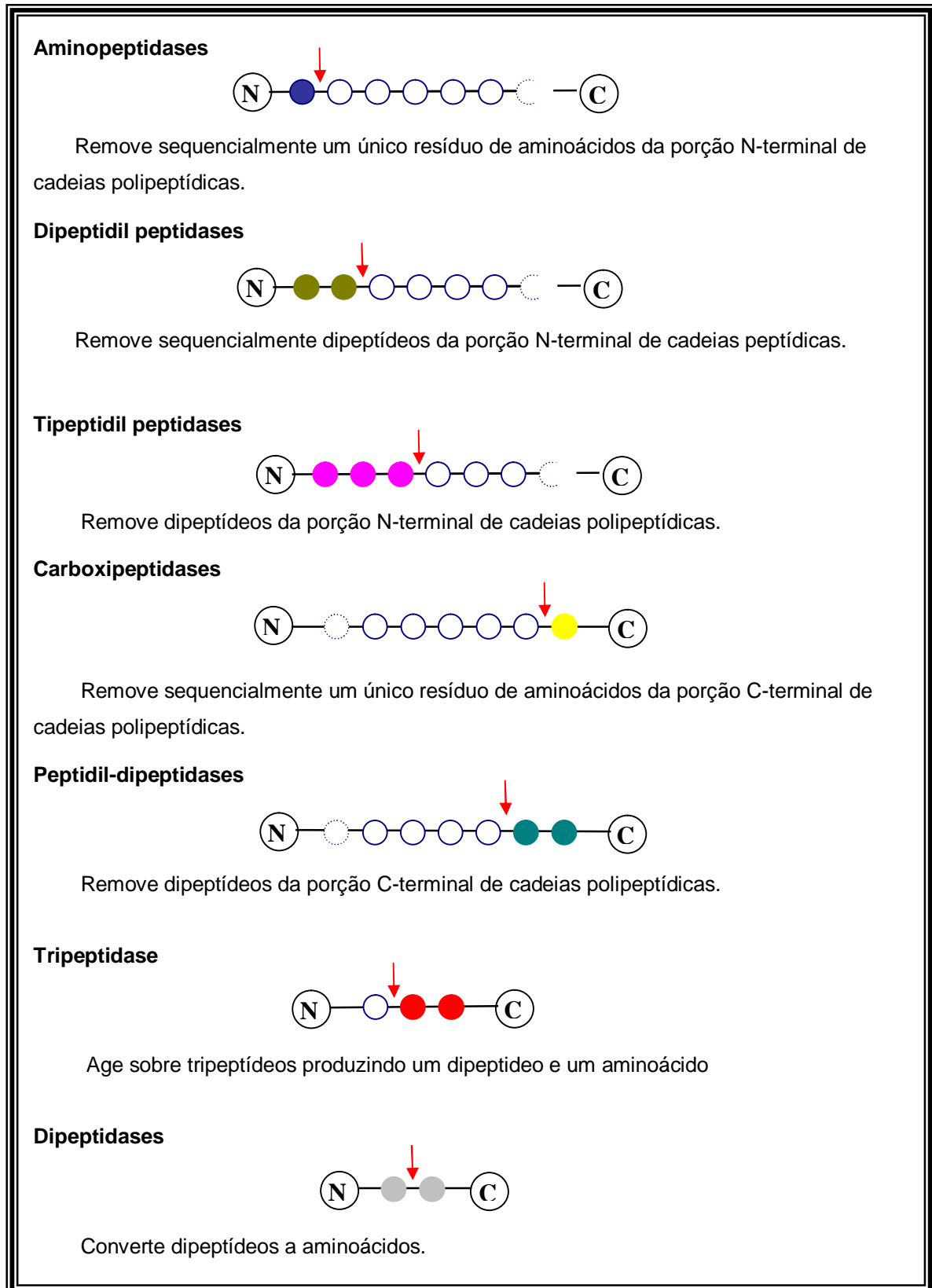


FIGURA 6: Classificação das exopeptidases.

TABELA 2 - Classificação das endopeptidases ou proteinases

Famílias	Faixa de pH ótimo	Resíduos do Sítio Ativo	Enzimas	Principais Sítios de Ação
Serínica (E.C. 3.4.21)	7.0 – 9.0	Asparagina	Tripsina	Arginina e Lisina
		Serina	Quimotripsina	Triptofano, Tirosina, Fenilalanina, Leucina, Metionina, Isoleucina, Serina, Treonina, Valina e Histidina.
		Histidina	Elastase	Alanina, Serina e Glicina.
Cisteínica (E.C. 3.4.22)	4.0 – 7.0	Cisteína	Papaína	Ampla especificidade, mas preferencialmente clivam
		Aspartato	Catepsinas (B, H, L)	ligações peptídicas de
		Histidina	Ficina	aminoácidos básicos
			Bromelaína	(Arginina e Lisina).
Aspártica (E.C. 3.4.23)	< 5.0	Aspartato	Pepsina	Alanina, Valina, Triptofano,
			Catepsina D	Fenilalanina, Tirosina, Leucina e Isoleucina.
			Renina	Leucina
Metallo- proteinase (E.C. 3.4.24)	7.0 – 9.0	Íon metálico	Carboxipeptidase	Ligação amino de resíduos alifáticos
			Termolisina	Leucina e Fenilalanina

E.C., código dado às enzimas pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular que classifica a enzima; 3, representa a Classe = Hidrolase (catalisa reações de hidrólise de ligações covalentes); 4, Sub-Classe = enzimas que hidrolisam ligações peptídicas; 21, Sub sub-classe das proteinases serínicas (enzimas contendo serina no sítio ativo); 22, proteinases cisteínicas (enzimas contendo cisteína no sítio ativo); 23, proteinases aspárticas (enzimas contendo ácido aspártico no sítio ativo); 24, metallo-proteinases (enzimas contendo íon metálico no sítio ativo)

Fontes: STOREY; WAGNER, 1986; NC-IUMBM, 1992; FAN; WU, 2005.

Dentre as classes de proteinases acima descritas, as enzimas proteolíticas de insetos mais estudadas estão distribuídas entre as classes mecanísticas das proteinases serínicas e cisteínicas (APPLEBAUM, 1985, TERRA; FERREIRA, 1994).

Enzimas digestórias semelhantes a proteinases serínicas foram detectadas em uma grande variedade de ordens de insetos: Na ordem tisanura, em *Thermobia domestica* (ZINKLER; POLZER, 1992); Nos insetos ortópteros como, *Locusta migratória* (LAM; COAST; RAYNE, 1999, 2000) e *Teleogryllus commodus* (CHRISTELLER *et al.*, 1992); Em insetos da ordem himenoptera como em *Scaptotrigona bipunctata* (SCHUMAKER; CRISTOFOLETTI; TERRA, 1993); Na ordem díptera, em *C. capitata* (SILVA *et al.*, 2006), *Chrysomya bezziana* (MUHARSINI *et al.*, 2001), *Phlebotomus papatasi* (RAMALHO-ORTIGÃO *et al.*, 2003), *Stoxomys calcitrans* (MOFFAT; BLAKEMORE; LEHANE, 1995), *Lucilia cuprina* (CASU *et al.*, 1994) e *Anopheles gambiae* (MULLER *et al.*, 1993); Na ordem lepidoptera, em *H. virescens* (JOHNSTON *et al.*, 1995), *Sesamia nonagrioides* (ORTEGO; NOVILLO; CASTANERA, 1996; NOVILLO; CASTANHERA; ORTEGO, 1998), *Lacanobia oleracea* (GATEHOUSE *et al.*, 1999), *A. argillacea* (VIDAL *et al.*, 2005) e *Ostrinia nubilalis* (BERNARDI *et al.*, 1996); Na ordem hemiptera como detectado em *Nilaparvata lugens* (FROISSAC *et al.*, 2002) e *Creotinades dilutus* (COLEBATCH; EAST; COOPER, 2001) e na ordem coleoptera, em *Phaedon cochleariae* (GIRARD *et al.*, 1998a), *Tenebrio molitor* (TERRA; CHRISTOFOLETTI, 1996), *Rhyzopertha dominica* (ZHU; BAKER, 1999), *A. grandis* (PURCELL; GREENPLATE; SAMMONS, 1992; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2004a, b) e *Rhynchophorus ferrugineus* (ALARCON *et al.*, 2002). Isto se deve ao fato de que esses insetos possuem o pH do conteúdo intestinal alcalino, viabilizando a presença marcante de enzimas proteolíticas como tripsina, quimotripsina e elastase (TERRA; FERREIRA, 1994).

O uso de proteinases cisteínicas pode ser uma adaptação evolutiva que permite aos insetos alimentarem-se de sementes e de outros tecidos das plantas que são naturalmente rica em inibidores de proteinases serínicas (RYAN, 1990). As proteinases cisteínicas são enzimas predominantes que ocorrem no intestino de larvas de muitos insetos da ordem coleóptera, particularmente da família bruquídea, que possuem ótima atividade digestória em condições levemente ácidas, como em *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* e *A. obtectus* (KITCH; MURDOCK, 1986; MURDOCK *et al.*, 1987; CAMPOS *et al.*, 1989; WIEMAN; NIELSEN, 1988; SILVA; XAVIER-

FILHO, 1991). Proteinases cisteínicas também ocorrem, predominantemente, em alguns coleopteros da família chrysomelidae como em *Diabrotica undecimpunctata* (LIU *et al.*, 2004), *D. virgifera* (CRISTOFOLETTI; RIBEIRO; TERRA, 2005, KOIWA *et al.*, 1997, 2000; BOWN *et al.*, 2004), *Leptinotarsa decemlineata* (THIE; HOUSEMAN, 1990; GRUDEN *et al.*, 1998, CRISTOFOLETTI; RIBEIRO; TERRA, 2005) e *P. cochleariae* (CRISTOFOLETTI; RIBEIRO; TERRA, 2005), e na família curculionidae, em *Sitophilus oryzae* e *Hypera postica* (CRISTOFOLETTI; RIBEIRO; TERRA, 2005). Estas enzimas também foram encontradas como proteínas predominantes em alguns insetos da ordem hemiptera como em *Rhodnius prolixus* (HOUSEMAN; DOWNE, 1980, 1981), *Phymata wolffi* (HOUSEMAN; MORRISON; DOWNE, 1985), *Myzus persicae* (RAHBÉ *et al.*, 2003), *A. gossypii* (CRISTOFOLETTI; RIBEIRO; TERRA, 2005), e *Acyrtosiphon pisum* (CRISTOFOLETTI *et al.*, 2003). A ocorrência de proteinases cisteínicas também em insetos hemípteras, e não de proteinases serínicas como tripsina, pode ser resultado de eventos evolutivos (HOUSEMAN; MORRISON; DOWNE, 1985). O ancestral desses insetos pode ter perdido a capacidade de expressar genes que codificam proteinases serínicas e, subsequentemente, houve adaptação à sucção de seiva das plantas ou o ancestral sugador de seiva passou a utilizar, particularmente, proteinases lisosomais como proteinases cisteínicas para a digestão protéica (GOODCHID, 1966).

1.4 Mecanismos de defesas de plantas

Em resposta a herbivoria excessiva dos insetos, devido aos seus desenvolvidos aparatos digestórios, as plantas desenvolveram diversas estratégias de proteção e/ou resistência (KOGAN, 1986; RYAN, 1990; HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997; SCHULER *et al.*, 1998).

A resistência é o termo usado para descrever a capacidade das plantas em prevenir, restringir ou retardar a penetração de um predador no tecido hospedeiro (KOGAN, 1986; HAMMOND-KOSACK; JONES, 1997). Essa resistência é baseada nos vários mecanismos de defesa desenvolvidos pelas plantas, durante a evolução (SCHULER *et al.*, 1998).

As defesas de plantas podem ser classificadas como físicas (espinhos, tricomas e tegumentos) ou químicas se há envolvimento de substâncias químicas nos mecanismos através dos quais elas se protegem. As defesas químicas, por sua vez, podem ser de natureza não protéica ou protéica (RYAN, 1990).

Por outro lado, as defesas também podem ser agrupadas em duas categorias: defesas constitutivas, se sua ação faz-se dentro do programa de desenvolvimento normal da planta nos diferentes tecidos vegetais; ou induzidas, quando estão envolvidas diretamente na resposta à infecção ou estímulos ambientais (CHESIN; ZIPF, 1990; XAVIER-FILHO, 1993; UCHOA *et al.*, 2002).

Essa resposta induzida pode resultar em efetivos mecanismos de resistência a doenças quando ela é expressa pela planta, sistemicamente. Nesse caso, os agentes envolvidos induzem uma resposta do hospedeiro, não apenas em torno das partes atingidas, como também em partes da planta distante da área onde ocorreu a injúria, sendo este processo denominado imunização sistêmica adquirida (DEAN; KUC, 1986; GOTTSTEIN; KUC, 1989). As defesas induzidas são mais importantes para as partes vegetativas das plantas, enquanto que as constitutivas são mais importantes para proteção das sementes (XAVIER-FILHO, 1993; UCHOA *et al.*, 2002).

1.4.1 Proteínas de defesas de plantas

Um grande número de proteínas envolvidas em processo de defesa de plantas foi isolado, purificado e caracterizado. Entre elas, encontram-se proteínas de baixa massa molecular, ricas em resíduos de cisteína, como as defensinas, tioninas (BOHLMANN; APEL 1991; BLOCH; RICHARDSON, 1991; THEVISSSEN *et al.*, 1996; WIJAYA *et al.*, 2000) e proteínas transferidoras de lipídeos (YAMADA, 1992; SEGURA; MORENO; GARCIA-OLMEDO, 1993; GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1995; KADER, 1997); enzimas como peroxidases (JOUANIN *et al.*, 1998), quitinases (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991; RAIKHEL; LEE; BROEKAERT, 1993), β -1,3 glucanases (CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991; RAIKHEL; LEE; BROEKAERT, 1993; COLLINGE *et al.*, 1993; BEINTEMA, 1994; MARGIS-PINHEIRO; MARIVET, BURKARD *et al.*, 1994) e ureases (CARLINI *et al.*, 1997; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002); proteínas semelhantes à taumatinas (RICHARDSON, 1991; JOUANIN *et al.*, 1998, FRANCO *et al.*, 2002); proteínas de reserva como as arcelinas (CARDONA *et al.*, 1990; MIRKOV *et al.*, 1995; HARTWECK; CARDONA; OSBORN, 1997, HARTWECK; OSBORN, 1997; MOUREY *et al.*, 1998; PAES *et al.*, 2000) e vicilinas (MACEDO *et al.*, 1993, 1995; YUNES *et al.*, 1998; SALES *et al.*, 1996, 2001a, b; MOURA *et al.*, 2006; UCHOA *et al.*, 2006); lectinas (CHRISPEELS; GROSSI-DE-AS; HIGGINS, 1998; JOUANIN *et al.*, 1998; HILDER; BOULTER, 1999; VASCONCELOS; OLIVEIRA, 2004); e os inibidores de enzimas hidrolíticas como, inibidores de amilases e de proteinases (GOMES *et al.*, 2005a; ARAÚJO *et al.*, 2005a; MELO *et al.*, 1999; CARLINI; GROSSI-DE-SA, 2002).

1.5 Inibidores de enzimas hidrolíticas

Inibidores de enzimas hidrolíticas são proteínas glicosiladas ou não (CAVALCANTI *et al.*, 2002; AZARKAN *et al.*, 2006), que ocorrem naturalmente em animais, microorganismos e plantas (NEURATH, 1989; RYAN, 1990; BRZIN; KIDRIC, 1995). Os inibidores de enzimas hidrolíticas compreendem uma das mais abundantes classes de proteínas em plantas e muitos trabalhos confirmam seu papel de defesa pelo fato de terem habilidade de suprimir a atividade catalítica de enzimas digestórias de insetos (OLIVEIRA *et al.*, 2002; BEZERRA *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2005a, b; ARAÚJO *et al.*, 2005a, b) e a capacidade de interferir no crescimento e desenvolvimento destes (SCHULER *et al.*, 1998; JOUANIN *et al.*, 1998; FRANCO *et al.*, 2002, 2004, 2005; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2000; LAWRENCE; KOUNDAL, 2002; GOMES *et al.*, 2005a; ARAÚJO *et al.*, 2005a).

Os mecanismos pelos quais os inibidores de enzimas hidrolíticas interferem no processo digestório dos insetos se deve à diminuição da assimilação de nutrientes, devido à sua ligação específica a enzimas hidrolíticas presentes no intestino dos insetos, impedindo que estas executem suas funções no processo digestório (RYAN, 1990). Quando insetos são submetidos à dieta artificial contendo inibidores específicos, estes têm seu desenvolvimento atrasado e podendo apresentar elevados índices de mortalidade e deformidades (GARCIA *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2004).

1.5.1 Inibidores de α -amilases

As α -amilases são enzimas monoméricas que constituem uma família de endoamilases e catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos. Por serem essenciais para o crescimento e desenvolvimento de muitos insetos, especialmente daqueles que atacam sementes ricas em amido, muitos estudos foram feitos no intuito de detectar proteínas com função de inibir α -amilases de insetos (GROSSI-DE-SA *et al.*, 1997a, b; MELO *et al.*, 1999; FRANCO *et al.*, 2000; BEZERRA *et al.*, 2004).

Inibidores de α -amiliase de trigo (*Triticum aestivum*), cevada (*Hordeum vulgares*), arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*), centeio (*Secale cereale*), feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), feijão-de-corda (*V. unguiculata*), gameleira (*Ficus sp.*), entre outros, foram purificados e caracterizados (GARCIA-OLMEDO *et al.*, 1992; RICHARDSON, 1991; GROSSI-DE-SA *et al.*, 1997a, b; MELO *et al.*, 1999; FRANCO *et al.*, 2000; SCHIMOLER-OROURKE; RICHARDSON; SELITRENNIKOFF, 2001; ALAM *et al.*, 2001; BEZERRA *et al.*, 2004).

Os inibidores protéicos de α -amilase são muito abundantes no endosperma do trigo e representam uma fração substancial das albuminas e globulinas. Os inibidores de α -amilases encontrados neste cereal apresentam diferentes especificidades para α -amilases de insetos. Um dos inibidores de α -amilase do trigo, mais estudado é o inibidor dimérico 0.19, ativo contra α -amilases de *T. molitor*, *S. oryzae*, *Tribolium castaneum* (FENG *et al.*, 1996) e contra as dos bruquídeos *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* e *A. obtectus*. Além do inibidor 0.19, o inibidor 0.53, também dimérico, é ativo contra α -amilase de saliva humana e dos bruquídeos *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* e *A. obtectus*. Estes dois inibidores (0.19 e 0.53) são os únicos fatores de resistência ativos contra as amilases do bruquídeo *A. obtectus* (FRANCO *et al.*, 2000).

Os inibidores de α -amilase de sementes de feijão comum (*P. vulgaris*), denominados α -AI1 e α -AI2, apresentam 78% de identidade entre si (CHRISPEELS; RAIKKEL, 1991; GROSSI DE SÁ, CHRISPEELS, 1997a), diferindo em suas especificidades contra α -amilases de fontes distintas. O inibidor de α -amilase

purificado de feijão comum inibiu, *in vitro*, a atividade catalítica das α -amilases de *T. castaneum* e *T. confusum* com maior eficiência do que as α -amilases de *S. oryzae* e *T. molitor* (PUEYO *et al.*, 1995). α -AI1 inibiu a α -amilase de pâncreas de porco, assim como α -amilases de *C. maculatus* e *C. chinensis* (KASAHARA *et al.*, 1996), *D. virgifera* (TITARENKO; CHRISPEELS, 2000), *Hypothenemus hampei* (VALENCIA *et al.*, 2000), *Cryptolestes pusillus*, *T. castaneum*, *Drosophila melanogaster*, *Monomorium pharaonis* e *Venturia canescens* (KLUH *et al.*, 2005). O α -AI1, inibiu a α -amilase de *C. chinensis*, mas não foi efetivo para α -amilase de *Z. subfasciatus* e *A. obtectus*, enquanto o α -AI2 inibiu somente a α -amilase do *Z. subfasciatus* (ISHIMOTO; CHRISPEEL, 1996; ISHIMOTO *et al.*, 1996; GROSSI-DE-SÁ *et al.*, 1997b; GROSSI DE SÁ; CHRISPEELS, 1997a). Nenhum desses inibidores, presentes em sementes de feijão, teve efeito inibitório contra α -amilase de *A. obtectus* (MELO *et al.*, 1999). Um inibidor de α -amilase purificado de sementes de feijão comum, *P. vulgaris*, chamado PvCAI, inibiu mais de 90% a atividade da α -amilase de *Z. subfasciatus*, similar a α -AI2 (DAYLER *et al.*, 2005). O inibidor de α -amilase de feijão tepari (*P. acutifolius*), chamado α -AI-Pa, inibiu a α -amilase de *C. chinensis* e *Z. subfasciatus*, enquanto que o inibidor de α -amilase de feijão ayocote, (*P. coccineus*), chamado α -AI-Pc, inibiu apenas a α -amilase de *C. chinensis* (ISHIMOTO; CHRISPEEL, 1996).

Alguns trabalhos relatam os efeitos tóxicos de inibidores de α -amilase quando incorporados em dieta artificial ofertada a insetos. A incorporação do inibidor de α -amilase de feijão comum em dieta artificial em níveis de 1%, retardou o tempo de desenvolvimento de larvas de *T. castaneum* e *C. pusillus* e aumentou a taxa de mortalidade de *S. oryzae* (PUEYO *et al.*, 1995). A incorporação de α -AI1 em dieta artificial para *C. chinensis* e *C. maculatus*, em concentração de 0,5%, resultou em 100% de mortalidade para as larvas dos insetos (ISHIMOTO; YAMADA; KAGA, 1999). Drástica redução no peso de larvas de *T. castaneum* e *D. melanogaster* foi obtida após incorporação de α -AI1 em dieta artificial em níveis de 1% (KLUH *et al.*, 2005). Os inibidores de α -amilase de trigo, 0.19 e 0.53, apresentando 95% de similaridade, foram incorporados em sementes artificiais e em concentração de 1% reduziram o peso de larvas de *A. obtectus* em 80%. Em adição, nenhuma larva sobreviveu quando alimentada com dieta contendo o inibidor 0.53 em concentração de 1% (FRANCO *et al.*, 2005). Esses resultados sugerem que tais inibidores

apresentam potencial para serem usados em programas de melhoramento genético (ISHIMOTO *et al.*, 1996; FRANCO *et al.*, 2005).

Os efeitos tóxicos de α -AI1 para muitos bruquídeos resultam de sua interação específica com α -amilases desses insetos, impedindo que essas enzimas executem suas funções no processo digestório. Em contraste, a falta de efeito tóxico desse inibidor para *Z. subfasciatus* tem duas explicações: a primeira, é que α -AI1 não possui capacidade de interagir com a α -amilase de *Z. subfasciatus*, e a segunda explicação, é que *Z. subfasciatus* possui em seu aparato digestório uma proteinase serínica capaz de digerir o inibidor (ISHIMOTO; KITAMURA, 1992; ISHIMOTO; CHRISPEELS, 1996a).

A introdução de genes que codificam inibidores de α -amilase em culturas economicamente importantes foi utilizada para aumentar sua resistência a diferentes insetos. Plantas de ervilha (*Pisum sativum*) transformadas com o gene que codifica o inibidor de α -amilase de *P. vulgaris* (α -AI) tornaram-se resistentes ao ataque de *C. maculatus*, *C. chinensis* e *Bruchus pisorum* (SHADE *et al.*, 1994; SCHROEDER *et al.*, 1995) e a expressão desse mesmo gene em plantas de *P. vulgaris* resultou em maior resistência da planta ao ataque de *C. chinensis*, *C. maculatus* e *C. analis* (ISHIMOTO *et al.*, 1996). O gene que codifica o inibidor de trigo quando introduzido em plantas de tabaco (*N. tabacum*) conferiu resistência a *Agrotis ipsilon* e *Spodoptera ssp* (GATEHOUSE; GATEHOUSE, 1998).

1.5.2 Inibidores de proteinases

Inibidores de proteinases foram isolados e purificados de diferentes espécies de monocotiledôneas e dicotiledôneas. Entre as monocotiledôneas, as investigações foram dirigidas particularmente para os vegetais da família das Gramíneas, atualmente denominada família Poaceae, tendo como principais representantes, arroz, cevada, milho, trigo, centeio e sorgo. Entre as dicotiledôneas, a família das Solanáceas, representada pelo tomate, batata e tabaco, e a família das leguminosas (ou família Fabaceae), representada pelos feijões, soja e ervilha, têm recebido especial atenção. No entanto, outras famílias foram estudadas em menor escala como, por exemplo, as famílias Moraceae, Araceae e Caricaceae (BRZIN; KIDRIC, 1995; SCHULER *et al.*, 1998; RICHARDSON, 1991). Em diferentes tecidos e órgãos vegetais foram detectados, isolados e purificados inibidores de proteinases como em polpa de frutas (ARAÚJO *et al.*, 2004), raízes, caules, folhas, frutos e, particularmente, em tubérculos e sementes (BRZIN; KIDRIC, 1995). Estes últimos são ricas fontes de inibidores, contendo de 1 a 10% do total de proteínas das plantas (USSUF; LAXMI; MITRA, 2001). Os níveis desses inibidores nos vegetais são variáveis e dependem do estágio de maturação, da sua localização nos tecidos, do tempo de colheita e de armazenamento, como, também, da variedade da planta, podendo coexistir diferentes classes de inibidores em um único tecido ou órgão (RYAN, 1990; RICHARDSON, 1991; BRZIN; KIDRIC, 1995).

1.5.2.1 - Classificação de inibidores de proteinases de plantas

Inibidores de proteinases de plantas são primeiramente categorizados de acordo com a classe mecanística de enzimas que eles inibem. Dessa forma, quatro classes de inibidores de proteinases foram estabelecidas: inibidores de proteinases serínicas, cisteínicas, aspárticas e de metalo-proteinases, sendo que os inibidores de proteinases serínicas são os mais estudados (RYAN, 1990; RICHARDSON, 1991). Muitos inibidores de proteinases cisteínicas também foram caracterizados (BODE; HUBER, 1992, 2000; MARGIS; REIS; VILLET, 1998), enquanto que os inibidores de metalo-proteinases e de proteinases aspárticas de plantas são os estudados em menor escala. Esses inibidores são agrupados em famílias (TABELA 3), sendo a classe dos inibidores de proteinases serínicas composta por sete subfamílias e as demais compreendem apenas uma família (BODE; HUBER, 1992; 2000; KOIWA *et al.*, 1997; MARGIS; REIS; VILLET, 1998). Os inibidores de proteinases serínicas são agrupados com base na similaridade de seqüência primária, massa molecular, número de resíduos de cisteína e pontes dissulfetos (RICHARDSON, 1991; KOIWA *et al.*, 1997).

Alguns inibidores exibem especificidade de inibição para uma única classe mecanística de enzima (CAMPOS *et al.*, 2004; DESHIMARU *et al.*, 2003; LUCKETT *et al.*, 1999; RICHARDSON, 1991), enquanto outros são efetivos inibidores de enzimas pertencentes a diferentes classes mecanísticas, podendo inibir proteinases serínicas e amilases de insetos e plantas, ou ainda, proteinases serínicas e cisteínicas. Devido a essa característica, eles são chamados de inibidores bifuncionais (TABELA 4) (GOMES *et al.*, 2005b; MACEDO *et al.*, 2004; RODENBURG *et al.*, 1995).

TABELA 3 - Família de inibidores de proteinases de plantas

Proteinases	Classes de inibidores	Famílias de inibidores
Serínicas	Inibidores de proteinases serínicas	Bowman-Birk Kunitz Batata I Batata II Superfamília de Cereais Taumatina Ragi I-2/milho
Cisteínicas	Inibidores de proteinases cisteínicas	Cistatinas de planta (Fitocistatinas)
Aspárticas	Inibidores de proteinases aspárticas	Inibidores de proteinases aspárticas
Metallo-proteinases	Inibidores de metallo-proteinases	Inibidores de carboxipeptidases A e B

TABELA 4 - Inibidores bifuncionais

Fonte	Inibidor	Atividade inibitória	Referencias
Cevada	BASI	α -amilase de inseto e planta, e subtilisina	ABE; SIDENIUS; SVENSSON, 1993
Arroz	RASI	α -amilase de inseto e planta, e subtilisina	YAMAGATA <i>et al.</i> , 1998
Trigo	WASI	α -amilase de planta e subtilisina	ZEMKE <i>et al.</i> , 1991
Milho	Zeamatina	α -amilase de inseto e tripsina	SCHIMOLER-OROURKE; RICHARDSON; SELITRENNIKOFF, 2001
Feijão	PvCAI	α -amilase de inseto e quitinase	DAYLER <i>et al.</i> , 2005
Milheto	RBI	α -amilase de inseto e tripsina	STROBL <i>et al.</i> , 1998
Adlai	LCAI	α -amilase de inseto e quitinase	ARY; RICHARDSON; SHEWRY, 1989
Crotalária	CpaTI	tripsina, quimotripsina, elastase e papaína	GOMES <i>et al.</i> , 2005a
Carolina	ApTI	tripsina, quimotripsina e papaína	MACEDO <i>et al.</i> , 2004
Abacaxi	BBI	tripsina, quimotripsina, catepsina L, papaína, bromelaína e ficina.	LENARCIC <i>et al.</i> , 1993; PERLSTEIN, KEZDY, 1973.

BASI, inibidor bifuncional de α -amilase e subtilisina de cevada (*Hordeum vulgares*); RASI, inibidor bifuncional de α -amilase e subtilisina de arroz (*Oryza sativa*); WASI, inibidor bifuncional de α -amilase e subtilisina de trigo (*Triticum aestivum*); PvCAI, inibidor de α -amilase e atividade quitinasica defeijão comum (*Phaseolus vulgaris*); RBI, inibidor bifuncional de α -amilase e tripsina de Capim pé-de-galinha (*Eleusine coracana*); LCAI, inibidor de α -amilase e atividade quitinasica de adlai (*Coix Lachryma-jobi*); CpaTI, inibidor de tripsina de crotalária (*Crotalaria pallida*); ApTI, inibidor de tripsina de carolina (*Adenanthera pavonina*); BBI, inibidor de bromelaina de abacaxi (*Ananas comosus*).

1.6 Inibidores de proteinases cisteínicas

Estudos recentes, baseados na análise de seqüência de aminoácidos, suportam a existência de três famílias distintas de inibidores de proteinases cisteínicas. A família de inibidores de bromelaína isolados de abacaxi, que mostra similaridade estrutural com inibidores de proteinases serínicas da família Bowman-Birk (LENARCIC *et al.*, 1993; HATANO *et al.*, 1995, 1996; HATANO, TANOKURA, TAKAHASHI, 1998), a família de inibidores de proteinases cisteínicas de batata, que mostram similaridade com inibidores de proteinases serínicas da família Kunitz (KRIZAJ *et al.*, 1993; VALUEVA *et al.*, 1998; GRUDEN *et al.*, 1997), e a terceira família, a família fitocistatina, também chamada cistatina de planta (MARGIS, REIS, VILLET, 1998).

1.6.1 Família de inibidores de bromelaína

Essa família de inibidores é composta de sete pequenas proteínas ricas em resíduos de cisteína, apresentam massa molecular entre 5,6 e 5,9 kDa, são constituídas de 52 resíduos de aminoácidos, distribuídos em duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfetos inter e intramoleculares (PERLSTEIN; KEZDY, 1973; REDDY *et al.*, 1975). Embora apresentem forte atividade inibitória sobre proteinases cisteínicas como bromelaína, catepsina L, papaína e ficina, eles também podem inibir, em menor extensão, as proteinases serínicas semelhantes à tripsina e quimotripsina (LENARCIC *et al.*, 1993; HATANO *et al.*, 1995, 1996; HATANO; TANOKURA; TAKAHASHI, 1998; PERLSTEIN; KEZDY, 1973; REDDY *et al.*, 1975). No entanto, ainda não se tem relato de seus efeitos sobre a atividade de enzimas digestórias de insetos e/ou patógenos.

1.6.2 Família de inibidores de proteinases cisteínicas da família Kunitz

Inibidores de proteinases cisteínicas da família Kunitz foram isolados de tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*). Eles apresentam massa molecular de 22 a 25 kDa, são constituídos de uma cadeia polipeptídica consistindo de, aproximadamente, 180 resíduos de aminoácidos, onde estão presentes quatro resíduos de cisteína, formando duas pontes dissulfetos. A análise da seqüência de aminoácidos dessas moléculas revelou forte identidade com inibidores de proteinases serínicas da família Kunitz (GRUDEN *et al.*, 1997; KRIZAJ *et al.*, 1993; VALUEVA *et al.*, 1998). Em oposição, um inibidor de proteinase cisteínica da família Kunitz, isolado de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora*), com massa molecular de 19 kDa, mostrou forte inibição sobre a atividade proteolítica da papaína, com valor de K_i de $0,59 \times 10^{-9}$ M, e fraca inibição sobre a tripsina e quimotripsina (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Estudos recentes mostraram que um inibidor de proteinase serínica da família Kunitz, isolado de semente de Carolina brasileira (*Adenantha pavonina*), denominado ApTI, também apresentou atividade inibitória sobre a atividade proteolítica da papaína, além de inibir tripsina e quimotripsina (MACEDO *et al.*, 2004). Outro inibidor da família Kunitz, isolado de sementes de crotalaria (*Crotalaria pallida*), denominado CpaTI, também suprimiu a atividade proteolítica da papaína, além de inibir tripsina e quimotripsina (GOMES *et al.*, 2005a).

O efeito inibitório dessa família de proteínas sobre enzimas digestórias de insetos foi relatado (OLIVEIRA *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2005^a; MACEDO *et al.*, 2004; FABRICK *et al.*, 2002). O inibidor de proteinase cisteínica isolado de algaroba (*P. juliflora*) apresentou forte inibição sobre a atividade proteolítica de enzimas digestórias de *C. maculatus* e *A. obtectus*, inibindo-as em mais de 70% (OLIVEIRA *et al.*, 2002). Um inibidor isolado de batata (*S. tuberosum*), chamado PCPI 10', mostrou-se efetivo, *in vitro*, para *D. undecimpunctata*. A incorporação de PCPI 10' em sistema de dieta artificial causou 50% de mortalidade e redução de 86% na massa das larvas de *D. undecimpunctata* (FABRICK *et al.*, 2002).

1.6.3 Inibidores da família fitocistatinas

Inibidores de proteinases cisteínicas de plantas são comumente denominados de cistatinas vegetais ou fitocistatinas. Eles foram purificados de monocotiledôneas e dicotiledôneas. Entre as monocotiledôneas, as investigações foram dirigidas, particularmente, para os vegetais da família das gramíneas como sorgo (*Sorghum bicolor*), arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*), adlai (*Coix Lachryma-jobi*) e cevada (*Hordeum vulgare*) (ABE; KONDO; ARAI, 1987; ABE *et al.*, 1992, 1994; LI *et al.*, 1996; GRADDOUR *et al.*, 2001; YOZA *et al.*, 2002). As espécies dicotiledôneas têm recebido especial atenção, particularmente, as famílias das leguminosas como os feijões (*Phaseolus lunatus*; *V. unguiculata*) e soja (*Glycine max*) (FERNANDES *et al.*, 1993; BOTELLO *et al.*, 1996; MISAKA *et al.*, 1996; BRZIN *et al.*, 1998; LAWRENCE; NIELSEN, 2001; SANTINO *et al.*, 1998) e solanáceas como tomate (*Lycopersicon esculento*) e batata (*S. tuberosum*) (WALDRON *et al.*, 1993; VALUEVA *et al.*, 1998; JACINTO *et al.*, 1998; WU; HAARD, 2000).

As fitocistatinas são constituídas por uma cadeia polipeptídica desprovida de pontes dissulfetos. Em geral, são moléculas pequenas que apresentam massa molecular variando de 7,5 kDa, para uma fitocistatina purificada de sementes de abóbora (LEVLEVA *et al.*, 1997), até 26 kDa, para o inibidor purificado de sementes de soja, (*G. max*) (MISAKA *et al.*, 1996) (TABELA 5). No entanto, alguns representantes dessa família apresentam massa molecular de, aproximadamente, 85 kDa, como as fitocistatinas purificadas de tubérculo de batata (*S. tuberosum*) (WALDRON *et al.*, 1993), de folhas de tomate (*L. esculentum*), com massa molecular similar (JACINTO *et al.*, 1998; WU, HAARD, 2000; SIQUEIRA-JUNIOR *et al.*, 2002), e de sementes de girassol (*Helianthus annuus*), com massa molecular de 32 kDa (KOUZUMA *et al.*, 2000).

TABELA 5 - Distribuição botânica e propriedades de algumas fitocistatinas

Fonte	Família	Abreviações	MM (kDa)	AA	pi	C/M	Especificidade	Referencias
<i>Helianthus annuus</i>	A	SCA	9	83	5,6	C	P, F, CH, CB, CL	KOUZUMA <i>et al.</i> , 1996
<i>Helianthus annuus</i>	A	SCB	11	100	9,5	C	P, F, CH, CB, CL	KOUZUMA <i>et al.</i> , 1996
<i>Helianthus annuus</i>	A	SCM	32	282		M	P	KOUZUMA <i>et al.</i> , 2000
<i>Persea americana</i>	L		11,3	100		C	P	KIMURA <i>et al.</i> , 1995
<i>Daucus carota</i>	Ap	EIP18	18	133		C	P	OJIMA <i>et al.</i> , 1997
<i>Oryza sativa</i>	G	OC-I	11,8	102	5,3	C	P, CH, CB, CL	ABE <i>et al.</i> , 1987
<i>Oryza sativa</i>	G	OC-II	11,9	107		C	P, CH, CB, CL	KONDO <i>et al.</i> , 1990
<i>Vigna unguiculata</i>	Le	Vu	10,7	97		C	P	FERNANDES <i>et al.</i> , 1993
<i>Phaseolus lunatus</i>	Le	FSCPI	14		5,5	C	P, CB, CH, CL	BRZIN <i>et al.</i> , 1998
<i>Solanum tuberosum</i>	S	PMC	87	757		M	P	WALDRON <i>et al.</i> , 1993
<i>Glycine max</i>	Le		26	245		C	P	MISAKA <i>et al.</i> , 1996
<i>Glycine max</i>	Le	L1				C	P	ZHAO <i>et al.</i> , 1996
<i>Glycine max</i>	Le	R1	12	100		C	P	ZHAO <i>et al.</i> , 1996
<i>Glycine max</i>	Le	N2	11	92		C	P	ZHAO <i>et al.</i> , 1996
<i>Zea mays</i>	G	CC-I	18	135		C	P, CB, CH, CL	ABE <i>et al.</i> , 1992; 1994
<i>Zea mays</i>	G	CI-4	9,2	85	5,2	C	P, F, Qp, CB, CH	ABE; WHITAKER, 1988; ABE; ARAI, 1991.
<i>Castanea sativa</i>	F	CsC	11,2	102		C	P, F, Qp, CB, T	PERNAS <i>et al.</i> , 1998
<i>Lycopersicon esculento</i>	S			87		M	P	JACINTO <i>et al.</i> , 1998
<i>Malus domestica</i>	R		11,3			C	P, F, B	RYAN; LAING; MCMANUS, 1998
<i>Carica papaya</i>	Cp		11,3	99	5,1	C	P, Qp, Car, PIV	SONG <i>et al.</i> , 1995
<i>Curcubita maxima</i>	Cu		7,5		6,0	C	P, F	LEVLEVA <i>et al.</i> , 1997
<i>Pennisetum glaucum</i>	G		24		9,8	C	P	JOSHI <i>et al.</i> , 1998
<i>Chelidonium majus</i>	Pa	celidocistatina	10	90	9,3	C	P, CL, CH	ROGELJ <i>et al.</i> , 1998
<i>Hordeum vulgare</i>	Le					C	P, F, Qp	GADDOUR <i>et al.</i> , 2001

MM, massa molecular; AA, número de aminoácidos; Pi, ponto isoelétrico; C, fitocistatina com um domínio; M, multicistatina; A, Asteraceae; Ap, Apiaceae; G, Gramineae (Poaceae); L, Lauraceae; Le, Leguminosae (Fabaceae); S, Solanaceae; F, Fagaceae; Ca, Caryophyllaceae; Cp, Caricaceae; Cu, Curcubitaceae; Pa, Papaveraceae; R, Rosaceae; P, papaína; CB, Catepsina B; CH, Catepsina H; CL, Catepsina L; Qp, Quimopapaína; F, Ficina; Car, Caricaína; PIV, Protease de mamão IV; T, Tripsina.

A característica estrutural das fitocistatinas é a presença de três regiões (FIGURA 7) de interação bastante conservadas, com suas proteinases alvo. Um motivo central constituído pelos resíduos de glutamina-xaa-valina-xaa-glicina. Um dipeptídeo constituído, geralmente, por um resíduo de prolina e um de triptofano localizado próximo à extremidade C-terminal, que constituem as duas regiões primárias de interação, ambas localizadas em um dobramento ou alça em forma de grampo (“*hairpin loops*”), e a terceira região de interação, representada por um resíduo de glicina localizado próximo da extremidade N-terminal, conhecida como região flexível (STUBBS *et al.*, 1990, KONDO *et al.*, 1990, MARGIS; REIS; VILLET, 1998). Baseada na presença dessas três regiões de interação e massa molecular desses inibidores, as fitocistatinas foram agrupadas em duas classes: uma delas compreendendo as fitocistatinas de baixa massa molecular, com um único domínio de cistatina, assim classificadas, quando na estrutura primária, é observada a existência única dessas três regiões de interação (FERNANDES *et al.*, 1993, ABE; KONDO; ARAI, 1987; ABE *et al.*, 1992, PERNAS *et al.*, 1998); outra compreendendo as fitocistatinas de alta massa molecular, com múltiplos domínios de cistatina, isto é, com as três regiões de interação ocorrendo repetidas vezes na estrutura primária do inibidor (WLADRON *et al.*, 1993, BOLTER, 1993, JACINTO *et al.*, 1998, WU; HAAD, 2000, KOUZUMA *et al.*, 2000; DIOP *et al.*, 2004), sendo que, neste último caso, elas são chamadas de multicistatinas. As multicistatinas de tubérculo de batata e folhas de tomate possuem oito domínios que podem interagir, simultaneamente, com oito proteinases cisteínicas (WLADRON *et al.*, 1993. JACINTO *et al.*, 1998, WU; HAAD, 2000), porém, a multicistatina de girassol apresenta três domínios (KOUZUMA *et al.*, 2000) e a de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) dois domínios de cistatina (DIOP *et al.*, 2004).

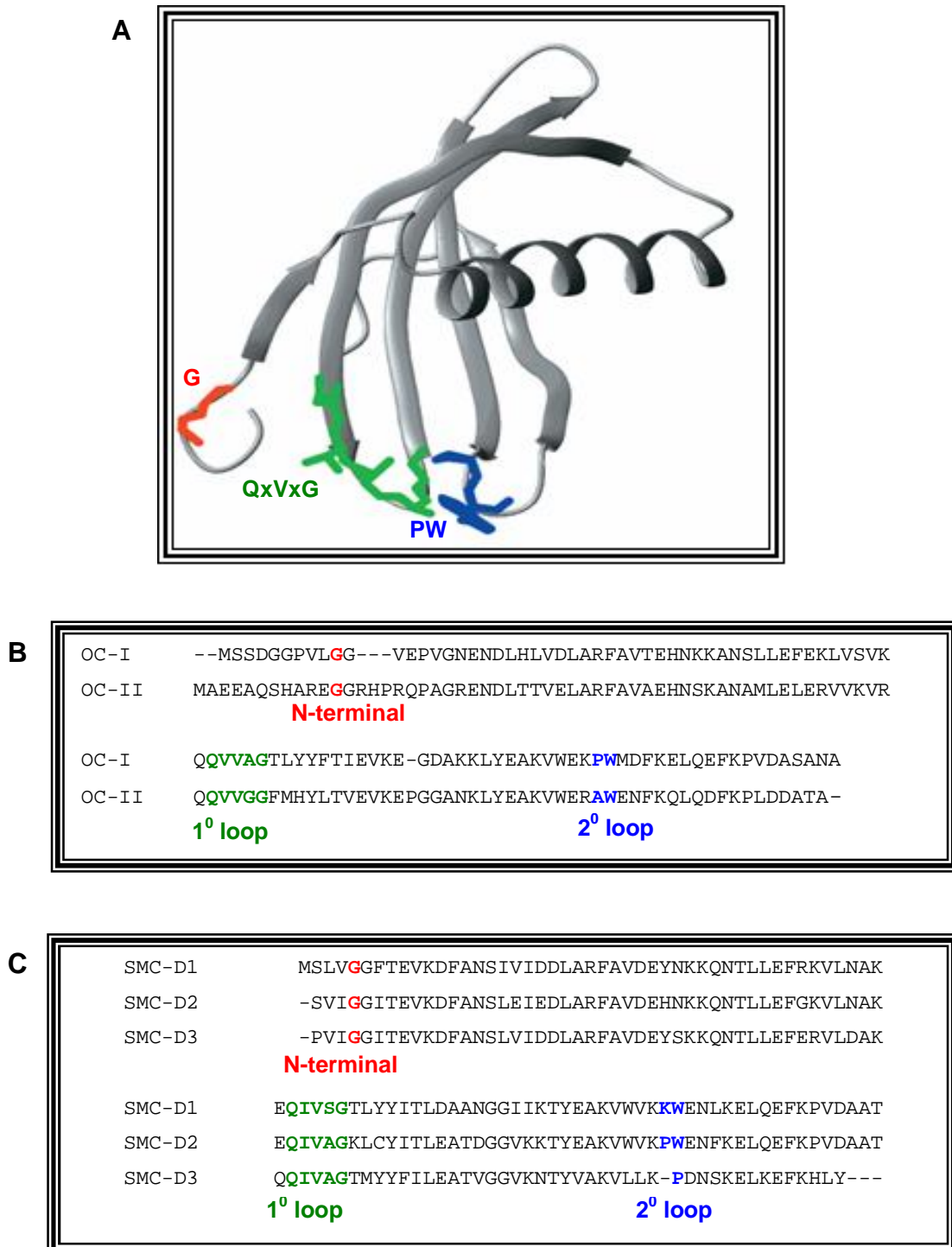


FIGURA 7: Estrutura tridimensional de fitocistatina de arroz, *Oryza sativa* (orizacistatina I, OC-I) resolvida por RMN (resonância magnética nuclear) (A), alinhamento das fitocistatinas de arroz (OC-I e OC-II) com um único domínio (B) e alinhamento dos três domínios (D1-D3) da multicistatina de girassol, *Helianthus annuus* (C).

Fontes:

NAGATA *et al.*, 2000 (A e B)

KOUZUMA *et al.*, 2000 (C).

Muitos estudos mostraram os efeitos inibitórios *in vitro* e *in vivo* das fitocistatinas sobre proteinases cisteínicas presentes no intestino de muitos insetos da ordem coleópteras da família bruquídea. A fitocistatina de milho (*Z. mays*) expressa em plantas de arroz transgênico, inibiu em mais de 50% as proteinases cisteínicas presentes no homogenato intestinal de *S. zeamidis* (IRIE *et al.*, 1996). As atividades de três fitocistatinas de soja (*G. max*), chamadas L1, N2 e R1, exibiram diferentes especificidades para proteinases cisteínicas presentes no homogenato intestinal de larvas de *D. virgifera* e *L. decemlineata*. N2 e R1 inibiram, substancialmente, proteinases cisteínicas de *D. virgifera*, em, aproximadamente, 80%, enquanto que L1 foi efetiva em 30%. N2 e R1 suprimiram a atividade das proteinases digestórias de *L. decemlineata* em 20%, enquanto que L1 inibiu menos de 5% essa atividade (ZHAO *et al.*, 1996). A inibição da atividade digestória de larvas de *Tribolium castaneum* pela fitocistatina de castanheira (*Castanea sativa*), denominada CsC, foi de 61%. No entanto, essa fitocistatina não suprimiu a atividade digestória de larvas de *L. decemlineata* (PERNAS *et al.*, 1998). A cistatina de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) suprimiu a atividade de proteinases digestórias de *Z. subfasciatus* e *A. obtectus* em mais de 90% (AGUIAR *et al.*, 2006). A cistatina de cevada (*H. vulgares*) inibiu a atividade proteolítica de *L. decemlineata* e *Podius maculiventris* em 51 e 80%, respectivamente (ALVAREZ-ALFAGEME *et al.*, 2007).

A multicistatina purificada do tubérculo de batata (*S. tuberosum*), quando incorporada em dieta artificial para larvas de *D. undecimpunctata* e *D. virgifera*, reduziu em 50 e 70%, respectivamente, o crescimento larval desses insetos (ORR; STRICKLAND; WALSH, 1994). A fitocistatina de soja (*G. max*), denominada ScN, retardou o crescimento e aumentou a mortalidade de larvas de *C. maculatus* (KOIWA *et al.*, 2000). A fitocistatina purificada de arroz (*O. sativa*) causou redução no ganho de peso de larvas de *D. undecimpunctata* e mais de 50% de mortalidade (EDMOND *et al.*, 1996). A cistatina de feijão-de-corda (*V. unguiculata*), quando incorporada em um sistema de sementes artificiais a 0,025%, causou redução de peso das larvas, e cerca de 79 e 67% de mortalidade para *A. obtectus* e *Z. subfasciatus*, respectivamente (AGUIAR *et al.*, 2006).

A fitocistatina purificada de sementes de arroz (*O. sativa*), chamada orizacistatina-I ou OC-I, é a fitocistatina mais estudada. Essa proteína é produzida, naturalmente, em sementes de arroz em níveis de 0,001-0,002% de proteínas solúveis totais, que pode ser insuficiente para a proteção efetiva da planta (KONDO

et al., 1990). Entretanto, em plantas transgênicas, o nível de expressão pode atingir 0,6% de proteínas solúveis totais (MASOUD *et al.*, 1993; LECARDONNEL *et al.*, 1999; GIRARD *et al.*, 1998a), resultando em maior resistência dessas plantas contra o ataque de insetos. Plantas de canola (*Brassica napus*), transformadas com OC-I foram mais resistentes ao ataque de *Baris coerulencens* (BONADE-BOTTINO *et al.*, 1999), *P. cochelearie* (GIRARD *et al.*, 1998a), *M. persicae* (RAHBE *et al.*, 2003) e *Psylliodes chrysocephala* (GIRARD *et al.*, 1998b). Plantas de álamo (*Populus deltóides*) expressando o gene que codifica OC-I foram mais resistentes ao ataque de *Chrysomela tremulae* (LEPLE *et al.*, 1995) e plantas de batata (*S. tuberosum*) foram mais resistentes a *L. decemlineata* (LECARDONNEL *et al.*, 1999; CLOUTIER *et al.*, 2000).

1.7 Inibidor de proteinases serínicas

Apesar da grande variedade de família de inibidores de proteinases serínicas, os mais estudados pertencem às famílias Kunitz e Bowman-Birk (RITONJA *et al.*, 1990; BAUDYS *et al.*, 1991, USSUF; LAXMI; MITRA, 2001; KOIWA *et al.*, 1997, LAWRENCE; KOUNDAL, 2002). Os estudos são principalmente, direcionados para aqueles encontrados em sementes das subfamílias das leguminosas (NORIOKA *et al.*, 1988). Norioka e colaboradores sugeriram a existência de uma relação entre inibidores de proteinases serínicas de sementes de leguminosas e a evolução dessas plantas. Nesse estudo, foi investigado a presença de inibidores de proteinases serínicas da família Bowman-Birk e Kunitz em sementes de 34 espécies de leguminosas. Em sementes das subfamílias de leguminosas mais primitivas (Caesalpinoideae e Mimosoideae) foram encontrados principalmente inibidores da família Kunitz, no entanto, na subfamília Papilionoideae que é mais recente evolutivamente, foram encontrados apenas inibidores da família Bowman-Birk (NORIOKA *et al.*, 1988).

1.7.1 Inibidores da família Bowman-Birk

Inibidores de proteinases da família Bowman-Birk foram purificados de sementes de girassol (*H. annuus*) (LUCKETT *et al.*, 1999), de alho (*Allium cepa*) (DESHIMARU *et al.* 2003), em muitas gramíneas como arroz (*O. sativa*), milho (*Z. mays*), trigo (*T. aestivum*), cevada (*H. vulgare*), adlai (*Coix lacryma-jobi*), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (MELLO; TANAKA; SILVA-FILHO, 2003), em sementes de amburana (*Torresea acreana* e *T. cearensis*) (TANAKA *et al.*, 1996), feijão tepari (*P. acutifolius*) (CAMPOS *et al.*, 2004), mucunã (*Dioclea glabra*) (BUENO *et al.*, 1999), lentilha (*Lens culinaris*) (WEDER; HINKERS, 2004), feijão de porco (*Canavalia gladiata*) (PARK *et al.*, 2000), feijão camaratu (*Cratylia mollis*) (PAIVA *et al.*, 2006), ervilha (*Pisum sativum*), amendoim (*Arachis hypogaea*) e soja (*G. max*) (MELLO; TANAKA; SILVA-FILHO, 2003). O primeiro inibidor pertencente à família Bowman-Birk (FIGURA 8), que deu origem a essa família, foi purificado de

sementes de soja que consistia de 71 resíduos de aminoácidos distribuídos em uma cadeia polipeptídica com dois sítios reativos, um para a tripsina e o outro para quimotripsina (ODANI; IKENAKA, 1973a, b).

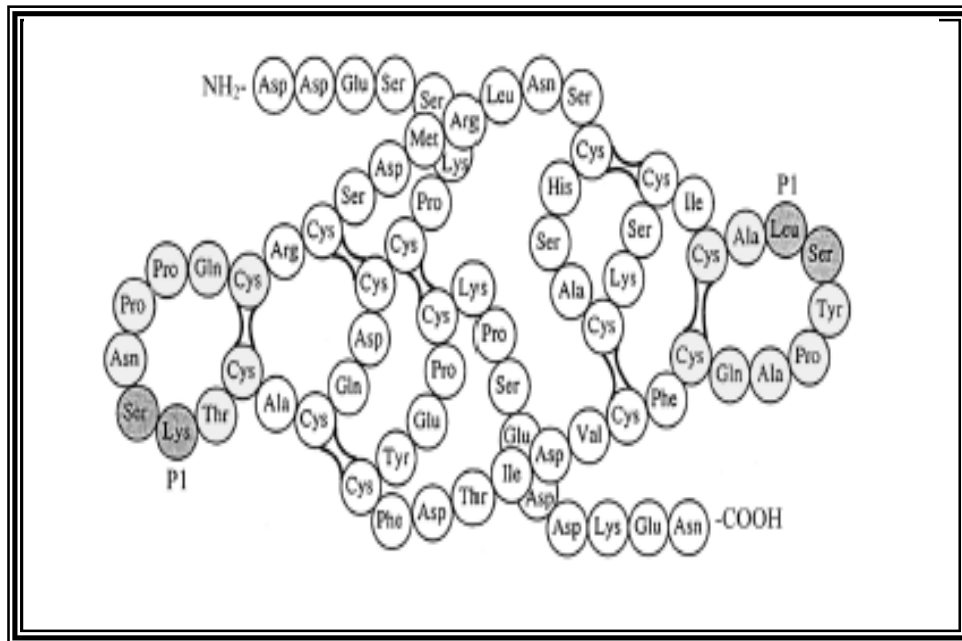


FIGURA 8: Estrutura primária de inibidor de soja (*Glycine max*) da família Bowman-Birk mostrando sete pontes dissulfetos e dois sítios reativos (P1), um para tripsina (Lisina16-Serina17) e outro para quimotripsina (Leucina44-Serina45).

Fonte: ODANI; IKENAKA, 1973b.

QI e colaboradores agruparam os inibidores da família Bowman-Birk de monocotiledôneas e dicotiledôneas em três classes com base na massa molecular, número de sítios reativos, resíduos de cisteína (altamente conservados em todos os membros dessa família) e pontes dissulfetos presentes na molécula. Em monocotiledoneas, os inibidores Bowman-Birk são divididos em duas classes: a primeira composta por inibidores de, aproximadamente, 8 kDa e um único sítio reativo (“*single-headed*”), possuindo 10 resíduos de cisteína envolvidos em 5 pontes dissulfetos; e a segunda, constituída por inibidores com cerca de 16 kDa, compostos por cerca de 180 resíduos de aminoácidos, com dois sítios reativos. Devido a esse fato, eles foram denominados de inibidores de dupla cabeça (“*doublé-headed*”),

possuindo 20 resíduos de cisteína envolvidos em 10 pontes dissulfetos. Inibidores de 16 kDa são compostos por dois domínios, cada um de 8 kDa, com elevada identidade, semelhante aos inibidores de 8 kDa. A presença desses dois domínios de 8 kDa foi explicada devido a eventos de duplicação do gene, originando essa classe de inibidores (QI; SONG; CHI, 2005). Mello, Tanaka e Silva-Filho (2003) relataram a presença de inibidores da família Bowman-Birk constituídos por cerca de 250 resíduos de aminoácidos, distribuídos em três domínios de 8 kDa, apresentando elevada identidade. Nessa mesma investigação, estes autores, analisando a seqüência de aminoácidos de vários inibidores da família Bowman-Birk de monocotiledôneas, constituídos de 8 kDa, observaram que alguns membros dessa família de inibidores encontrados em milho e cana-de-açúcar são glicoproteínas. Em dicotiledôneas, inibidores Bowman-Birk apresentam massa molecular de 8 kDa. Em geral, são compostos por cerca de 104 resíduos de aminoácidos, incluindo 14 resíduos de cisteína envolvidos em 7 pontes dissulfetos, possuindo dois sítios reativos (QI; SONG; CHI, 2005; MELLO; TANAKA; SILVA-FILHO, 2003). A comparação entre diferentes membros desta família mostrou que o primeiro sítio reativo está localizado na região N-terminal e é mais conservado do que o segundo sítio reativo localizado na região C-terminal da molécula (WU; WHITAKER, 1991; PRAKASH *et al.*, 1996). Esses inibidores podem interagir, simultaneamente, e independentemente com duas proteinases serínicas, não necessariamente idênticas, isto é, com duas moléculas de tripsina ou uma molécula de tripsina e uma de quimotripsina (QI; SONG; CHI, 2005; MELLO; TANAKA; SILVA-FILHO, 2003).

Alguns estudos mostraram os efeitos, *in vitro*, dessa família de inibidores sobre proteinases serínicas de insetos. Inibidores da família Bowman-Birk purificados de soja (SBBI) e de feijão-de-corda (CpTI) inibiram atividades digestórias semelhantes à tripsina e quimotripsina de *L. oleracea* (GATEHOUSE *et al.*, 1999), *H. virescens* (JOHNSTON *et al.*, 1995). SBBI também inibiu a atividade de enzimas digestórias semelhantes à tripsina presente no homogenato intestinal de larvas de *A. ipsilon*, *H. zea*, *H. virescens*, e *A. grandis* (PURCELL; GREENPLATE; SAMMONS, 1992), bem como as proteinases serínicas de *P. cochleariae* (GIRARD *et al.*, 1998a), *S. exíqua* (JONGSMA *et al.*, 1995) e *S. littoralis* (LEE, ANSTEE, 1995).

Em processo de transgenia, gene que codifica o inibidor de tripsina de feijão-de-corda (CpTI) foi introduzido em várias plantas economicamente importantes. Em plantas de tabaco (*N. tabacum*), esse gene conferiu resistência a *H. virescens*

(HILDER *et al.*, 1987; BOULTER *et al.*, 1990; GATEHOUSE *et al.*, 1993) e *Spodoptera litura* (SANE *et al.*, 1997). Plantas de morango (*Fragaria x ananassa*) transformadas com esse mesmo gene foram mais resistentes a *Otiorynchus sulcatus* (GRAHAM; McNICOL; GREIG, 1995). A expressão de CpTI em plantas de arroz (*O. sativa*), batata (*S. tuberosum*), algodão (*G. hirsutum*), e nabo (*Brassica rapa*) conferiu resistência a *Sesamia inferens*, *Chilo suppressalis* (GRAHAM; GORDON; McNICOL, 1997, XU *et al.*, 1996), *L. oleracea* (GATEHOUSE *et al.*, 1997, 1999), *Helicoverpa armigera* (LI *et al.*, 1998) e *Pieris rapae* (FANG *et al.*, 1997).

1.7.2 Inibidores da família Kunitz

Os inibidores de proteinases serínicas da família Kunitz foram purificados de vários tecidos e órgãos de plantas incluindo látex do mamão (*Carica papaya*) (ODANI *et al.*, 1996; AZARKAN *et al.*, 2006), folhas de feto de água (*Azolla pinnata*) (MAITY; PATRA, 2003), rizomas tuberosos de várias aráceas (OLIVEIRA, 2001; SUMATHI; PATTABIRAMAN, 1979), tubérculos de solanáceas (*S. tuberosum*) (VALUEVA *et al.*, 1998; VALUEVA; REVINA; MOSOLOV, 1997, 1999), sementes de jaca (*Artocarpus integrifolia*) (BHAT; PATTABIRAMN, 1989), sementes de mostarda parda (*Brassica juncea*) (MANDAL *et al.*, 2002), e, particularmente, de sementes das três subfamílias de leguminosas (RICHARDSON, 1991). Esses inibidores são proteínas com massa molecular que variam de 18 a 26 kDa, distribuídos em, aproximadamente, 180 resíduos de aminoácidos, possuindo baixo conteúdo de resíduos de cisteína envolvidos em pontes dissulfetos (RICHARDSON, 1991; BATISTA *et al.*, 1996), e, em geral, possuindo apenas um sítio reativo. Devido a esse aspecto estrutural, eles são conhecidos como inibidores de uma cabeça (“*single headed*”) (RICHARDSON, 1991). Entretanto, poucos representantes dessa família foram caracterizados como inibidores que possuem dois sítios reativos. O inibidor Kunitz purificado de soja (*G. max*), denominado SKTI, apresentou forte atividade inibitória sobre a tripsina, mas também foi capaz de suprimir, fracamente, a atividade da quimotripsina, sugerindo a presença de dois sítios reativos na estrutura da proteína (BOSTERLING; QUAST, 1981). Valueva, Revina e Mosolov (1999)

investigaram os efeitos das modificações nos resíduos de metionina, arginina e lisina na atividade inibitória do inibidor Kunitz de 21 kDa purificado de tubérculos de batata, denominado PSPI-21. Os resultados indicaram a presença de dois sítios reativos; um para interação com a tripsina e outro para quimotripsina. Os resíduos de arginina e metionina nos sítios reativos desse inibidor foram responsáveis pela interação com tripsina e quimotripsina, respectivamente, o que explicou a capacidade do inibidor formar um triplo complexo, unindo-se simultaneamente a uma molécula de tripsina e uma de quimotripsina. Resultado similar foi observado para o inibidor de quimotripsina da família Kunitz, purificado de sementes de feijão alado, *Psophocarpus tetragonolobus*, denominado WCI, que possui em sua estrutura dois sítios reativos para interação com quimotripsina (DATTA GUPTA *et al.*, 1999; DAS GUPTA; SEN; DATTA GUPTA, 2003).

Esses inibidores podem ser constituídos por uma ou duas cadeias polipeptídicas. Inibidores encontrados nas subfamílias Caesalpinioideae e Papilionoideae, geralmente, têm uma cadeia polipeptídica enquanto que aqueles da subfamília Mimosoideae são constituídos por inibidores com duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfetos, sendo caracterizados como proteínas diméricas (RICHARDSON, 1991; BATISTA *et al.*, 1996). Inibidores com uma cadeia polipeptídica, possuindo cerca de 180 resíduos de aminoácidos, deram origem àqueles com duas cadeias polipeptídicas, após clivagem nos resíduos de aminoácidos da posição 140 ou em sua vizinhança, seguido de redução de pontes dissulfetos, originando, dessa forma, os inibidores com duas cadeias polipeptídicas (RICHARDSON, 1991; BATISTA *et al.*, 1996). A TABELA 6 mostra a distribuição botânica e propriedades de alguns inibidores Kunitz.

A presença de carboidratos não é uma característica comum para inibidores da família Kunitz. Todavia, existem poucos relatos sobre esse aspecto estrutural. Bhat e Pattabiraman (1989) purificaram uma glicoproteína de sementes de jaca (*A. integrifolia*) de 26 kDa, apresentando inibição sobre a atividade catalítica da tripsina e quimotripsina, tendo sido caracterizada como um membro da família Kunitz com base na massa molecular e composição de aminoácidos. A presença de galactose, glicose, manose, frutose, xilose e glicosamina foram identificados como unidades de açúcares constituintes do inibidor. A presença de manose, xilose fucose e outros açúcares foram detectados na estrutura do inibidor Kunitz purificado do látex de mamão (*C. papaya*), denominado PPI (ODANI *et al.*, 1996). A presença de açúcares

também foi detectada como um constituinte da estrutura de outros inibidores Kunitz, incluindo o inibidor purificado de sementes de pata de cava (*Bauhinia rufa*) (SUMIKAWA *et al.*, 2006) e de sementes de jacarandá branco (*Swartzia pickellii*) (CAVALCANTI *et al.*, 2002). Entretanto, o papel desses carboidratos na estrutura de inibidores da família Kunitz não foi esclarecido.

TABELA 6 - Distribuição botânica e propriedades de alguns inibidores da família Kunitz (continua)

Fonte	Família	Abreviações	MM (kDa)	AA	PD	Pi	CP	Especificidade	Referências
<i>Artocarpus integrifolia</i> (*)	M		26				1	T, Q	BHAT; PATTABIRAMAN, 1989
<i>Murraya koenigii</i>	R		27				1	T	SHEE; SHARMA, 2007
<i>Colocasia esculenta</i>	A	CETI-A	25				ND	T, Q	OLIVEIRA, 2001
<i>Alocasia macrorrhiza</i>	A		19,7	184	2			T, Q	ARGALL; BRADBURY; SHAW, 1994
<i>Brassica juncea</i>	B	BjTI	20	178	2			T	MANDAL <i>et al.</i> , 2002
<i>Carica papaya</i> (*)	C	PPI	24	184	2			T, Q	ODANI <i>et al.</i> , 1996
<i>Solanum tuberosum</i>	S	PSPI-21-5.2	21	186	2	5,2	2	T, Q	VALUEVA <i>et al.</i> , 1997, 1998
<i>S. tuberosum</i>	S	PSPI-21-6.3	21	186	2	6,3	2	T, Q	VALUEVA <i>et al.</i> , 1997, 1998
<i>S. tuberosum</i>	S	PSPI-22	22	188			1	T, Q	VALUEVA <i>et al.</i> , 1997, 1998
<i>S. tuberosum</i>	S	PKI-1	19,5			6,9	ND	T, Q	WALSH; TWITCHELL, 1991
<i>S. tuberosum</i>	S	PKI-2	20,5			8,6	ND	T, Q e P	WALSH; TWITCHELL, 1991
<i>Tamarindus indica</i>	L-Ce	TTI	21				ND	T	ARAÚJO <i>et al.</i> , 2005a
<i>Copaifera longsdorffii</i>	L-Ce	TDI-I	24	167	1	7,0	2	T	SILVA <i>et al.</i> , 2001; KRAUCHENCO <i>et al.</i> , 2004
<i>Delonix regia</i>	L-Ce	DrTI	22	185	2		1	T	PANDO <i>et al.</i> , 2001
<i>Swartzia pickelli</i> (*)	L-Ce	SWTI	20	174	1		1	T, Q	CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2002
<i>Peltophorum dubium</i>	L-Ce	PDTI	20	185		5,4	1	Q	MACEDO <i>et al.</i> , 2003
<i>Caesalpinia echinata</i>	L-Ce	CeKI	20				1	T	CRUZ-SILVA <i>et al.</i> , 2004
<i>Cássia obtusifolia</i>	L-Ce	COTI	19,8				1	T	LIAO <i>et al.</i> , 2007
<i>Bauhinia rufa</i> (*)	L-Ce	BrEI	20	144	1	4,6	1	E	SUMIKAWA <i>et al.</i> , 2006
<i>B. rufa</i>	L-Ce	BrTI	18	164	0		1	T	NAKAHATA <i>et al.</i> , 2006
<i>B. bauhinoides</i>	L-Ce	BbKI	20	154	0	6,9	1	T	OLIVA <i>et al.</i> , 2001
<i>B. variegata</i>	L-Ce	BvITI-3	20	176		5,1	1	T	DI CIERO <i>et al.</i> , 1998
<i>B. variegata</i>	L-Ce	BvcTI-3	18,5	167	2	4,8	1	T	DI CIERO <i>et al.</i> , 1998
<i>Schizolobium parahyba</i>	L-Ce	SPCI			2		1	Q, E	TELES <i>et al.</i> , 2004; SOUZA <i>et al.</i> , 2000
<i>Caesalpinia bonduc</i>	L-Ce	CbTI-2	20		2		2	T, Q	BHATTACHARYYA; RUI; BABU, 2007
<i>Enterolobium contortisiliquum</i>	L-MI	EcTI	22	174	2		2	T, Q	BATISTA <i>et al.</i> , 1996
<i>Leucaena leucocephala</i>	L-MI	LITI	20	174	2		2	T, Q	OLIVA <i>et al.</i> , 2000
<i>Dimorphandra mollis</i>	L-MI	DMTI	20				1	T	MACEDO <i>et al.</i> , 2000

TABELA 6 - Distribuição botânica e propriedades de alguns inibidores da família Kunitz (continuação)

Fonte	Família	Abreviações	MM (kDa)	AA	PD	Pi	CP	Especificidade	Referencia
<i>Dimorphandra mollis</i>	L-MI	DMTI-II	23				1	T	MELLO <i>et al.</i> , 2002
<i>Archidendron ellipticum</i>	L-MI	AeTI	20				2	T, Q	BHATTACHARYYA <i>et al.</i> , 2006
<i>Pithecellobium dulce</i>	L-MI	PDTI	19,6			4,9	2	T	DELGADO-VARGAS <i>et al.</i> , 2004
<i>Inga laurina</i>	L-MI	ILTI	20	180	1		1	T	MACEDO <i>et al.</i> , 2007
<i>Acacia confusa</i>	L-MI	ACTI	19,4	175	2		2	T, Q	HUNG; LEE; LIN, 1994
<i>Adenanthera pavonina</i>	L-Mi	ApTI	20	176	2		2	T, Q, P	RICHARDSON <i>et al.</i> , 1986; MACEDO <i>et al.</i> , 2004
<i>Crotalaria paulina</i>	L-P	CPTI	20	177		4,0	1	T	PANDO <i>et al.</i> , 1999
<i>Poecilantha parviflora</i>	L-P	PPTI	16				1	T, Q	GARCIA <i>et al.</i> , 2004
<i>Crotalaria pallida</i>	L-P	CpaTI	32,5				2	T, Q, E e P	GOMES <i>et al.</i> , 2005a
<i>Erythrina variegata</i>	L-P	ETIa	19,2	172	2		1	T, Q	IWANAGA <i>et al.</i> , 2005; KOUZUMA <i>et al.</i> , 2002
<i>Erythrina variegata</i>	L-P	ECI	19,8	179	2		1	Q	KIMURA; KOUZUMA; YAMASAKA, 1993
<i>Glycine max</i>	L-P	SKTI	21	181	2		1	T, Q	KOIDE; IKENAKA, 1973
<i>Psophocarpus tetragonolobus</i>	L-P	WCI	20,2	183	2		1	Q	KORTT, 1980
<i>P. tetragonolobus</i>	L-P	WBTI-2	20	182	2	5,1	1	T	CALDWELL; STRIKE; KORTT, 1990
<i>P. tetragonolobus</i>	L-P	WBTI-2a	20	180	2	5,9	1	T	KORTT <i>et al.</i> , 1991

M, Moracea; R, Rutacea; B, Brassicacea; A, Aracea; C, Caricacea; S, Solanacea; L, leguminosa; L-Ce, leguminosa da subfamília Caesalpinoideae; L-MI, leguminosa da subfamília Mimosoideae; L-P, leguminosa da subfamília Papilionoideae; MM, massa molecular; AA, número de aminoácidos; PD, número de pontes dissulfetos; Pi, ponto isoelétrico; CP, número de cadeias polipeptídicas; T, tripsina; Q, quimotripsina; E, elastase; P, papaína; (*) inibidores glicosilados.

1.7.2.1 Estrutura e mecanismo de inibição de inibidores da família Kunitz

Inibidores da família Kunitz são referidos como proteínas betas. A estrutura tridimensional dessa família de inibidores é composta por 12 folhas betas antiparalelas conectadas por longas alças. A proteína pode ser dividida em três subunidades, cada subunidade consistindo de cerca de 60 resíduos de aminoácidos que são as unidades de repetição (A, B e C), cada unidade de repetição consiste de quatro folhas betas conectadas por longas alças, estruturalmente organizadas como L- β 1-L- β 2-L- β 3-L- β 4, onde L denotam as alças que conectam as folhas betas (FIGURAS 9 e 10). A estabilidade da estrutura tridimensional de muitos inibidores da família Kunitz foi assumida pela presença de inúmeras pontes de hidrogênio em conjunto com as pontes dissulfetos presentes na estrutura do inibidor (SATTAR *et al.*, 2004, KRAUCHENCO *et al.*, 2004, 2003, SONG; SHU, 1998, KHAMRUI *et al.*, 2005).

Na estrutura tridimensional, o sítio reativo desses inibidores está presente em uma alça exposta localizada entre as subunidades A (A β 4) e B (B β 1) (FIGURAS 9 e 10). A localização e a conformação do sítio reativo proporcionam um ambiente favorável que permite interação direta do inibidor com o sítio ativo da enzima (SATTAR *et al.*, 2004, KRAUCHENCO *et al.*, 2004, 2003, SONG; SHU, 1998, KHAMRUI *et al.*, 2005). A composição de aminoácidos do sítio reativo determina a especificidade do inibidor. O resíduo de aminoácido na posição P1 do inibidor (FIGURA 9), que é o resíduo de particular importância na formação do complexo, é particularmente acolhido pela bolsa de especificidade S1 da enzima. Quando P1 do inibidor é ocupado por resíduos de aminoácidos básicos como lisina ou arginina, ele é dito um inibidor de tripsina; quando resíduos de triptofano, fenilalanina, tirosina, leucina ou metionina ocupa essa posição, a proteína é um inibidor de quimotripsina (DATTA GUPTA *et al.*, 1999; DAS GUPTA; SEN; DATTA GUPTA, 2003; SATTAR *et al.*, 2004;).

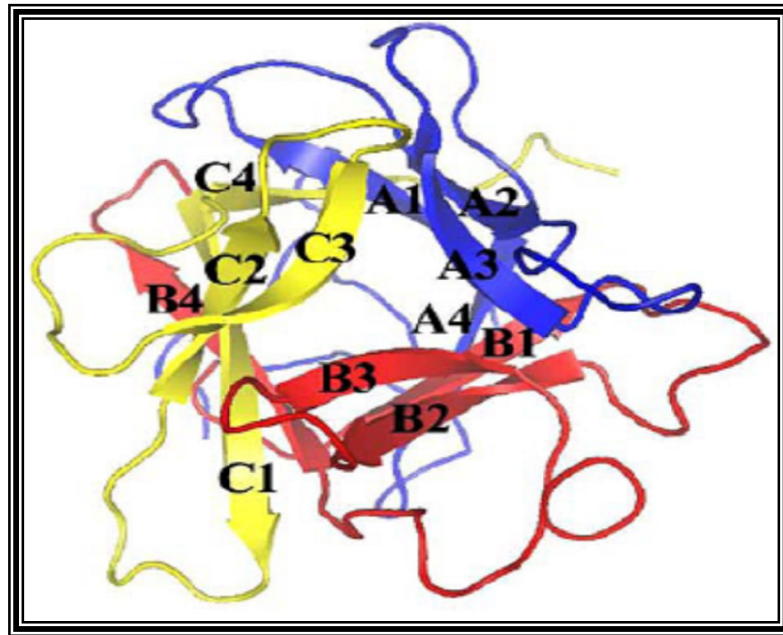


FIGURA 9: Estrutura tridimensional de inibidor de tripsina da família Kunitz de *Delonix regia* (DrTI). A proteína é formada por 12 folhas betas antiparalelas conectadas por longas alças. As três subunidades que se repetem: subdomínio A em azul, B em vermelho e C em amarelo. Cada unidade de repetição (A, B e C) é composta por quatro folhas betas (A1-A4, B1-B4 e C1-C4) conectadas por longas alças.

Fonte: KRAUCHENCO *et al.*, 2003.

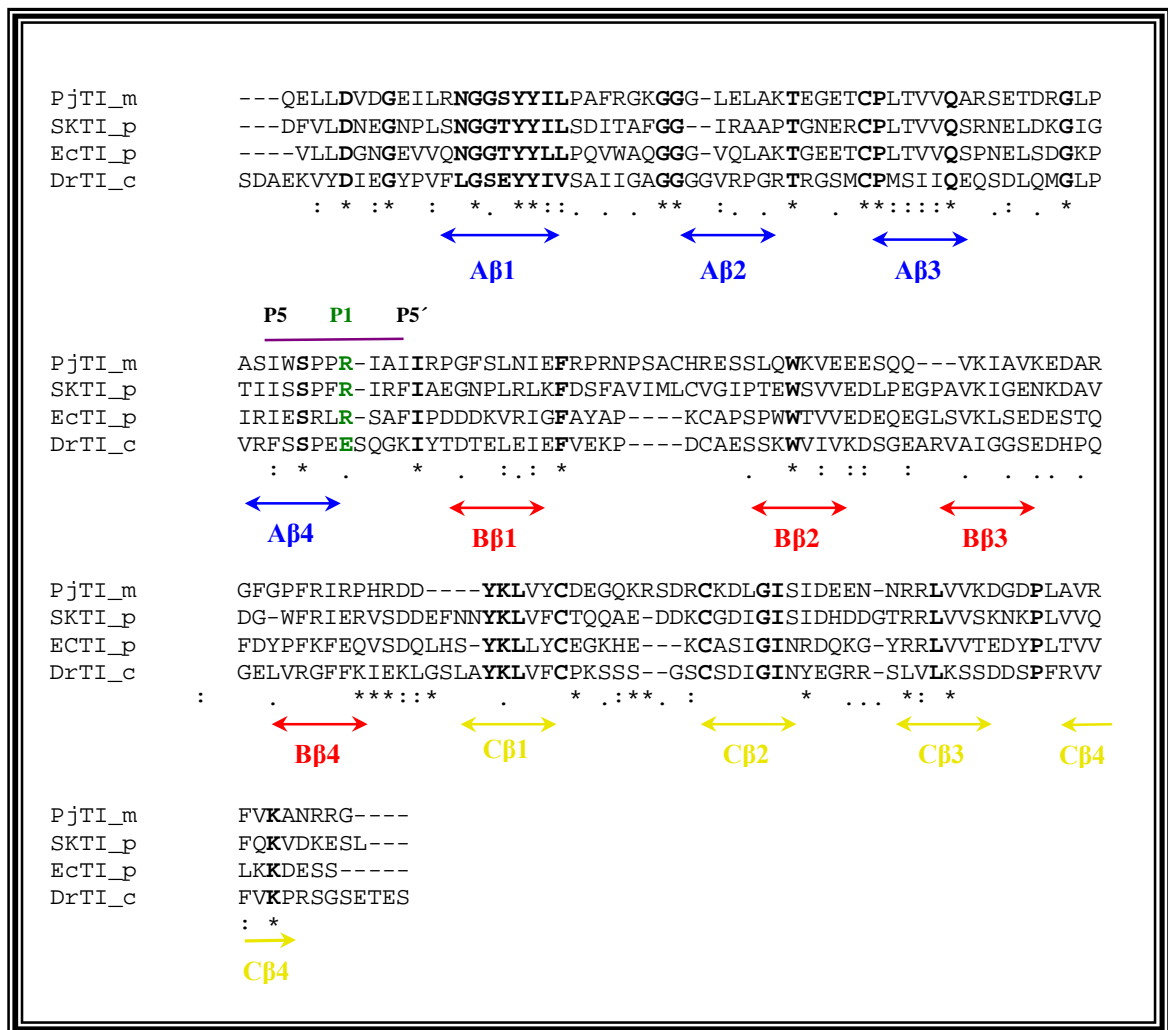


FIGURA 10: Alinhamento de inibidores da família Kunitz: PjTI; inibidor de sementes de algaroba, *P. jufiflora*, SKTI; inibidor de tripsina de soja, *G. max*, ECTI; inibidor de tripsina de *Erithyna craffa*, DrTI; Inibidor de tripsina de *D. regia*, subfamília de leguminosas: m; momosoideae, p; papilionoideae, e c, caesalpinoideae.

A comparação estrutural do sítio reativo de muitos membros dessa família de inibidores mostra a mesma conformação conhecida como conformação canônica. No entanto, em outros membros, essa conformação difere significativamente (FIGURA 11). Elementos da estrutura secundária e pontes dissulfetos podem proteger o sítio reativo de alguns inibidores e, dessa forma, reduzir o grau de afinidade do inibidor pela enzima (SATTAR *et al.*, 2004). Por exemplo, o sítio reativo do inibidor de sementes de flamboiante (*Delonix regia*), denominado DrTI, é distorcido devido à inserção de um resíduo de ácido glutâmico na posição 68 (E68) carregado negativamente. Esse fato pode explicar a fraca atividade inibitória de DrTI sobre a tripsina. DrTI inativa a tripsina com valor de K_i da ordem de 21,9 nM, enquanto que, inibidores apresentando conformação canônica de sítio reativo, como o inibidor de tripsina de soja (SKTI) e o inibidor de *Erythrina caffra* (ECTI), apresentam valores de K_i para a tripsina na ordem de 1nM (KRAUCHENCO *et al.*, 2003, PANDO *et al.*, 2001). Quanto mais próximo da conformação canônica for o sítio reativo do inibidor, mais efetivo será o inibidor (KRAUCHENCO *et al.*, 2003).

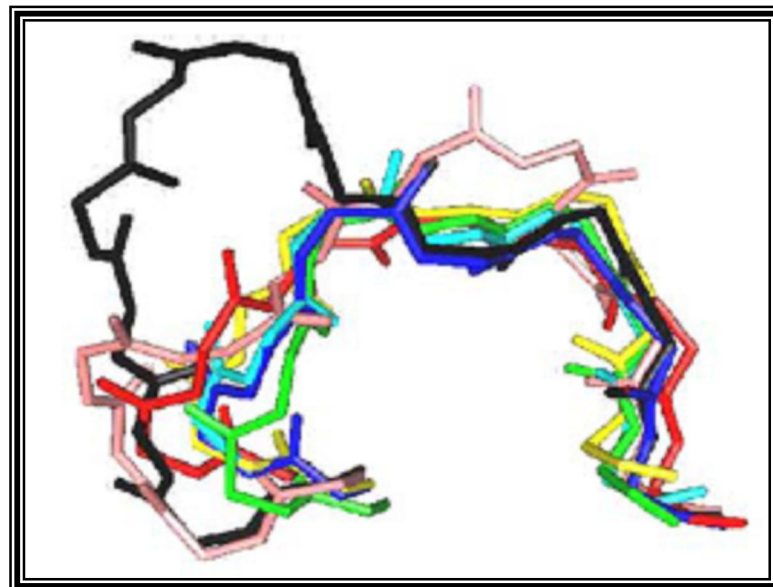


FIGURA 11: Superposição estrutural do sítio reativo (resíduos P4-P4') de inibidores da família Kunitz. Inibidor de *D. regia*, DrTI em vermelho; inibidor de soja (*G. max*, SKTI) em azul escuro; inibidor de *Erythrina caffra*, ECTI, em amarelo; inibidor de quimotripsina de *Psophocarpus tetragonolobus* (WCI) em verde; inibidor de *Copaifera langsdorffii*, CTI, em azul claro; inibidor de amilase e subtilisina, BASI, em salmão; e albumina de *Psophocarpus tetragonolobus*, WBA, em preto.

Fonte: KRAUCHENCO *et al.*, 2003.

A interação direta do resíduo do sítio reativo P1 do inibidor no sítio ativo da enzima caracteriza um mecanismo de inibição competitivo, comum para muitos inibidores de tripsina da família Kunitz (BODE; HUBER, 1992, 2000; FRANCO *et al.*, 2002; MANDAL *et al.*, 2002, BHATTACHARYYA *et al.*, 2006).

Além da participação do sítio reativo desses inibidores na formação do complexo enzima-inibidor, outros resíduos foram considerados críticos. Para inibidores da família Kunitz, o resíduo conservado de asparagina (N13 no inibidor de tripsina de soja, SKTI), localizado na extremidade N-terminal, foi enfatizado como elemento crucial na formação do complexo (ONESTI; BRICK; BLOW, 1991; MEESTER *et al.*, 1998; SONG; SHU, 1998; IWANAGA *et al.*, 2005). Em adição, resíduos de ácido aspártico (D1), fenilalanina (F2) e triptofano (W117), em SKTI, também fazem parte na formação do complexo (SONG; SHU, 1998). Resíduos de Asparagina (N136 e 139) foram encontrados envolvidos no complexo entre tripsina e inibidor de tripsina de *L. leucocephala* (SATTAR *et al.*, 2004). Em estudos de modelagem molecular, foi observado que o resíduo de asparagina (N13) presente na estrutura do inibidor purificado de sementes de algaroba (*P. juliflora*) (FIGURA 12) também participava na interação com a tripsina, além dos resíduos de ácido glutâmico (E2), prolina (P63), arginina (R64), alanina (A66), serina (S73), e ácido aspártico (D171) (FRANCO *et al.*, 2002)



FIGURA 12: Modelo de interação entre o inibidor da família Kunitz de algaroba (*Prosopis juliflora*) e a tripsina.

1.7.2.1 – Efeito de inibidores da família Kunitz sobre insetos

Muitos estudos mostraram os efeitos de inibidores da família Kunitz para muitos insetos que utilizam proteinases serínicas. Dentre esses estudos, Macedo e colaboradores, relataram que DMTI-II purificado de sementes de falso-barbatimão (*Dimorphandra mollis*) causou, aproximadamente, 67% de mortalidade para larvas de *C. maculatus* quando incorporados em um sistema de dieta artificial em níveis de 1%. A dose necessária para DMTI-II causar 50% de mortalidade (LD_{50}) e para reduzir o peso de larvas para 50% (ED_{50}) foi de 0,05 e 0,60%, respectivamente. O mecanismo de ação de DMTI-II sobre *C. maculatus* pode envolver inibição de atividade semelhante à tripsina presente no intestino das larvas e, devido ao fato de que o inibidor apresentou capacidade de interação com coluna de quitina, também foi sugerido que o inibidor poderia ter-se associado com estruturas quitinosas presentes no intestino do inseto (MACEDO *et al.*, 2002). O inibidor de sementes de crotalaria (*C. pallida*), denominado CpaTI, inibiu enzimas digestivas de Coleopteras como *C. maculatus*, *Z. subfasciatus*, *A. argillacea* em 74, 37 e 52%, respectivamente. Enzimas digestivas de Lepidopteras como *S. frugiperda*, *A. grandis* e *P. interpunctella* foram inibidas em 100, 98 e 67%, respectivamente. Experimentos *in vivo* mostraram que, CpaTI, quando incorporado em sistema de dieta artificial necessário para causar 50% de mortalidade (LD_{50}) e 50% de redução no peso (ED_{50}) de larvas de *C. maculatus* foi, respectivamente, 2,1 e 3,2%. (GOMES *et al.*, 2005a). Testes, *in vitro*, mostraram que TTI purificado de sementes de tamarindo (*Tamarindus indica*), suprimiu fortemente a atividade de enzimas digestivas de insetos coleoptera como *C. maculatus* (86,7%) *Z. subfasciatus* (51,6%), *R. dominica* (88,2%), *A. grandis* (29%) e Lepidopteras como *S. frugiperda* (75,5%), *A. argilácea* (53,8%), e *P. interpunctella* (26,7%), e Díptera como *C. capitata* em 52,9%. A concentração de TTI purificado de sementes de *T. indica* em dieta artificial necessário para causar 50% de mortalidade (LD_{50}) e 50% de redução no peso (ED_{50}) de larvas de *C. maculatus* foram 3,6% e 3,2%, respectivamente. Concentração de 4,0% de TTI na dieta causou 53,2% de redução no peso das larvas de *C. capitata* e 34% de mortalidade (ARAÚJO *et al.*, 2005a). Testes *in vitro* mostraram que o inibidor de sementes de fedegoso-branco (*Cassia obtusifolia*), denominado COTI, inibiu em 60% a atividade proteolítica de larvas de *Pieris rapae* e

quando adicionado em um sistema de dietas artificiais, resultou em retardo no crescimento de larvas de *P. rapae* e diminuição de, aproximadamente, 30% no peso das larvas quando comparado ao grupo controle (LIAO *et al.*, 2007). A incorporação de PDTI de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium*) (FIGURA 13), na concentração de 1%, resultou em redução de peso de larvas de *A. kuehniella* em 50%, e na concentração de 1,6% causou atraso no desenvolvimento das larvas. Esses resultados juntos com a descoberta de que PDTI liga-se à coluna de quitina levou os autores a sugerirem que a ação de PDTI sobre larvas de *A. Kuehniella* pode ocorrer via dois mecanismos: primeiro, a inibição de atividade endógena semelhante à tripsina presente no trato digestivo do inseto e; segundo, possível interação do inibidor com componentes quitinosos presentes no trato digestório do inseto. (MACEDO *et al.*, 2003). Franco *et al.* (2004) observaram que o inibidor de tripsina de soja (SKTI) inibiu a atividade de enzimas digestórias de larvas de *A. grandis* em mais de 50%. Diante desse resultado, experimentos *in vivo* foram conduzidos para determinar o potencial inseticida de SKTI para o inseto. Como resultado, foi observado que concentrações de 1,15% do inibidor presente na dieta foi capaz de reduzir em, aproximadamente, 75% o peso de larvas com quatro e dez dias de desenvolvimento. Mortalidade de insetos adultos superior a 50%, também foi observada. A presença desse inibidor na dieta também foi capaz de causar 50 e 81% de deformidades em pupa e insetos adultos (FIGURA 14). SKTI, quando incorporado em dieta artificial em concentração de 2%, reduziu o crescimento e a sobrevivência de larvas em 33 e 40%, respectivamente (GATEHOUSE *et al.*, 1999). O peso de larvas de *Diatraea saccharalis* alimentadas com dieta artificial contendo 0,5% de SKTI foi significativamente reduzido (POMPERMAYER *et al.*, 2001) e larvas de *S. litura* foram significativamente menores após ingestão desse mesmo inibidor (McMANUS; BURGESS, 1995). Ortego *et al.* (1998) também observaram que a incorporação de 0,2% de SKTI em dieta artificial resultou em 43% de mortalidade de larvas de *Aubeonymus mariaefranciscae*, além de interferir no tempo de desenvolvimento. Redução de 85% no peso de larvas de *Cydia pomonella* foi observada após ingestão de SKTI (MARKWICK *et al.*, 1995). Shade *et al.* (1986) observaram atraso no tempo de desenvolvimento de larvas de *C. maculatus* após ingestão de SKTI. O inibidor de melão de São Caetano (*Mormodica charantia*), denominado BGTI, quando incorporado em dieta artificial interferiu no crescimento e desenvolvimento de larvas de *H. armigera* e *S. litura* (TELANG *et al.*, 2003).

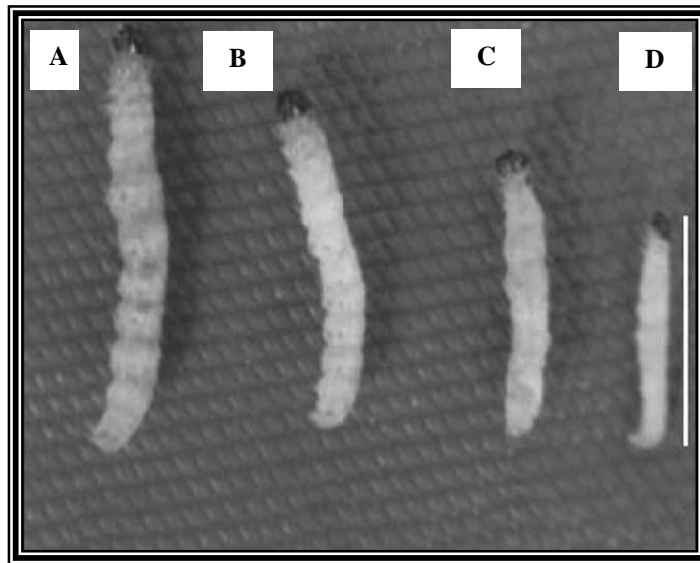


FIGURA 13: Efeito de incorporação de inibidor de sementes de canafistula (*Peltophorum dubium*), denominado PDTI, em dieta artificial para *Anagasta kuehniella*. Variações no tamanho de larvas de quarto instar alimentada sobre dieta controle (A), e dieta contendo 0,4%(B); 0,8%(C) e 16% de PDTI (D).

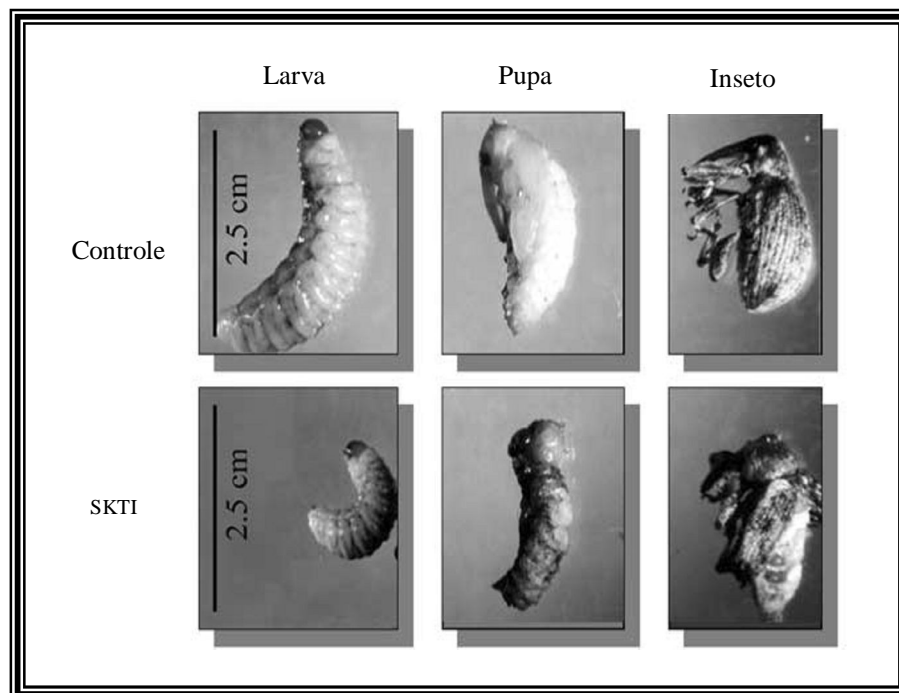


FIGURA 14: Larvas, pupas e insetos adultos de *Anthonomus grandis* alimentados sobre dieta contendo 1,15% de SKTI.

Fonte: FRANCO *et al.*, 2004.

Em processo de transgenia, gene que codifica o inibidor de tripsina de soja foi introduzido em várias plantas economicamente importantes. Plantas de arroz (*O. sativa*) transgênicas expressando SKTI foram mais resistentes ao ataque de *Nilaparvata lugens*, com aumento na taxa de mortalidade durante o desenvolvimento do inseto (LEE *et al.*, 1999). Larvas de *S. litura*, alimentadas com tecidos de folhas de tabaco (*N. tabacum*) transformadas com SKTI, tiveram seus pesos reduzidos em, aproximadamente, 6,5 vezes em relação ao controle, além de causar taxa de mortalidade elevada (McMANUS *et al.*, 1999). A expressão de SKTI em plantas de tabaco resultou em plantas resistentes ao ataque de larvas de *H. virescens* (KOO *et al.*, 1992), *H. armigera* (GAO *et al.*, 1998) e *S. littoralis* (MARCHETTI *et al.*, 2000). A expressão de SKTI em plantas de batata (*S. tuberosum*) e batata doce (*Ipomoea batatas*) mostrou se mais resistentes a predação de larvas de *S. littoralis* (MARCHETTI *et al.*, 2000) e *Cylas spp* (CIPRIANI *et al.*, 1999). Plantas de cana-de-açúcar (*S. officinarum*) expressando o gene que codifica SKTI foram mais resistentes ao ataque de larvas de *D. saccharalis* (FALCO; SILVA-FILHO, 2003). A expressão do inibidor de feijão alado (*P. tetragonolobus*), em plantas de arroz (*O. sativa*) retardou o crescimento de larvas de *Chilo suppressalis* (MOCHIZUKI *et al.*, 1999). Larvas de *H. armigera*, alimentadas com plantas de tabaco transformadas com um inibidor de *Nicotiana glauca*, tiveram seus desenvolvimentos atrasados e taxa de mortalidade aumentada (CHARITY *et al.*, 1995). Resultado similar foi obtido por Heath e colaboradores (1997) quando larvas de *H. punctigera* foram alimentadas com plantas de ervilha (*P. sativum*) expressando esse mesmo inibidor.

A interferência do processo de digestão de proteínas em pragas pela transformação do genoma de plantas com proteínas vegetais tóxicas representa uma alternativa promissora para o controle dessas pragas. Dessa forma, a busca de novos genes codificadores de proteínas de defesa tornou-se imprescindível, e os inibidores de enzimas digestórias vêm recebendo atenção especial como composto de defesa endógeno de plantas por interferir no crescimento e no desenvolvimento de pragas.

A purificação e caracterização de inibidores de proteinases presentes em sementes e a determinação da especificidade de inibição é um passo importante para a indicação desses inibidores para os programas de melhoramento genético. Dentro desse contexto, nenhum estudo foi desenvolvido sobre proteínas de defesa de sementes de Jurema Branca (*Pithecellobium dumosum*).

2 OBJETIVOS

Os estudos de inibidores de enzimas digestórias de pragas tem tido grandes avanços no intuito de aumentar as fontes de genes que possam ser usados nos programas de melhoramento que utilizam a tecnologia de DNA recombinante. Esse trabalho, portanto, teve como objetivos:

- Purificar e caracterizar inibidores de tripsina presentes em sementes de Jurema Branca (*Pithecellobium dumosum*).
- Determinar as atividades inibitórias, *in vitro*, desses inibidores sobre enzimas digestórias de Lepidopteras (*Plodia interpuncttela* e *Alabama argillacea*), Coleopteras (*Callosobruchus maculatus* e *Zabrotes subfasciatus*) e Dípteras (*Ceratitis capitata*).

3 MATERIAL

3.1 Sementes

As sementes de Jurema Branca, *Pithecellobium dumosum*, foram gentilmente fornecidas pela Divisão Técnica do Setor de Sementeiras do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Natal-RN. *P. dumosum* (FIGURA 15), pertencente à família Fabaceae (leguminosae), é um arbusto perene nativo da América do Sul, que se encontra amplamente distribuído nos Estados da Bahia, Ceará, Minas Gerais, Rio Grande do Norte e Rio de Janeiro. A planta *P. dumosum* é conhecida popularmente como Arapiraca, Pau Rósea, Vinhatico de Espino, Olho-de-cachorro, além de Jurema Branca e, também, tem recebido vários sinônimos: *Chloroleucon dumosum* (Benth.) G. P. Lewis, *Chloroleucon glazioui* (Benth.) G. P. Lewis, *Chloroleucon vinhatico* (Record) Record, *Feuilleea dumosa* (Benth.) Kuntze, *Feuilleea glazioui* (Benth.) Kuntze, *P. glazioui* Benth e *P. vinhatico* Record (BARNEBY; GRIMES, 1996).



FIGURA 15: Jurema Branca (*Pithecellobium dumosum*)

Fonte: <http://www.arvores.brasil.nom.br/florin/popular.htm>.

Classificação Botânica de *P. dumosum*

Divisão: Angiospermae

Classe: Dicotiledônea

Família: Leguminosae (Fabaceae)

Subfamília: Mimosoideae

Tribo: Ingeae

Gênero: *Pithecellobium*

Espécie: *Pithecellobium dumosum*

3.2 Insetos

Callosobruchus maculatus e *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae)

Espécimes de *C. maculatus* (gorgulho do feijão-de-corda) e *Zabrotes subfasciatus* (gorgulho do feijão-de-corda e feijão comum) foram coletadas da criação mantida no Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas (LQFPB), do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. Os dois insetos foram mantidos em uma incubadora BOD a 28 ± 1 °C, umidade relativa de 65-75%, fotoperíodo de 12 horas de luz e em sementes de feijão-de-corda (*V. unguiculata*) e feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), respectivamente, obtidas no comércio de Natal-RN.

Ceratitis capitata (Díptera: Tephritidae)

As larvas de *C. capitata* (moscas-das-frutas) foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Francisco Pepino de Macedo do Laboratório de Mosca-das-frutas do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. As larvas foram mantidas a uma temperatura de 28 ± 1

°C, umidade relativa de 60-70%, fotoperíodo de 12 horas de luz e em uma dieta artificial a base de cana-de açúcar triturado.

Plodia interpunctella (Lepidoptera: Pyralidae)

As larvas de *Plodia interpunctella* (praga generalista) foram coletadas da criação mantida no Laboratório de Química e Função de Proteínas Bioativas (LQFPB), do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. As larvas foram mantidos em uma temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60-70%, fotoperíodo de 12 horas de luz e em uma dieta artificial a base de cana-de açúcar triturado.

Alabama argillacea (Lepidoptera: Noctuidae)

As larvas de *A. argillacea* (curuquerê, praga do algodoeiro) foram gentilmente cedidas pela Dra. Márcia Vidal, do Centro Nacional de Pesquisa do Algodão (Embrapa-CNPA), Município de Campina Grande, Paraíba-PB. As larvas foram mantidas em uma temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa de 60-70%, fotoperíodo de 12 horas de luz e em folhas de algodão.

3.3 Enzimas comerciais

Proteinase serínica: Tripsina – pâncreas bovino (Sigma)

Proteinase serínica: Quimotripsina - pâncreas bovino (Sigma)

Proteinase serínica: Elastase - pâncreas suíno (Sigma)

Proteinase cisteínica: Papaína – látex de mamão (Sigma)

Proteinase cisteínica: Bromelaína do talo de abacaxi (Sigma)

3.4 Substratos sintéticos

BApNA: α -N-benzoil-arginina-p-nitroanilida (Sigma)

BANA: α -N-benzoil-arginina-p-naftilamida (Sigma)

3.5 Substrato protéico

Azocaseína (Sigma)

3.6 Reagentes

Acetonitrila (ACN) – TEDIA Brazil

Ácido etileno dianimotetracético (EDTA) - Sigma

Ácido tricloroacético (TCA) - VETEC Química Fina LTDA

Ácido trifluoroacético (TFA) - Merck

Albumina sérica bovina (BSA) – Sigma

β -Mercaptoetanol (β -Me)– VETEC Química Fina LTDA

Dimetilsulfóxido (DMSO) - Sigma

Dimetilaminocinamaldeído (DMACA) – Sigma

Ditiotreitol (DTT) – Sigma

Dodecil sulfato de sódio (SDS) – Sigma

Fenilisocianato (PITC) – Sigma

n-Heptano - Sigma

Padrão de massa molecular (Fermantas life sciences):

β -galactosidase (116 kDa);

Albumina serica bovina (66,2 kDa);

Ovalbumina (45 kDa);

Lactato desidrogenase (35 kDa);

Endonuclease de restrição (25 kDa);

β -lactoglobulina (18,4 kDa);

Lisozima (14,4 kDa).

Sepharose-4B – Sigma

TEMED – N, N, N',N'-tetrametiletilinodiamino - Sigma

Trimetilamina - Sigma

3.7 Equipamentos

Agitador Magnético Tecnal TE-081

Espectrofotômetro Femto 700 plus

Espectrômetro de massa Ultraflex II MALDI-TOF - Bruker Daltonics

Banho – Maria Tecnal – Te 056

Balança analítica eletrônica Tecnal classe II

Bomba Pump-1 Amersham Biosciences

Centrífuga HITACHI CR 21

Coletor de frações Radifrac da Pharmacia Biotech

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)– Mod. LC-10A – Shimadzu

Cromatografia líquida de alta eficiência (Wskosil-PTH) - Wako

Microcentrífuga Eppendorf 5410

Seqüenciador PSSQ-21A - Shimadzu

4 MÉTODOS

4.1 Preparação do extrato protéico de sementes de Jurema Branca

As sementes de Jurema Branca (*P. dumosum*) foram moídas em um processador até a formação de um pó de granulação fina, em torno de 40 mesh. As proteínas totais desta farinha foram extraídas em tampão tetraborato de sódio, 50 mM, pH 7,5, na proporção de 1:10 (farinha : meio de extração, m/v). O extrato protéico foi submetido à agitação constante, por 3 horas em temperatura ambiente. Decorrido esse tempo, o extrato protéico foi centrifugado a 12.000 x g por 30 min a 4 °C e o sobrenadante obtido foi denominado extrato bruto (EB).

4.2 Fracionamento protéico com ácido tricloroacético (TCA)

O extrato bruto obtido foi submetido à precipitação com solução aquosa de TCA 20% para remoção de proteínas de alto peso molecular. Alíquotas de 2 mL de extrato bruto foram precipitadas com solução aquosa de TCA 20%, em banho de gelo, para obter frações protéicas com concentração final de 0,5; 1; 2; 6; 10 e 14% de TCA. Decorridos 30 min da adição lenta de TCA em constante agitação, as frações protéicas foram centrifugadas a 12.000 g por 30 minutos a 4 °C e os sobrenadantes obtidos dialisados contra tampão tetraborato de sódio, 50 mM, pH 7,5, e submetidos a ensaio de atividade inibitória sobre a atividade catalítica da tripsina. Após essa primeira análise, a fração protéica obtida após adição de TCA na concentração final de 14% apresentou maior atividade inibitória e específica. Tendo em vista esse resultado, o restante do extrato bruto foi submetido ao mesmo tratamento e a fração protéica, denominada JB14, foi utilizada nas etapas subseqüentes de isolamento e purificação protéica.

4.3 Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Medidas de densidade óptica a 280 e 220 nm foram feitas para acompanhamento de corridas cromatográficas.

4.4 Preparo das soluções usadas como substrato

BAPNA a 1,25 mM foi dissolvido em DMSO (Dimetilsulfóxido 1% do volume final) e o volume completado com tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,5. Para os ensaios cinéticos também foram preparados BAPNA a 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 2,0; e 2,5 mM, utilizando o mesmo procedimento descrito anteriormente.

BANA a 1 mM foi dissolvido em DMSO (Dimetilsulfóxido 1% do volume final) e o volume completado com tampão fosfato 250 mM, pH 6,0. Para os ensaios cinéticos também foram preparados BANA a 0,4; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; e 3,0 mM, utilizando o mesmo procedimento.

Azocaseína 1% foi preparada pesando-se 1 grama de azocaseína que foi dissolvido em 100 mL de tampão tris-HCl, 50 mM, pH 7,5. A suspensão foi fervida por cerca de 15 min, e após resfriamento o volume foi completado com água destilada. A solução foi reservada em congelador até sua utilização. Outras soluções de azocaseína 1% também foram preparadas em tampão tris-HCl, 50 mM, pH 8,5 e pH 9,5, utilizando o mesmo procedimento.

4.5 Determinação da atividade anti-tríptica

A atividade anti-tríptica das frações foi determinada utilizando a seguinte metodologia (ERLANGER; KOLOWSKY; COHEN, 1961): alíquota de 10 µl da solução de tripsina bovina (0,3 mg/mL tampão tris-HCl, 50 mM, pH 7,5, contendo

CaCl₂ 20 mM) foi pré-incubada com 390 µl de tampão tris-HCl 50 mM pH 7,5, contendo CaCl₂ 20 mM e 100 µl do inibidor, por 10 min, a 37 °C. Após esse período, a reação foi iniciada adicionando-se 250 µl de solução de substrato (BApNA 1,25 mM). A reação processou por mais 15 min nas mesmas condições de incubação e, em seguida, foi interrompida adicionando-se 60 µl de solução de ácido acético 30%. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas e provas em branco foram realizadas. A formação de *p*-nitroanilina (FIGURA 16) foi monitorada em espectrofotômetro a 410 nm.

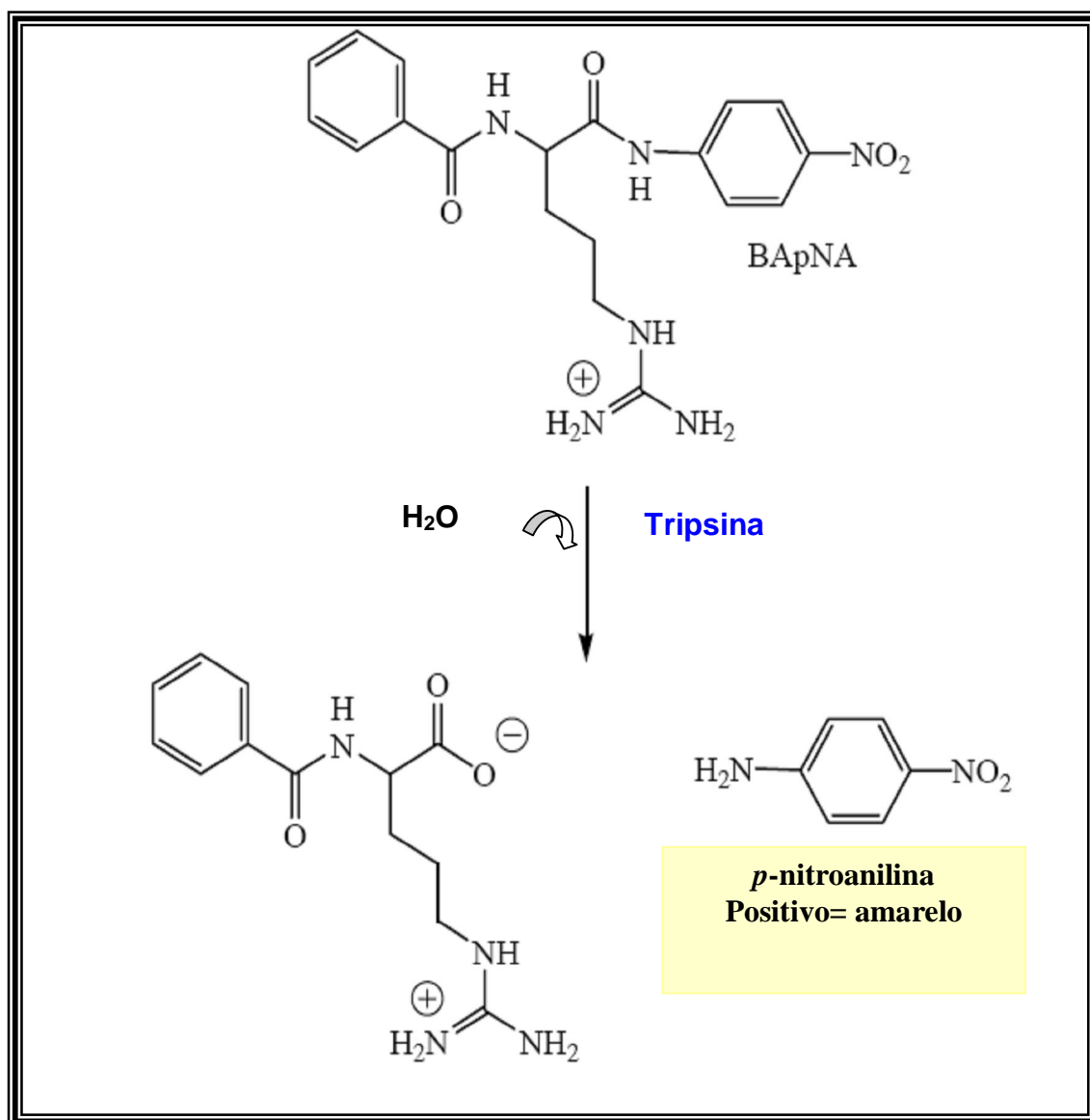


FIGURA 16: Esquema de hidrólise do BApNA.

4.6 Isolamento e Purificação

4.6.1 Cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose

A cromatografia de afinidade foi feita através da ligação de tripsina bovina a resina de Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio, seguindo as instruções do fabricante. Para o seu preparo, pesou-se 1g da Sepharose para cada 3,5 mL de volume final de gel. O pó foi ressuspendido em 50 mL de HCl 1 mM e lavado por 15 min sendo filtrado várias vezes com auxílio de bomba a vácuo. O gel foi retirado do filtro, adicionou-se 15 mL de HCl 1mM e deixou-se em repouso por 15 min.

A tripsina utilizada para a ligação (FIGURA 17) foi preparada dissolvendo-se 10 mg de enzima, por mL de gel, em tampão bicarbonato de sódio, 100 mM, pH 8,3, contendo NaCl 500 mM. A solução de tripsina foi então adicionada ao gel e incubou-se por 16h a 4 °C. Decorrido o tempo, lavou-se o excesso de ligante (tripsina) com 5 volumes de tampão bicarbonato de sódio, 100 mM, contendo NaCl 500 mM. Em seguida, o gel foi transferido para um recipiente contendo tampão tris-HCl, 100 mM, pH 8,0 por duas horas, para bloquear quaisquer grupos ativos remanescentes na resina. Decorrido esse tempo, o gel foi lavado com 5 volumes de tampão acetato de sódio, 100 mM, contendo NaCl 500 mM, pH 4,0, seguido por 5 volumes de tris-HCl, 100 mM, contendo NaCl 500 mM, pH 8,0. Após esse procedimento, o gel foi transferido para uma coluna (10 cm x 1,5 cm) e equilibrada com tampão tetraborato de sódio, 50 mM, pH 7,5.

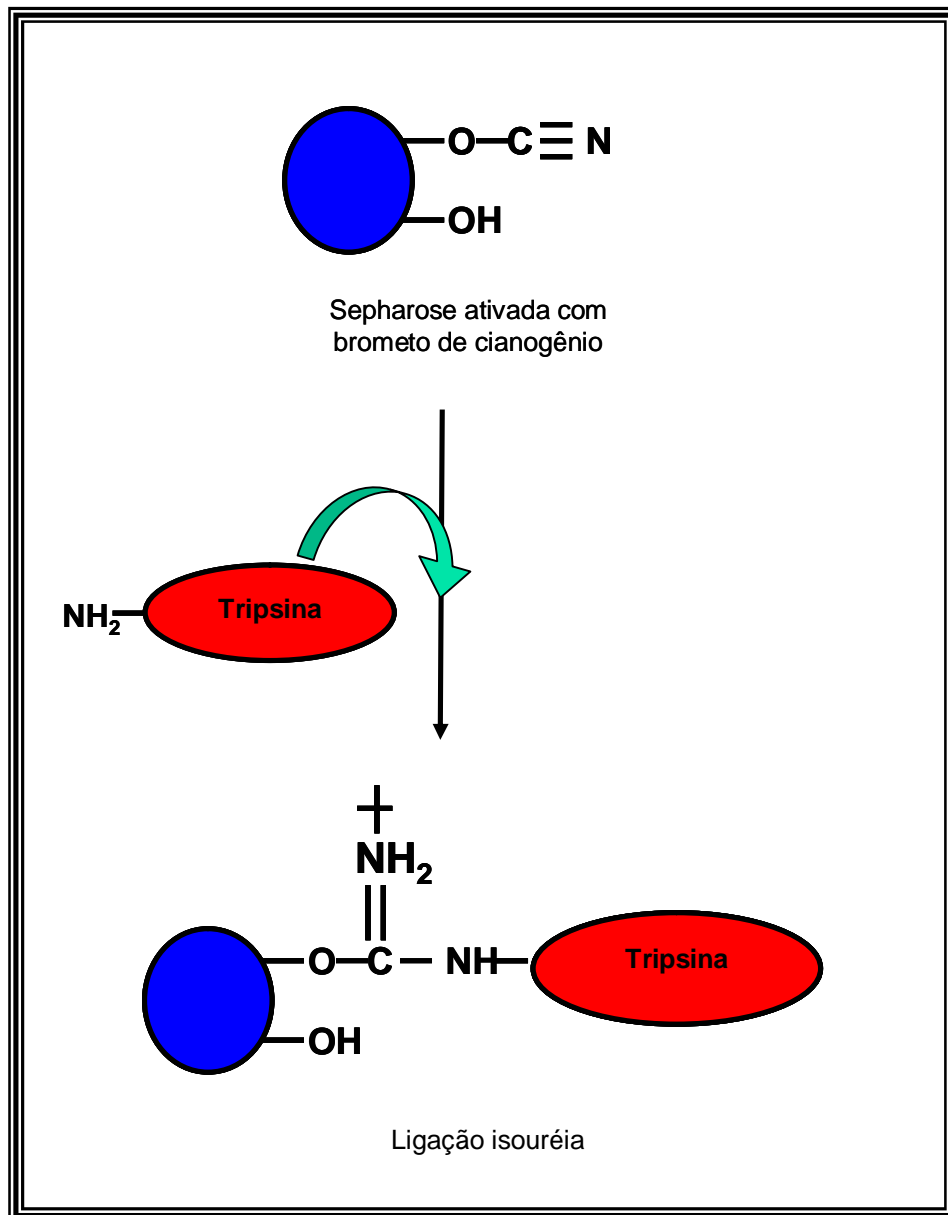


FIGURA 17: Esquema de tripsina bovina acoplada a Sepharose

A fração JB14 (cerca de 13 mg de proteínas) dialisada contra tampão tetraborato de sódio, 50 mM, pH 7,5, proveniente da precipitação com solução aquosa de TCA 20%, foi submetida a cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose (10 cm X 1,5 cm) equilibrada com tampão tetraborato de sódio, 50 mM, pH 7,5. As proteínas adsorvidas na matriz foram eluídas com solução de HCl 1mM. Frações de 2 mL foram coletadas em fluxo constante de 0,5 mL/min e o perfil cromatográfico das proteínas foi acompanhado por espectrofotometria a 280 nm. O pico adsorvido na matriz de afinidade, denominado JB14Af, foi dialisado e submetido a ensaio de atividade inibitória para tripsina.

4.6.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A fração protéica de Jurema Branca obtida de coluna de afinidade em Tripsina-Sepharose foi analisada por CLAE em um cromatógrafo líquido LC-10A da *Shimadzu* constituído por um sistema binário de bombeamento de solvente, detector espectrofotométrico UV-Vis, injetor *Rheodyne* e uma estação de trabalho com aplicativo de controle do sistema (SCL – 10 Avp *system controller*) no Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, São Paulo. Para a análise inicial da fração protéica de Jurema Branca em CLAE, foram aplicados 5 µL de uma solução contendo 10 mg de proteína/mL. As condições analíticas iniciais consistiram, de uma maneira geral, no emprego de: coluna analítica de fase reversa C-18 (0,46 x 25,0 cm), diâmetro das partículas: 5 µm, diâmetro dos poros de 300 angstroms); sistemas de solventes constituído por: Solvente A; TFA 0,1% / H₂O e solvente B contendo, ACN 60%/ TFA 0,09% /H₂O (sistema TFA); gradiente de 5 a 35% de solvente B por 10 min; 35 a 60% em 25 min; 60 a 68 % em 5 min; de 68 a 88% em 20 min; 88 a 95% em 10 min; 95 a 5% em 2 min e 5% de B em 1 min; detecção em 220 nm e fluxo de 1 mL/min.

As condições experimentais determinadas nessas análises foram extrapoladas para uma escala de isolamento (FIGURA 18) dos componentes protéicos de Jurema Branca, utilizando uma coluna semi-preparativa de mesma polaridade que a empregada na escala analítica, medindo (2,2 x 25,0 cm); detecção

em 220 nm e fluxo de 9 mL/min, onde foram aplicados cerca de 6 mg de proteína. Os picos protéicos isolados nessa fase de purificação foram liofilizados. Os liofilizados correspondentes aos picos protéicos foram denominados como JB1, JB2, JB3 e JB4. Essas frações foram recromatografadas utilizando-se coluna analítica (0,46 x 25,0 cm); detecção em 220 nm e fluxo de 1 mL/min; aplicação de volumes de 50 uL de cada fração contendo, aproximadamente, 50 ug de proteína. Para avaliar o grau de pureza de cada um dos inibidores, os gradientes de acetonitrila com variação de 1% de solvente B por min foram os seguintes:

Para JB1: 5% de solvente B em 5 min; 5 a 45% de solvente B em 5 min; 45 a 62 % de solvente B em 17 min; 62 a 95% de solvente B em 2 min; 95% de solvente B em 10 min; 95 a 5% de solvente B em 2 min e 5% de solvente B em 1 min.

Para a purificação de JB2: 5% de solvente B em 5 min; 5 a 55% de solvente B em 5 min; 55 a 75% de solvente B em 20 min; 75 a 95% de solvente B em 2 min; 95% de solvente B em 10 min; 95 a 5% de solvente B em 2 min; 5% de solvente B em 1 min.

Para JB3-1 e JB3-2: 5% de solvente B em 5 min; 5 a 62% de solvente B em 5 min; 62 a 77 % de solvente B em 15 min; 77 a 95% de solvente B em 2 min; 95% de solvente B em 10 min; 95 a 5% de solvente B em 2 min e 5% de solvente B em 1 min.

Para JB4: 5% de solvente B em 5 min; 5 a 80% de solvente B em 5 min; 80 a 100 % de solvente B em 20 min; 100% de solvente B em 10 min; 100 a 5% de solvente B em 2 min e 5% de solvente B em 1 min.

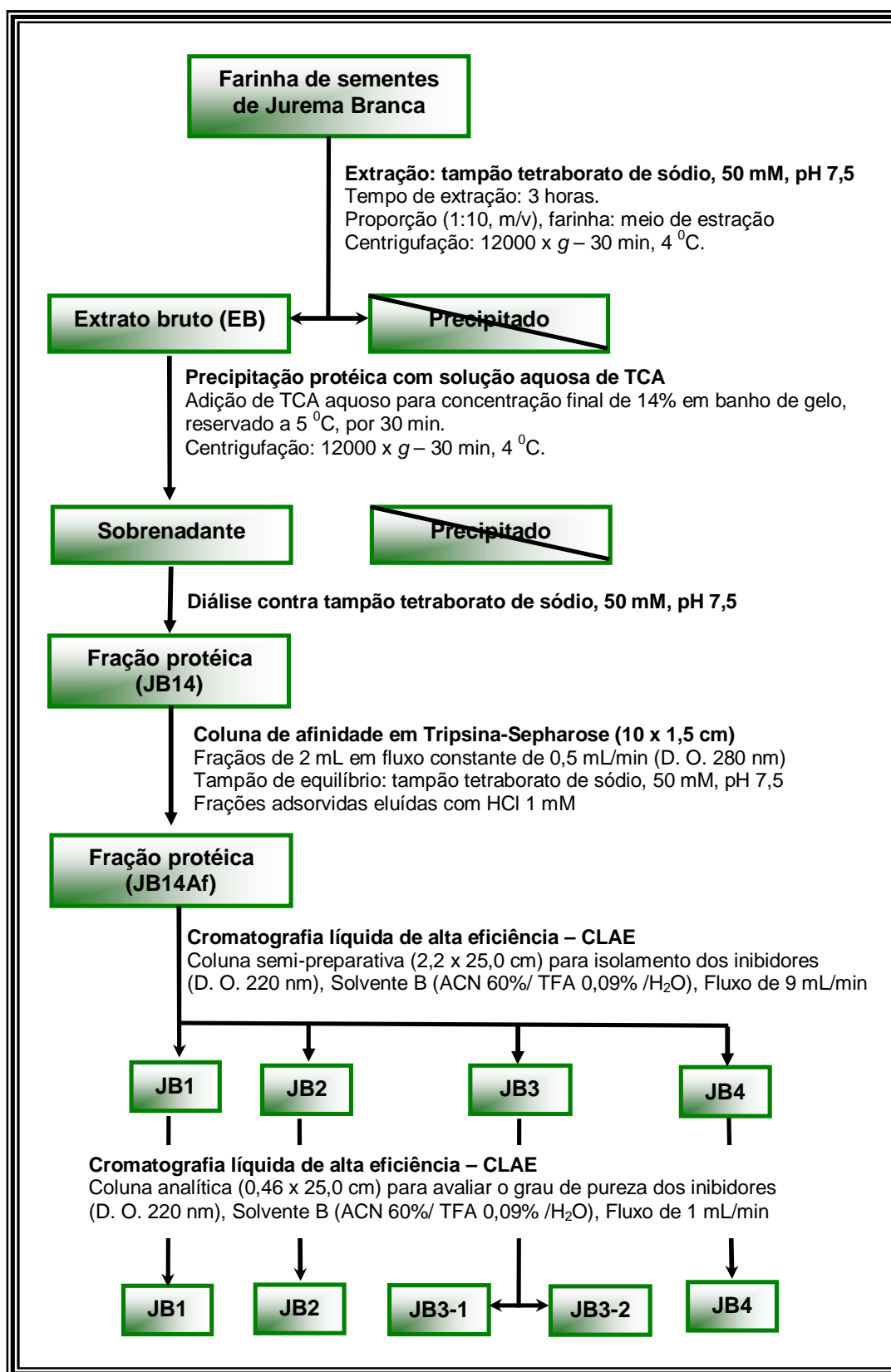


FIGURA 18: Esquema de isolamento e purificação dos inibidores de tripsina de sementes de Jurema Branca

4.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

4.7.1 SDS-PAGE em condições desnaturantes e não redutoras

A eletroforese das amostras foi feita segundo o método desenvolvido por Laemmli (1970). Foram utilizadas placas de vidro de dimensões 10 x 14 cm, espaçadores de 0,75 mm e solução estoque de acrilamida/bisacrilamida (30/ 0,8%, m/m) dissolvida em água destilada para um volume final de 100 mL. Esta solução foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 1 e estocada em frascos escuros a 5 °C. O gel de separação foi preparado numa concentração de 15% contendo: 1,2 mL de água destilada, 1,3 mL de tampão tris-HCl, 1500 mM, pH 8,8, 50 µl de SDS 10%, 2,5 mL de solução estoque de acrilamida/bisacrilamida, 25 µL de persulfato de amônio e 2,5 µL de Temed. O gel de concentração foi preparado com 1,5 mL de água destilada, 0,625 mL de tampão tris-HCl, 1500 mM, pH 6,8, 25 µL de SDS 10%, 0,33 mL de solução estoque de acrilamida/bisacrilamida, 12,5 µL de persulfato de amônio e 2,5 µL Temed. Às frações protéicas contendo 15 µg de proteínas, foi adicionado tampão de amostra constituído de tris-HCl, 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10% (v/v), e azul de bromofenol 0,01%. O tampão de corrida continha trizma base 25 mM, glicina 192 mM e SDS 10%. A eletroforese foi realizada sob corrente constante de 20 mA por, aproximadamente, 2 horas.

4.7.2 SDS-PAGE em condições desnaturante e redutoras

Essa eletroforese foi realizada com amostras tratadas com β -Me 100 mM, a 100 °C, por 10 min. Após esse procedimento as amostras foram submetidas à migração eletroforética como descrito no item anterior.

4.7.3 Coramento com Comassie Blue

Após a eletroforese, o gel foi corado segundo procedimento descrito por Weber e Osborne (1969). A solução corante foi preparada usando-se Comassie Blue R-250 1%, MeOH 40%, AcOH 10% em H₂O destilada. O descoloramento foi feito com uma mistura de solventes contendo AcOH 10% e MeOH 30%.

4.7.4 Revelação com nitrato de prata

Para melhor visualização das bandas protéicas, o gel foi submetido a revelação com nitrato de prata, o qual foi desidratado, gradativamente, com uma solução de EtOH 50%, submetendo-se a três lavagens de 20 min cada. Em seguida, foi adicionada uma solução de tiosulfato de sódio (20 mg/100 mL H₂O) e mantida por 1 min sob leve agitação. Decorrido esse tempo, foram feitas três lavagens rápidas em água destilada, sendo então adicionada a solução de nitrato de prata (200 mg + 74 µL de formaldeído em 100 mL de H₂O) mantendo-se por 20 min sob leve agitação. Após esse tempo, o gel foi submetido a três lavagens rápidas em água destilada e adicionou-se a solução reveladora (carbonato de cálcio 6 g + 50 µL de formaldeído + 2 mL de tiosulfato de sódio em 100 mL de H₂O). Para cessar a revelação, adicionou-se uma solução de AcoH 13% (BLUM; BEIER; GROSS, 1987).

4.8 Caracterização dos inibidores purificados

4.8.1 Determinação da massa molecular por espectrometria de massa

As massas moleculares dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca, JB1, JB3-1 e JB3-2, foram determinadas no Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais aos cuidados do Professor Dr. Marcelo Porto Bemquerer, usando um espectrômetro de massa Ultraflex II MALDI-TOF (Bruker Daltonics). A matriz do MALDI-TOF foi preparada pela adição de uma solução de matriz, contendo ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (5,0 mg) dissolvido em 300 μ L de água Milli-Q, 200 μ L de ACN 50% e 50 μ L de solução de TFA 3%. Para determinar as massas moleculares dos inibidores, alíquotas de 3 μ L de solução de matriz, foram aplicadas na placa do MALDI contendo na ordem de 10^{-15} mol de cada inibidor.

4.8.2 Seqüenciamento da extremidade N-terminal

A seqüência N-terminal dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca, JB1, JB3-1 e JB3-2, com atividade para tripsina foram determinadas no Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais aos cuidados do Professor Dr. Marcelo Porto Bemquerer, seguindo a metodologia descrita por Matsudaira (1987) (FIGURA 19). As proteínas (cerca de 1000 pmol) foram dissolvidas em 100 μ L de uma solução aquosa contendo ACN 50% e TFA 0,1%, e subsequentemente, colocadas sobre uma fibra de vidro contendo o polímero seque-brene (Sigma), previamente tratado de acordo com procedimentos padronizados do equipamento PSSQ-21A (Shimadzu). A derivação foi feita com solução de fenilisocianato em n-heptano a 5% na presença de solução de TFA e trimetilamina a 12%. A derivação foi seguida de uma etapa de convenção do intermediário tiazolina em PTH-aminoácido (feniltiodantina-aminoácido) por uma

solução aquosa de TFA a 25%. A separação dos PTH-aminoácidos ocorreu em uma coluna de fase reversa (Wakosil-PTH, 25 cm x 4,6 mm, Wako) com a eluição conduzida em condições isocrática, detectados em comprimento de onda de 234 nm e analisados em seqüenciador Shimadzu PSSQ-21A.

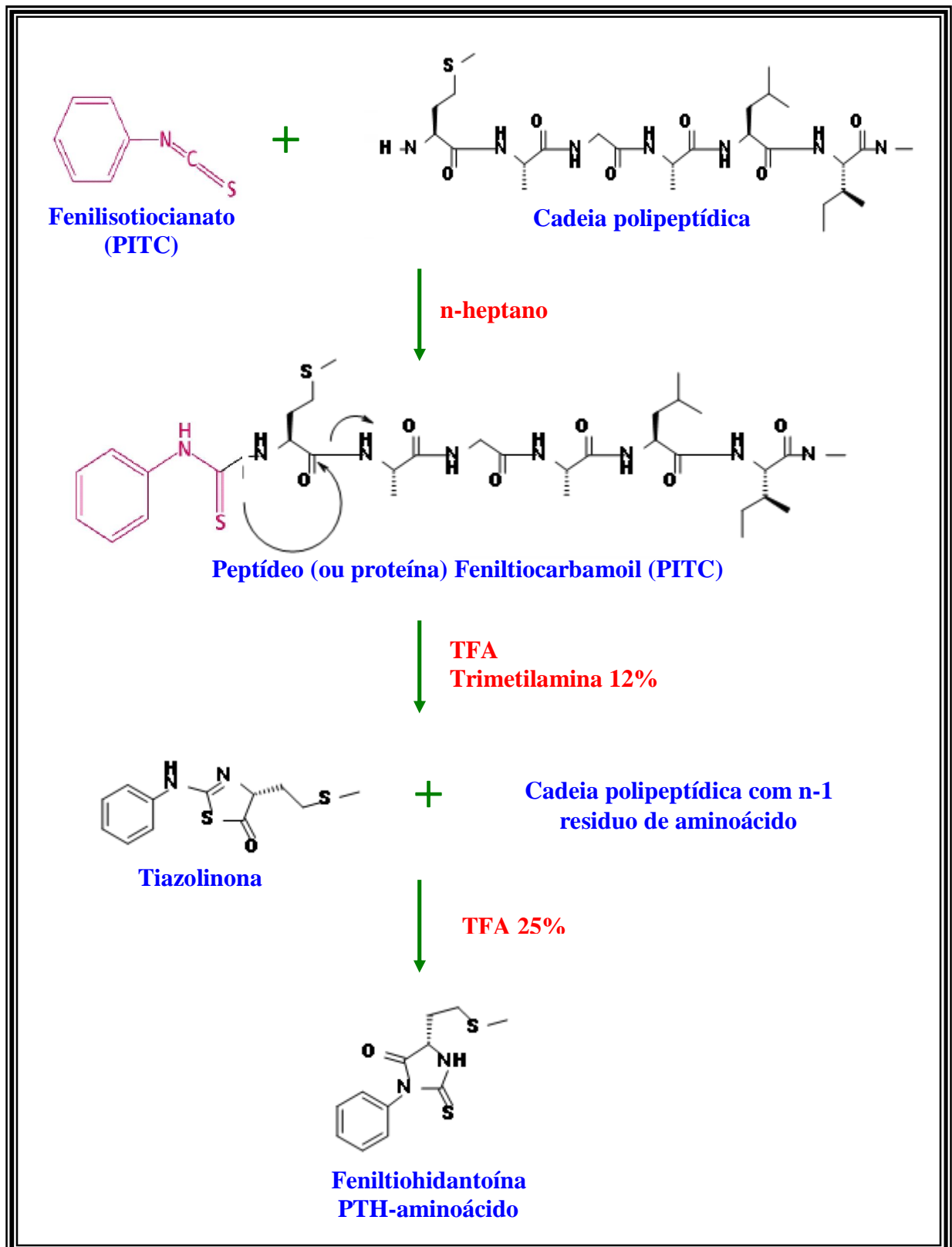


FIGURA 19: Esquema de sequenciamento de proteínas por degradação de Edman

4.8.3 Análise e alinhamento da seqüência N-terminal

A seqüência N-terminal obtida de JB1, JB3-1 e JB3-2 foram analisadas e comparadas com seqüências existentes no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov). As seqüências abaixo, foram obtidas no formato FASTA para alinhamento no Programa Clustal W (THOMPSON, HIGGINS, GIBSON, 1994): *Acacia confusa* (AcTI, gi: 166234); *Adenantha pavonina* (ApTI, gi: 225058); *Erythrina caffra* (ECTI, gi: 124154), *Leucaena leucocephala* (LITI, gi: 18202442), *Prosopis juliflora* (PjTI, gi: 243386), *Copaifera langsdorffii* (CITI, gi 49258682, NCBI), *Psophocarpus tetragonolobus* (PtTI, gi 124938, NCBI).

4.9 Estabilidade dos inibidores em variações de pHs e temperaturas

4.9.1 Estabilidade dos inibidores em variação de pHs

Para avaliar a estabilidade dos inibidores a variação de pHs, seguiu-se a metodologia como descrita em Gomes e colaboradores (2005a), onde cerca de 100 ug de liofilizado correspondente a cada inibidor foram ressuspensos em 100 uL de tampão com o pH desejado. Esses tampões foram, glicina-HCl pH 2,0-3,0; fosfato de sódio pH 6,0 e 8,0; e glicina-NaOH pH 11,0-12,0, nos quais a concentração de soluto foi de 100 mM. Após 30 min de incubação a 37 °C nos referidos tampões, as amostras foram dialisadas por cerca de 4 horas em tris-HCl, 50 mM, pH 7,5. Os ensaios de atividade inibitória para tripsina foram feitos em triplicata utilizando-se 10 uL da solução dos inibidores contendo 10 ug de proteína. Provas em branco também foram realizadas.

4.9.2 Estabilidade térmica dos inibidores

Para determinar a estabilidade térmica dos inibidores seguiu-se a metodologia como descrita em Gomes e colaboradores (2005a), onde cerca de 100 ug dos inibidores liofilizados foram ressuspensos em 100 uL de tampão tris-HCl, 50 mM, pH 7,5 e incubados por 30 min, a 37, 40, 60, 70, 90 e 100 °C. Decorrido o tempo de incubação, as amostras foram resfriadas a 4 °C e após esse procedimento, alíquotas de 10 uL dos inibidores contendo 10 ug de proteínas foram utilizadas nos ensaios de atividade inibitória sobre a tripsina. Os ensaios foram realizados em triplicata e provas em branco foram realizadas.

4.10 Especificidade dos inibidores para proteinases serínicas e cisteínicas

4.10.1 Inibição da elastase

Nos ensaios de inibição da atividade catalítica da elastase, 30 μL da enzima (0,1 mg/mL em tris-HCl, 50 mM, pH 7,5) foram incubados com 310 μL de tampão tris- HCl, 50 mM, pH 7,5, em presença de 20 μL dos inibidores por, 15 min, a 37 °C. Após esse tempo, foram acrescentados 500 μL de azocaseína 1%. Após 30 min, a reação foi interrompida pela adição de 150 μL de TCA 20%. A mistura de reação foi centrifugada por 10 min a 12000 x g. Alíquotas de 500 uL dos sobrenadantes foram adicionadas a 500 uL de NaOH 2 N, e a absorbância foi medida a 440 nm. Provas em branco foram realizadas e os ensaios foram feitos em triplicata.

4.10.2 Inibição da quimotripsina

Para verificar a atividade inibitória sobre a atividade catalítica da quimotripsina, 20 μL da enzima (0,1 mg/mL de tris-HCl, 50mM, pH 7,5) foram incubados com 320 μL de tampão tris-HCl, 50mM, pH 7,5 e 20 μL dos inibidores purificados por 15 min a 37 °C. Após esse tempo, foram acrescentados 500 μL de azocaseína 1%. Decorridos 30 min de incubação a 37 °C, a reação foi parada pela adição de 150 μL de TCA 20%. A mistura de reação foi centrifugada por 10 min a 12000 x g. Alíquotas de 500 uL dos sobrenadantes foram adicionadas a 500 uL de NaOH 2 N, e a absorbância foi medida a 440 nm. Provas em branco foram realizadas e os ensaios foram feitos em triplicata.

4.10.3 Inibição da bromelaína

Para a determinação da atividade inibitória sobre a atividade catalítica da bromelaína, 30 μ L de solução de bromelaína (1 mg/ mL de tampão acetato de sódio, 300 mM, pH 5,5) foi pré-incubada com 310 μ L de tampão acetato de sódio, 300 mM, pH 5,5, contendo DTT 3 mM e EDTA 2 mM, e 20 μ L dos inibidores por um período de 20 min a 45 °C. Após esse tempo, foram acrescentados 500 μ L de azocaseína 1%. Decorridos 30 min de incubação, a reação foi parada pela adição de 150 μ L de TCA 20%. A mistura de reação foi centrifugada por 10 min a 12000 x g. Alíquotas de 500 μ L dos sobrenadantes foram adicionadas a 500 μ L de NaOH 2 N, e a absorbância foi medida a 440 nm. Provas em branco foram realizadas e os ensaios foram feitos em triplicata.

4.10.4 Inibição da papaína

Para avaliar a atividade inibitória sobre a atividade catalítica da papaína (FIGURA 20), seguiu-se a metodologia descrita por ZHAO e colaboradores (1996). Alíquotas de 10 μ L de solução de papaína (0,1 mg/mL de tampão fosfato de sódio, 250 mM, pH 6,0) foram incubadas com 20 μ L de tampão fosfato de sódio, 250 mM, pH 6,0, contendo DTT 3 mM e EDTA 2 mM, 200 μ L de tampão fosfato de sódio, 250 mM, pH 6,0 e 20 μ L dos inibidores por um período de 10 minutos a 37 °C. Decorrido esse tempo, foram adicionados 100 μ L de BANA 1 mM e a mistura de reação permaneceu por mais 20 minutos nas mesmas condições. A reação foi parada pela adição de 250 μ L de HCl 2% em EtOH, e em seguida, foram adicionados 250 μ L do reagente de cor (DMACA 0,06 % em 100 mL de EtOH). Decorridos 20 min, a absorbância foi medida a 540 nm.

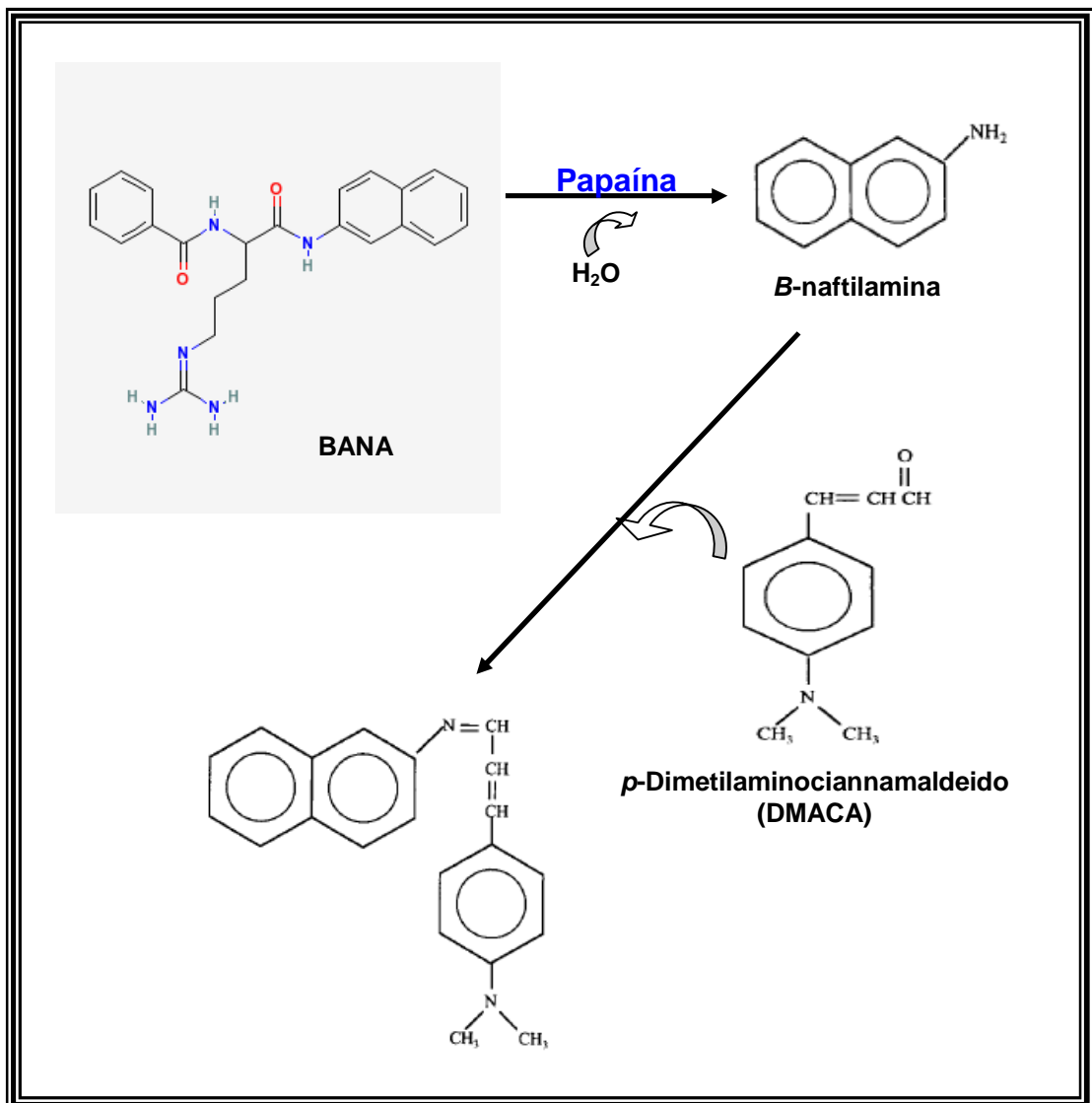


FIGURA 20: Esquema de hidrólise do BANA pela papaína.

4.11 Determinação do mecanismo e da constante de inibição

4.11.1 Sistema enzimático tripsina x BApNA

Para determinação do mecanismo de inibição sobre a atividade catalítica da tripsina, os ensaios foram realizados como descrito no item 4.5. Para o controle positivo, alíquotas de 10 µl de solução de tripsina (0,3 mg/mL tampão tris-HCl, 50 mM, pH 7,5 contendo CaCl₂ 20 mM) foram incubadas por 15 min, a 37 ° C com concentrações crescentes de solução de substrato BApNA (0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 2,0 e 2,5 mM) em volumes de 250 µL na ausência de inibidor. Para a análise das frações inibidoras, alíquotas de 10 µL de cada inibidor, contendo 2, 3, 4, e 5 ug de proteínas, respectivamente, foram incubadas com 10 µL de solução de tripsina e 250 µl da solução de BApNA nas concentrações acima referidas.

Os valores de Ki foram calculados como descrito por Cheng e Prusoff (1973), usando as seguintes fórmulas:

Onde:

$$K_i \text{ app} = \frac{[I]}{\frac{V_o - V_i}{V_i}}$$

Ki app = constante de inibição aparente;

[I] = concentração protéica do inibidor (µg/mL);

Vo = velocidade inicial (Vmax/2) na ausência do inibidor (µmol.L⁻¹ . min⁻¹ ou mmol.L⁻¹ . min⁻¹);

Vi = velocidade da enzima na presença do inibidor (µmol.L⁻¹ . min⁻¹ ou mmol.L⁻¹ . min⁻¹);

$$K_i = \frac{K_i \text{ app}}{\frac{K_m - S}{K_m}}$$

Ki = constante de inibição (µg/mL);

[S] = concentração do substrato utilizada no ensaio de inibição (mmol.L⁻¹ ou %);

Km = constante de Michaelis-Menten

4.11.2 Sistema enzimático papaína x BANA

Para determinação dos mecanismos de inibição sobre a atividade catalítica da papaína, os ensaios foram realizados como descrito no item 4.10.4. Para o controle positivo, alíquotas de 10 μL de solução de papaína (0,1 mg/mL de tampão fosfato de sódio, 250 mM, pH 6,0) foram incubadas por 20 min, a 37 $^{\circ}\text{C}$ com concentrações crescentes de BANA (0,4; 0,8; 1,0; 1,5; 2,0 e 3,0 mM) em volumes de 100 μl , na ausência de inibidor. Para a análise da fração inibidora, alíquotas de 10, 20, 30 e 40 μL de cada inibidor, correspondendo a 10 μg , 20 μg , 30 μg , e 40 μg de proteína, respectivamente, foram incubadas com 10 μL de solução de papaína e 100 μl das soluções de BANA acima referidas.

Os valores de K_i foram determinados com base nos dados do gráfico de Lineweaver-Burk. Os valores do intercepto correspondem aos valores obtidos no eixo X ($1/V$ ($\text{D.O.}_{540}/\text{h/mL}$) $^{-1}$) e os valores para a inclinação das retas foram obtidos pela fórmula abaixo:

$$\text{Inclinação} = \frac{\Delta 1/V (\text{DO}_{540} \cdot \text{h} \cdot \text{mL})^{-1}}{\Delta 1/[\text{S}]}$$

4.12 Preparo das enzimas digestórias de Insetos

Larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, coletadas entre 17 e 20 dias de vida pós-eclosão (3º instar), de *A. argillacea* e *P. interpunctella*, 5º instar, e larvas de *C. capitata*, de 5 dias de idade, foram mergulhadas em solução de NaCl 150 mM e dissecadas com auxílio de pinças de relojoeiro e lupa estereoscópica, para retirada de todos os tecidos estranhos as paredes intestinais. Cerca de 100 intestinos médios assim obtidos foram, imediatamente, colocados em tubos para microcentrífuga contendo 100 µL de tampão. Intestinos de *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* e de *A. argillacea* foram colocados em tampão tris-HCl, 50 mM, pH 7,5, e intestinos de *P. interpunctella* e *C. capitata* foram colocados em tampão tris-HCl, 50 mM em pH 9,5 e 8,5, respectivamente, e estocados a -20 °C. O homogenato intestinal das larvas foi preparado seguindo a metodologia estabelecida por Terra, Ferreira e Bianchi (1977). Os intestinos das larvas dos insetos foram homogeneizados com auxílio de um “potter”, em banho de gelo, por aproximadamente 10 min, usando-se como extrator 1 mL de seus respectivos tampões. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 12.000 x g, por 10 min, a 4 °C e os sobrenadantes obtidos foram imediatamente utilizados para ensaios de atividade enzimática e inibitória como descrito abaixo.

4.12.1 Ensaio *in vitro* com estratos intestinais de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*

Nos ensaios, *in vitro*, alíquotas de 50 µL de extrato intestinal de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, foram incubadas em 290 µL de tampão tris-HCl, 50 mM, pH 7,5, e 20 uL dos inibidores por 15 min, a 37 °C. Após este período de incubação, foram adicionados 500 µL de Azocaseína 1% e a mistura de reação foi incubada por mais 30 min, na mesma temperatura. Decorrido esse tempo, a reação foi parada pela adição de 150 uL de TCA 20%. A mistura de reação foi então centrifugada por 10 minutos a 12000 x g. Alíquotas de 500 uL dos sobrenadantes foram adicionadas a

500 uL de NaOH 2 N, e a absorbância foi medida a 440 nm. Provas em branco foram realizadas e os ensaios foram feitos em triplicata.

4.12.2 Ensaio *in vitro* com extratos intestinais de *C. capitata*, *A. argillacea* e *P. interpunctela*.

Para determinar a atividade inibitória, *in vitro*, sobre os extratos intestinais de *C. capitata*, *A. argillacea* e de *P. interpunctela*, alíquotas de 20 uL de cada extrato foram incubadas com 290 µL de tampão tris-HCl, 50 mM, em pH 8,5, 7,5 e 9,5, respectivamente, em presença de 20 uL dos inibidores por 15 min, a 37 °C. A seguir, foram adicionados 500 µL de azocaseína 1% e a incubação procedeu-se por mais 30 min, a 37 °C. Decorrido esse tempo, a reação foi parada pela adição de 150 uL de TCA 20%. A mistura de reação foi então centrifugada por 10 min a 12000 x *g*. Alíquotas de 500 uL dos sobrenadantes foram adicionados a 500 uL de NaOH 2 N, e a absorbância foi medida a 440 nm. Provas em branco foram realizadas e os ensaios foram feitos em triplicata.

5 RESULTADOS

5.1 Detecção, isolamento e purificação

5.1.1 Detecção de atividade inibitória nos extratos protéicos de Jurema Branca

A FIGURA 21 mostra as atividades inibitórias sobre a atividade catalítica da tripsina presente no extrato bruto (EB) e nas frações protéicas de sementes de Jurema Branca obtidas após tratamento do EB com ácido tricloroacético (TCA) em concentração final de 0,5%, 1%, 2%, 6%, 10% e 14%. Essas frações foram denominadas de acordo com a concentração final de ácido tricloroacético como JB0,5, JB1, JB2, JB6, JB10 e JB14. A atividade catalítica da tripsina foi inibida em 53,49%, 52,73%, 60,15%, 64,09%, 65,30%, 70,76% e 82,87%, respectivamente, e suas unidades de inibição por miligrama de proteínas (UI/mg de proteína) foram 54, 138, 227, 287, 480, 577 e 867, respectivamente. A fração protéica, denominada JB14%, apresentou maior atividade específica e foi submetida aos procedimentos subseqüentes de purificação.

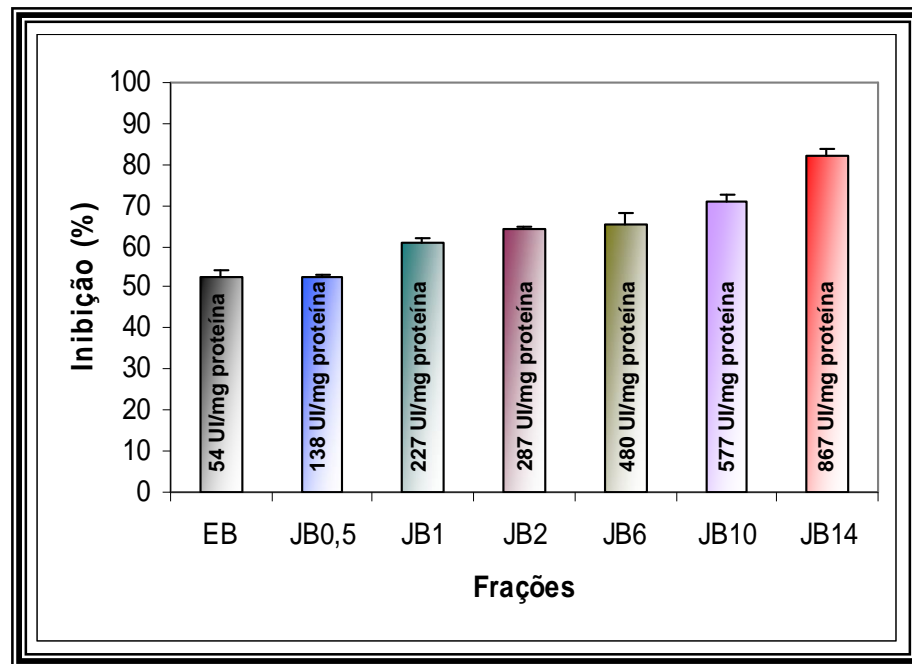


FIGURA 21: Atividade anti-trípica e específica (UI/mg proteína) de frações protéicas de sementes de Jurema Branca: Nos ensaios de atividades inibitórias das frações protéicas sobre a atividade catalítica da tripsina foi utilizado 100 μ L de cada fração. EB, extrato bruto; frações protéicas de sementes de Jurema Branca obtidas após tratamento do EB com TCA em concentração final de 0,5% (JB0,5), 1% (JB1), 2% (JB2), 6% (JB6), 10% (JB10) e 14% (JB14).

5.1.2 Cromatografia de afinidade de JB14 em Tripsina-Sepharose

A fração protéica de sementes de Jurema Branca, denominada de JB14, proveniente do fracionamento do extrato bruto de sementes com TCA, na concentração final de 14%, apresentando cerca de 80% de inibição sobre a atividade catalítica da tripsina, foi submetida à cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose (FIGURA 22). As frações não adsorvidas na matriz foram eluídas com tampão tetraborato de sódio, 50 mM, pH 7,5, as frações protéicas adsorvidas foram eluídas com HCl 1 Mm, em fluxo constante de 2 mL/min, e a densidade óptica foi monitorada a 280 nm. As frações protéicas foram subsequentemente dialisadas contra tampão tetraborato de sódio, 50 mM, pH 7,5, e submetidas aos ensaios para determinação da atividade inibitória sobre a atividade catalítica da tripsina, onde foi detectado, aproximadamente, 100 % de inibição. As frações ativas foram reunidas e, denominada JB14Af.

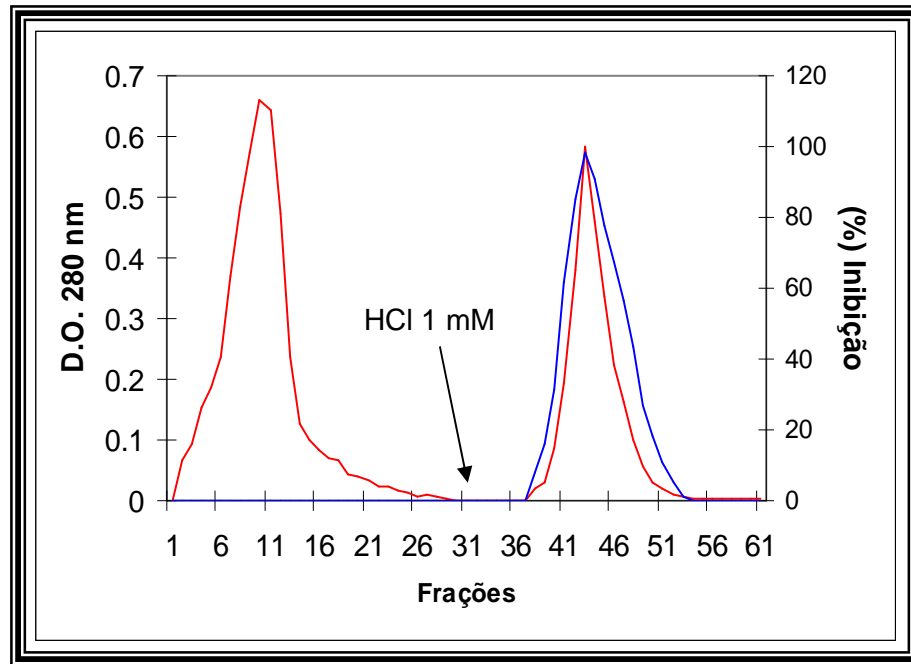


FIGURA 22: Perfil de eluição de JB14 em Tripsina-Sepharose: JB14 (13 mg de proteínas) foi aplicada a coluna de afinidade previamente equilibrada com tampão tetraborato de sódio, 50 mM, pH 7,5. As frações protéicas de 2 mL foram eluídas em fluxo constante de 0,5 mL/min, e a densidade óptica medida a (-) 280 nm. As frações adsorvidas a matriz foram eluídas com HCl 1 mM e a atividade anti-trípica (-) foi determinada usando 100 μ L de cada fração. A hidrólise do BApNA foi monitorada a 410 nm. As frações com atividade antrípica foram reunidas e denominadas de JB14Af.

5.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de JB14Af

A fração protéica, denominada JB14Af, proveniente de cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose, foi submetida à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna semi-preparativa de fase reversa C-18. Quatro frações protéicas foram observadas (FIGURA 23) e denominadas de JB1, JB2, JB3 e JB4. A fração protéica, denominado JB1, mostrou-se mais hidrofílica em comparação com JB2, JB3 e JB4. JB1 foi eluído aos 18 min quando a concentração do solvente B atingiu 43,00 % e 25,00 % de acetonitrila, JB2 aos 40 min, quando a concentração do solvente B atingiu 68,00% e 40,80 % de acetonitrila, JB3 e JB4 foram eluídos aos 43 e 47 min com 71,00 e 78,00% do solvente B, correspondendo a 42,60 e 46,80% de acetonitrila, respectivamente. As frações protéicas obtidas foram liofilizadas e, subsequentemente, submetidas a ensaios para a determinação da atividade inibitória sobre a atividade catalítica da tripsina, onde foi observado que essas frações inibiram a tripsina em mais de 80%.

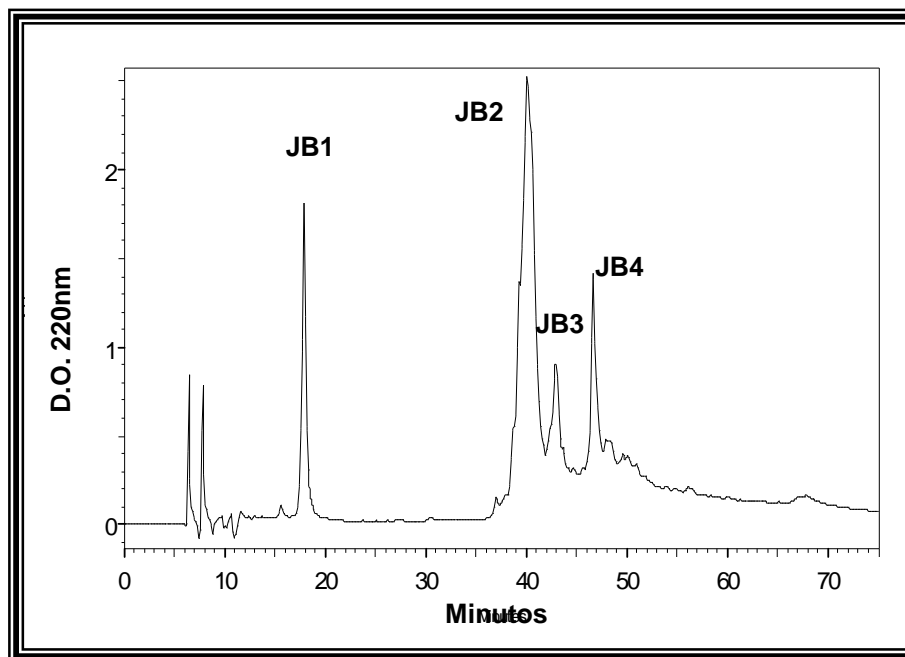


FIGURA 23: Perfil cromatográfico de JB14Af em CLAE (coluna semi-preparativa C18 Vydac - 2,2 x 25,0 cm): Solvente A (TFA 0,1%/H₂O) e B (ACN 60%/TFA 0,09%/H₂O); Cerca de 6 mg de proteínas (JB14AF) foram aplicadas em gradiente de: 5 a 35% B – 10 min; 35 a 60% B – 25 min; 60 a 68% B – 5 min; 68 a 88%B – 20 min; 88 a 95%B – 2 min; 95%B – 10 min; 95 a 5% B – 2 min e 5% B – 1 min. Fluxo: 9 mL/min; Densidade óptica 220. nm. Frações protéicas obtidas de CLAE (JB1, JB2, JB3 e JB4) com atividade anti-trípica, eluídas com 25,00, 40,80, 42,60 e 46,80% de ACN, respectivamente.

5.1.4 Determinação do grau de pureza

As frações purificadas foram analisadas em coluna analítica de fase reversa C-18 (0,46 x 25,0 cm) para determinação de seus graus de pureza. JB1 foi eluído como um pico predominante aos 17 min (FIGURA 24) com, aproximadamente, 52,00% do solvente B e 31,20% de ACN com grau de pureza de 89,61%. A FIGURA 25 mostra o perfil de eluição de JB2 aos 16 min de cromatografia quando a concentração do solvente B atingiu 61,00% com 36,60% de ACN e o grau de pureza, correspondente, ao pico majoritário foi avaliado em 86,35%. A análise cromatográfica de JB3 (FIGURA 26) mostrou a presença de duas frações protéicas que foram denominadas JB3-1 e JB3-2. JB3-1 foi eluído aos 16 min quando a concentração do solvente B atingiu 68,00% com 40,80% de ACN e JB3-2 foi eluído aos 19 min quando a concentração do solvente B atingiu aproximadamente 70,00% com 42,00% de ACN. O grau de purificação determinado para essas frações foram 60% para JB3-1 e 40% para JB3-2. A FIGURA 27 mostra o perfil de eluição da fração JB4. JB4 foi eluído aos 17 min quando a concentração do solvente B atingiu 87,00% com 52,2% de ACN. O grau de purificação determinado para essa fração foi 98,82%. A atividade catalítica da tripsina foi inibida em 88,00%, 97,00%, 84,00%, 89,00% e 97,00% por JB1, JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4, respectivamente.

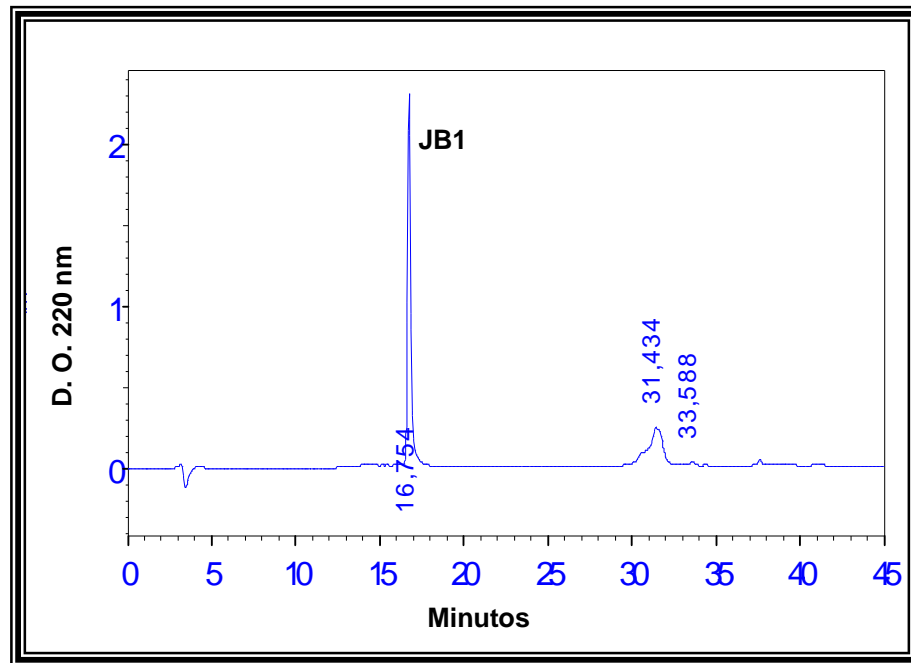


FIGURA 24: Análise de JB1 em CLAE (coluna analítica C18 Vydac - 0,46 x 25,0 cm): Solvente A (TFA 0,1%/ H₂O) e B (ACN 60%/TFA 0,09%/H₂O); cerca de 250 µg de proteínas foram aplicadas em gradiente de: 5% B – 5 min; 5 a 45% B – 5 min; 45 a 65% B – 20 min; 65 a 95% B – 2 min; 95%B – 10 min; 95 a 5% B – 2 min e 5% B – 1 min. Fluxo: 1 mL/min; Densidade óptica 220 nm. JB1 foi eluído aos 17 min com 31,20% de ACN e pureza de 89,61%.

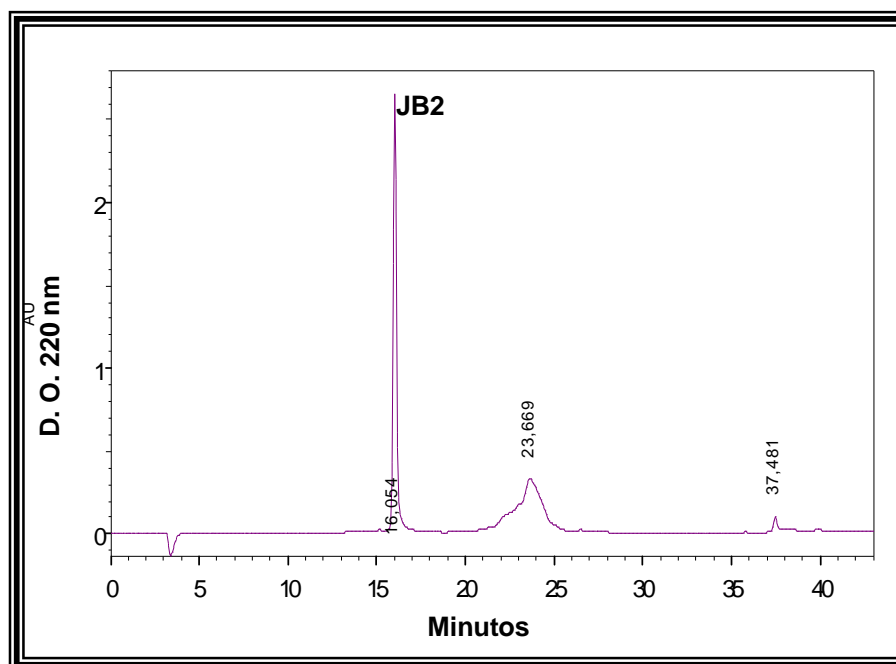


FIGURA 25: Análise de JB2 em CLAE (coluna analítica C18 Vydac - 0,46 x 25,0 cm): Solvente A (TFA 0,1%/H₂O) e B (ACN 60%/TFA 0,09%/H₂O); cerca de 250 µg de proteínas foram aplicadas em gradiente: 5% B – 5 min; 5 a 55% B – 5 min; 55 a 75% B – 20 min; 75 a 95% B – 2 min; 95% B – 10 min; 95 a 5% B – 2 min e 5% B – 1 min. Fluxo: 1 mL/min; Densidade óptica 220 nm. JB2 foi eluído aos 16 min com 36,60% de ACN e pureza de 86,35%.

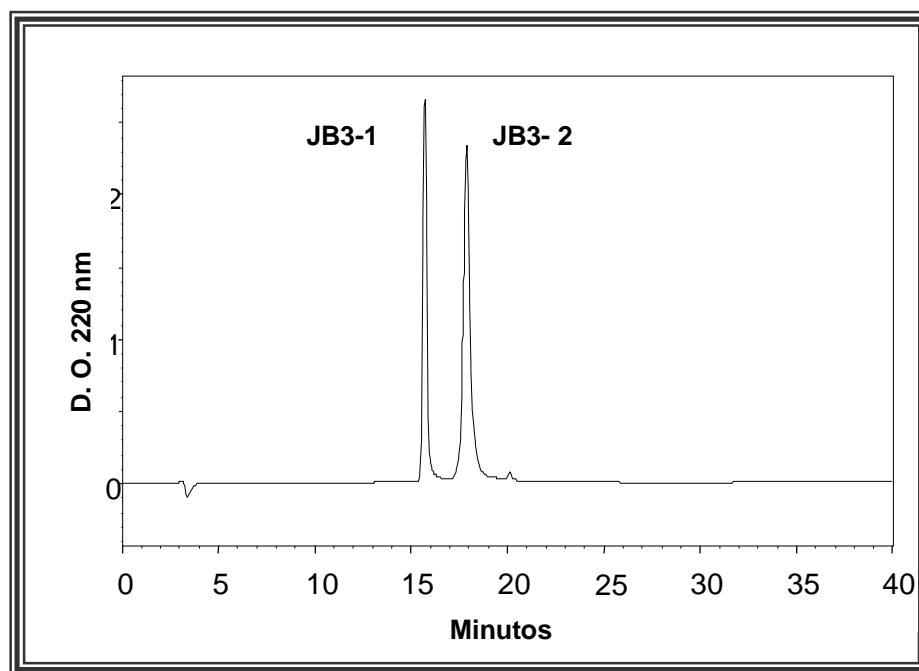


FIGURA 26: Análise de JB3 em CLAE (coluna analítica C18 Vydac - 0,46 x 25,0 cm): Solvente A (TFA 0,1%/H₂O) e B (ACN 60%/TFA 0,09%/H₂O); cerca de 250 µg de proteínas foram aplicadas em gradiente: 5% B – 5 min; 5 a 62% B – 5 min; 62 a 77% B – 15 min; 77 a 95% B – 2 min; 95%B – 10 min; 95 a 5% B – 2 min e 5% B – 1 min. Fluxo: 1 mL/min; Densidade óptica 220 nm. JB3-1 foi eluído aos 16 min com 40,08% de ACN e pureza de 60,00%. JB3-2 foi eluído aos 19 min com 42,00% ACN e pureza de 40,00%.

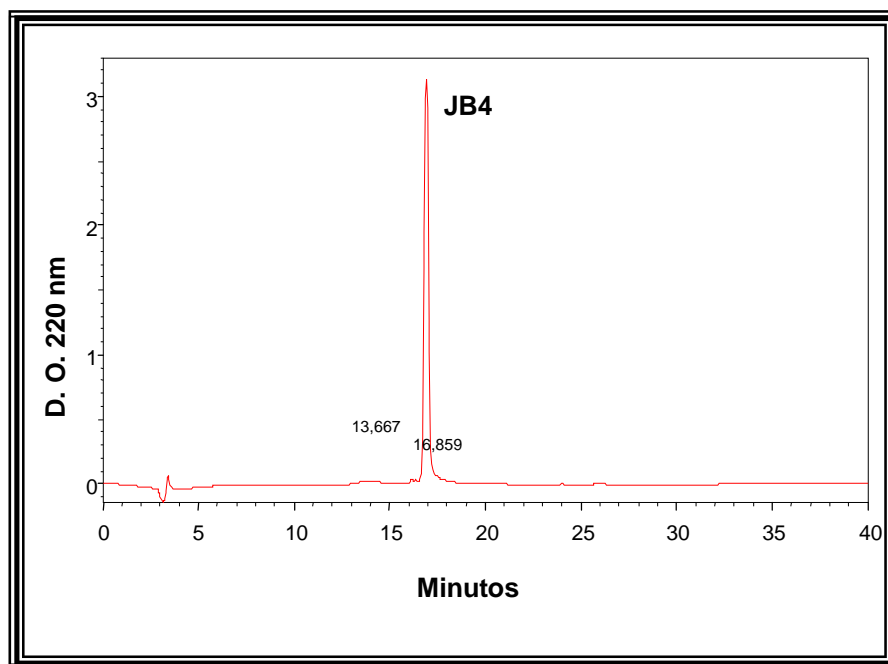


FIGURA 27: Análise de JB4 em CLAE (coluna analítica C18 Vydac - 0,46 x 25,0 cm): Solvente A (TFA 0,1%/H₂O) e B (ACN 60%/TFA 0,09%/H₂O); cerca de 250 µg de proteínas foram aplicadas em gradiente: 5% B – 5 min; 5 a 80% B – 5 min; 80 a 100% B – 20 min; 100% B - 10 min; 100 a 5% B – 2 min e 5% B – 1 min. Fluxo: 1 mL/min; Densidade óptica 220 nm. JB4 foi eluído aos 17 min com 52,20% ACN e pureza de 98,82%.

5.1.5 Análise dos inibidores purificados por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Com o intuito de monitorar a purificação dos inibidores de sementes de Jurema Branca foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a 15% contendo SDS (FIGURA 28). A análise do extrato bruto (EB) e da fração JB14 mostrou a presença de inúmeras bandas protéicas com massas moleculares aparentes variando entre 10,00 e 116,00 kDa. Na fração protéica obtida por cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose (JB14Af) foi observada a presença de um menor número de bandas protéicas com massas moleculares aparentes variando entre 19,00 e 24,00 kDa, sendo que a banda protéica mais abundante migrou como uma proteína de cerca de 19,00 kDa. A análise da fração JB1 em gel de poliacrilamida na ausência de agente redutor revelou a presença de uma única banda protéica com massa molecular aparente de 19,00 kDa. Resultado similar foi observado para as frações JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4 (FIGURA 29) que migraram como proteínas com massas moleculares aparente entre 18,00 e 20,00 kDa.

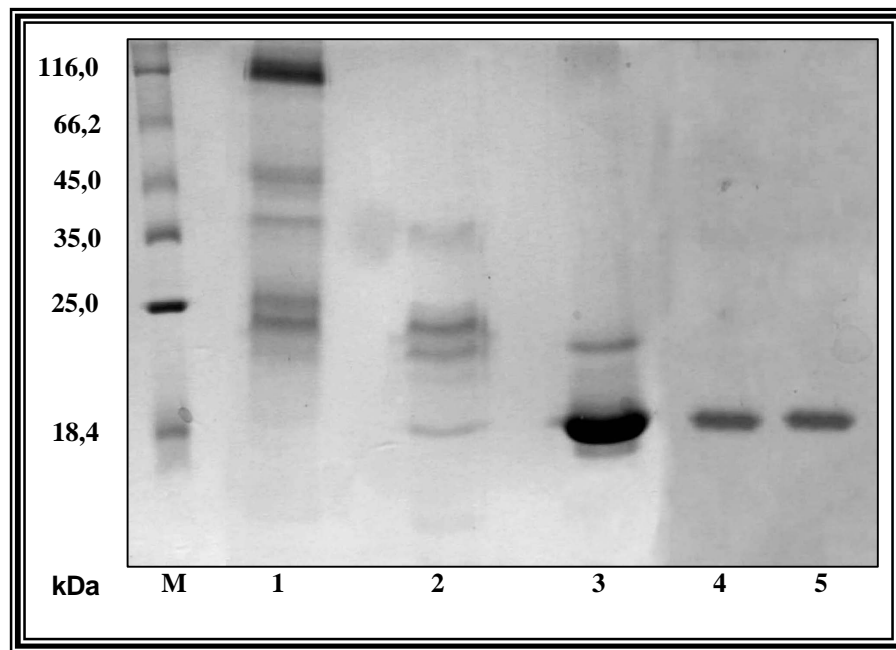


FIGURA 28: Eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) das frações protéicas de Jurema Branca. M – padrão de massa molecular: galactosidase (116,00 kDa), albumina sérica bovina (66,20 kDa), ovalbumina (45,00 kDa), lactato desidrogenase (35,00 kDa), endonuclease de restrição (25,00 kDa), lactoalbumina (18,40 kDa), e lisozima (14,40 kDa). Cerca de 10 µg de proteínas de cada fração foram aplicadas no gel: 1, EB, extrato bruto; 2, JB14 (fração protéica proveniente do tratamento do EB com TCA); 3, JB14Af (fração de Tripsina-Sepharose); 4, JB1 sem β-Me e 5, JB1 com β-Me.

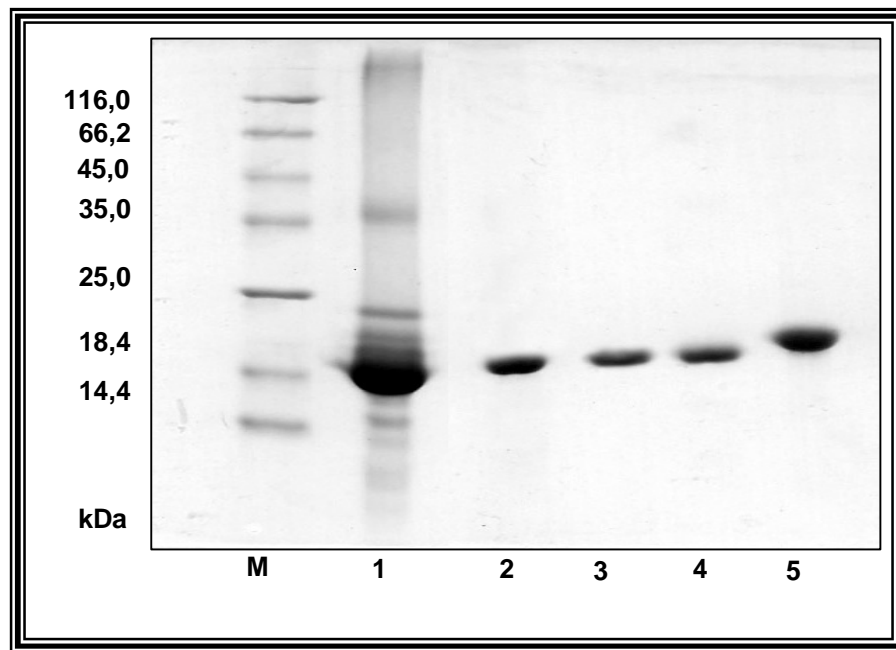


FIGURA 29: SDS-PAGE (15%) de JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4 de sementes de Jurema Branca. M – padrão de massa molecular: galactosidase (116,00 kDa), albumina serica bovina (66,20 kDa), ovalbumina (45,00 kDa), lactato desidrogenase (35,00 kDa), endonuclease de restrição (25,00 kDa), lactoalbumina (18,40 kDa), e lisozima (14,40 kDa). Cerca de 10 μ g de proteínas de cada fração foram aplicadas no gel: 1, JB14 (fração protéica proveniente do tratamento do EB com TCA); 2, JB2; 3, JB3-1; 4, JB3-2 e 5, JB4 sem β -Me.

5.2 Avaliação do grau de pureza das frações cromatográficas

As etapas utilizadas no processo de purificação dos inibidores de sementes de Jurema Branca estão sumarizadas na TABELA 7. Analisando-se esta tabela observou-se que as estratégias utilizadas para purificação dos inibidores foram bastante eficientes. O extrato bruto (EB), obtido na primeira etapa do processo de purificação dos inibidores de sementes de Jurema Branca, serviu como referência para as demais frações protéicas. O valor de purificação 1 e um rendimento de 100% foram atribuídos ao EB. A purificação das demais frações foi calculada como sendo a razão entre sua atividade específica e a atividade específica do EB. A percentagem de rendimento das demais frações foi calculada com base na razão entre a sua atividade inibitória e a atividade inibitória do extrato bruto multiplicado por 100. A atividade específica foi calculada com base na razão entre a atividade inibitória da fração obtida e proteína total da mesma fração. A tabela de purificação mostra que JB1 foi purificado 217,62 vezes com recuperação de 4,66%, JB2 foi purificado 176,49 vezes com rendimento de 3,65%, JB3-1 foi purificado 106,51 vezes com recuperação de 1,84%, JB3-2 foi purificado 156,10 vezes com rendimento de 1,79% e JB4 foi purificado 139,21 vezes com rendimento de 2,07%.

TABELA 7 - Tabela de purificação

Frações	Atividade inibitória total	Proteína total (mg)	Atividade específica (UI/mg proteína)	Purificação (x)	Rendimento (%)
EB	118560,00	1041,20	113,87	1	100
JB14	80800,00	18,00	4488,89	39,42	68,15
JB14Af	8190,00	1,76	4653,41	40,87	6,91
JB1	5526,00	0,22	24780,27	217,62	4,66
JB2	4321,00	0,21	20097,67	176,49	3,65
JB3-1	2183,00	0,18	12127,78	106,51	1,84
JB3-2	2133,00	0,12	17775,00	156,10	1,79
JB4	2133,00	0,15	15851,61	139,21	2,07

EB, extrato bruto; JB14, fração protéica proveniente do tratamento do EB com TCA 14%; JB14Af, fração protéica obtida de afinidade em Tripsina-Sepharose; JB1, JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4, inibidores purificados de sementes de Jurema Branca em CLAE.

Uma unidade de inibidor foi definida como a quantidade de inibidor que diminui a atividade da enzima em 0,01 da absorbância a 410 nm.

5.3 Caracterização bioquímica dos inibidores de sementes de Jurema Branca

5.3.1 Análise dos inibidores purificados por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de agente redutor

Com o intuito de determinar a presença ou não de subunidades nos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca, foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida a 15%, em condições desnaturantes, na presença de beta-mercaptoetanol. De acordo com a FIGURA 26, foi possível visualizar a presença de uma única banda protéica correspondente a cada inibidor purificado (JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4) com massas moleculares aparentes entre 19,00 e 20,00 kDa similar ao observado na FIGURA 30. Esses resultados sugerem que os inibidores purificados de sementes de Jurema Branca são proteínas constituídas por uma cadeia polipeptídica.

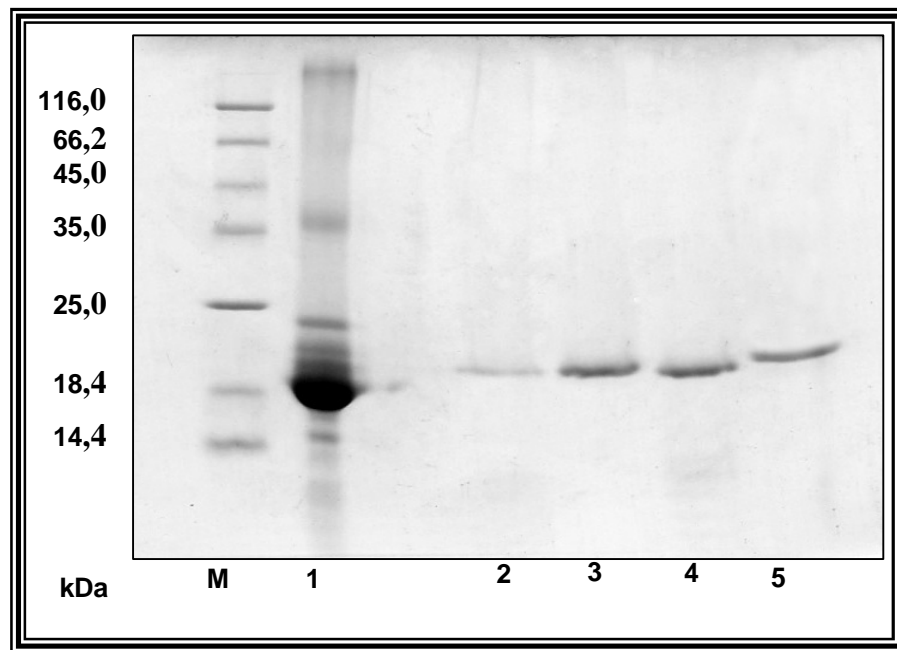


FIGURA 30: Eletroforese em gel de Poliacrilamida (15%) dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca na presença de β -Me. M – padrão de massa molecular: galactosidase (116,00 kDa), albumina serica bovina (66,20 kDa), ovalbumina (45,00 kDa), lactato desidrogenase (35,00 kDa), endonuclease de restrição (25,00 kDa), lactoalbumina (18,40 kDa), e lisozima (14,40 kDa). Cerca de 10 μ g de proteínas de cada fração foram aplicadas no gel: 1, JB14 (fração protéica proveniente do tratamento do EB com TCA 14%); 2, JB2; 3, JB3-1; 4 JB3-2 e 5, JB4 obtidas de CLAE e tratadas com beta-mercaptoetanol.

5.3.2 Determinação das massas moleculares dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca por MALDI-TOF e eletroforese em gel de poliacrilamida

Com objetivo de determinar as massas moleculares dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca, as frações protéicas correspondentes aos inibidores JB1, JB3-1 e JB3-2 foram submetidas a análise por espectrometria de massa. Os resultados obtidos mostraram massas moleculares de 19.70 kDa para JB1 e 19.69 kDa para JB3-1 e JB3-2 como observados nas FIGURAS 31 e 32. Os três picos observados em cada gráfico representam três diferentes cargas da mesma proteína e o fato de todas apresentarem o pico de dupla carga mais intenso que o de carga única, sugere que elas são proteínas catiônicas com pI bastante básico.

As FIGURAS 33 e 34 mostram a determinação das massas moleculares de JB2 e JB4, respectivamente, pela mobilidade eletroforética indicando que JB2 e JB4 têm massas moleculares de 18,08 e 20,85 kDa, respectivamente

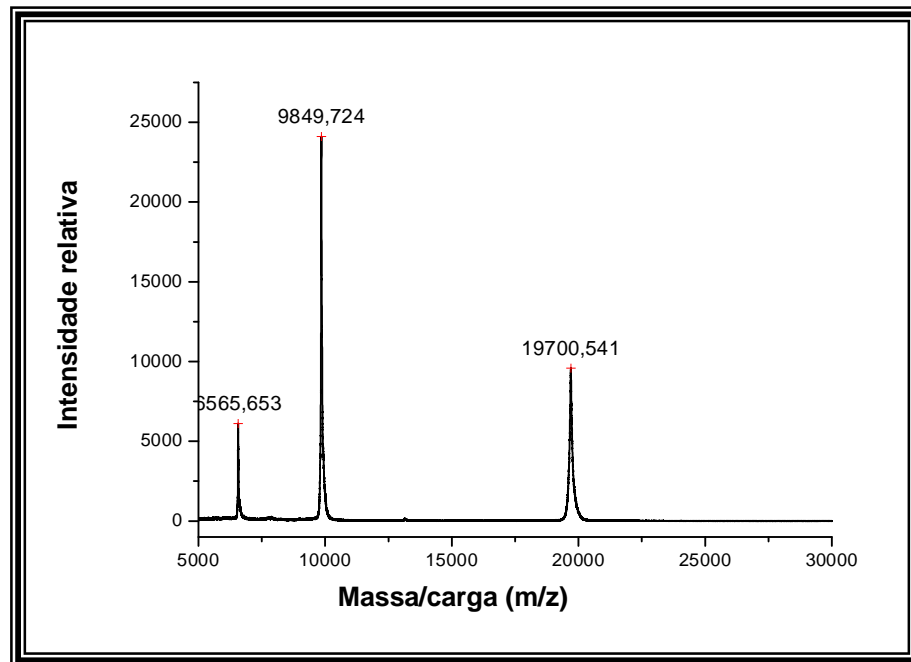


FIGURA 31: Análise da massa molecular de JB1 por MALDI-TOF. Os três picos representam três diferentes cargas de JB1: uma carga (6,56 kDa), duas cargas (9,84 kDa) e três cargas (19,70 kDa). A massa molecular determinada para JB1 foi 19,70 kDa.

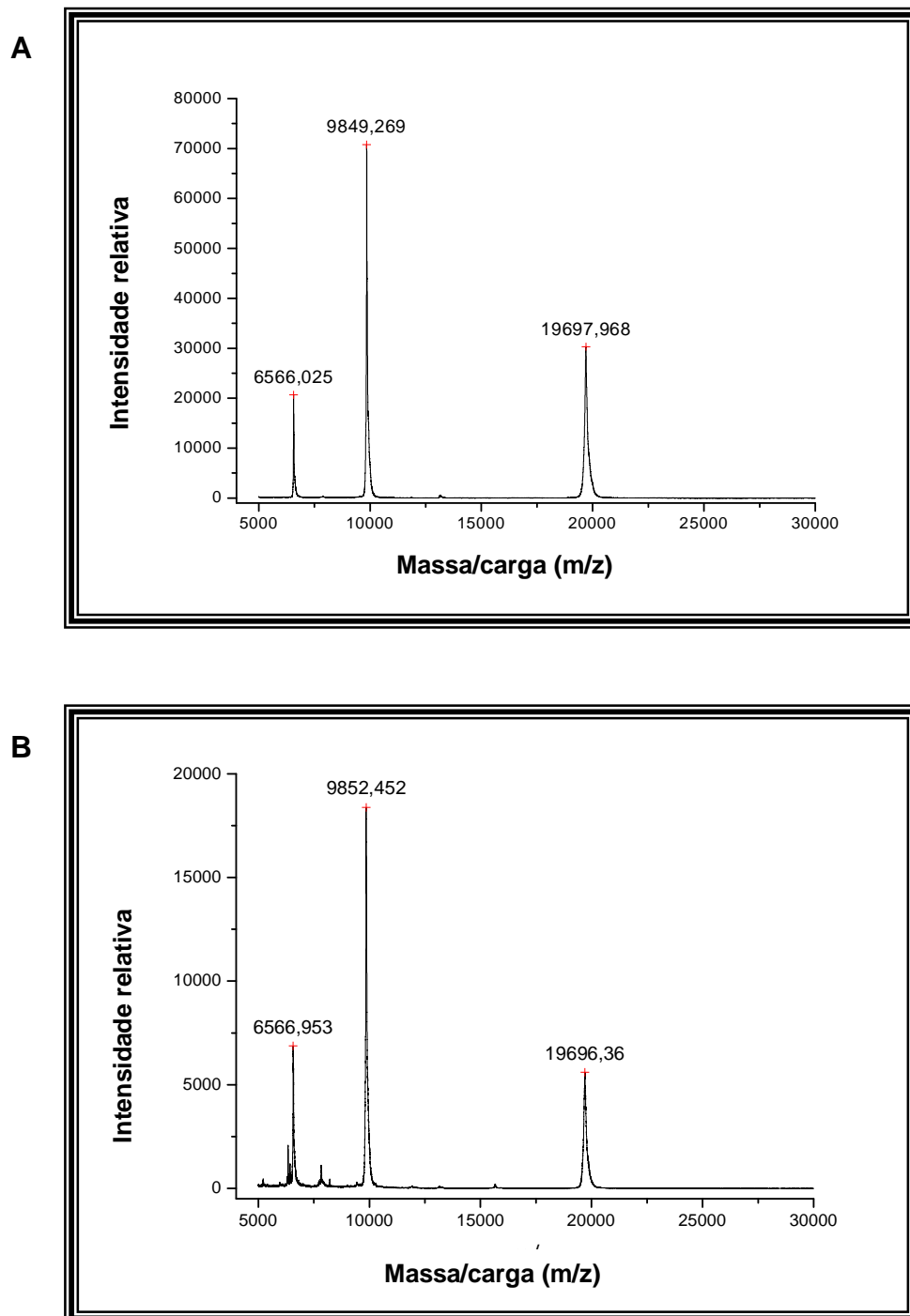


FIGURA 32: Análise da massa molecular de JB3-1 JB3-2 por MALDI-TOF. (A) Os três picos representam três diferentes cargas de JB3-1: Uma carga (6,56 kDa), duas cargas (9,84 kDa) e três cargas (19,69 kDa) e (B) . Os três picos representam três diferentes cargas de JB3-2: Uma carga (6,56 kDa), duas cargas (9,85 kDa) e três cargas (19,69 kDa).

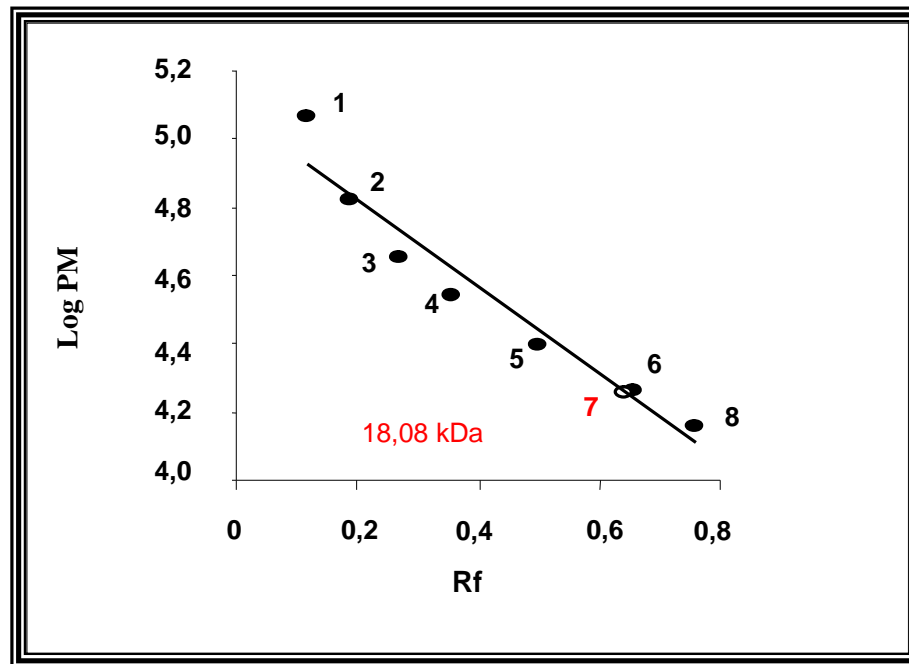


FIGURA 33: Determinação da massa molecular de JB2 por SDS-PAGE. Curva de calibração dos padrões eletroforéticos: 1, β -galactosidase (116,00 kDa); 2, albumina de soro bovino (66,20 kDa); 3, ovalbumina (45,00 kDa); 4, lactato desidrogenase (35,00 kDa); 5, enzima de restrição de *E. coli* (25,00 kDa); 6, β -lactoglobulina (18,4 kDa); 7, JB2 (18,08 kDa) e 8, lisozima (14,40 kDa).

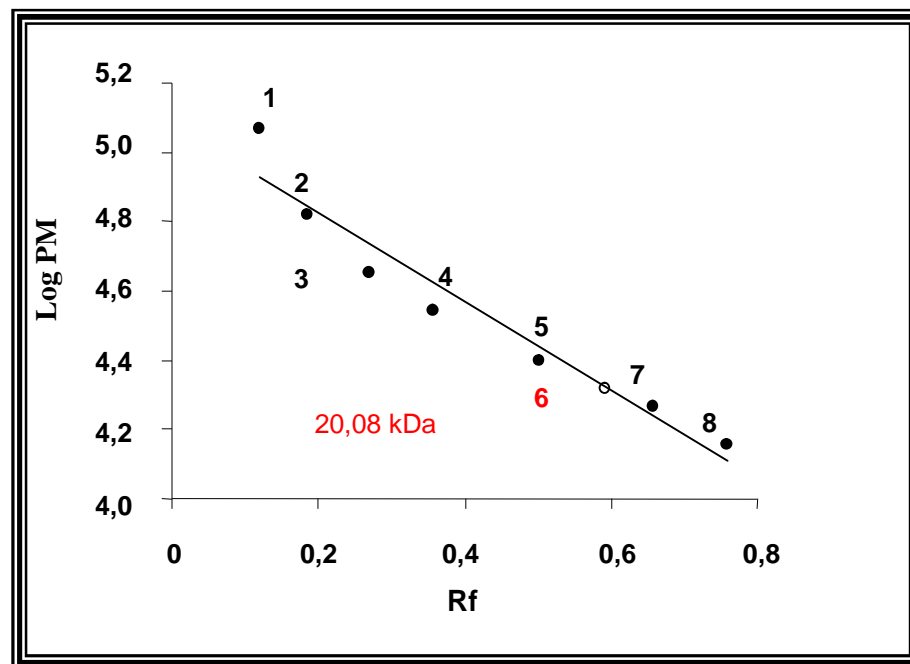


FIGURA 34: Determinação da massa molecular de JB4 por SDS-PAGE. Curva de calibração dos padrões eletroforéticos: 1, β -galactosidase (116,00 kDa); 2, albumina de soro bovino (66,20 kDa); 3, ovalbumina (45,00 kDa); 4, lactato desidrogenase (35,00 kDa); 5, enzima de restrição de *E. coli* (25,00 kDa); 6, JB4 (20,80 kDa); 7, β -lactoglobulina (18,40 kDa); e 8, lisozima (14,40 kDa).

5.4 Alinhamento e análise da seqüência N-terminal

As seqüências N-terminal dos inibidores de sementes de Jurema Branca, JB1 (20 aminoácidos), JB3-1 (15 aminoácidos) e JB3-2 (14 aminoácidos) apresentaram cerca de 35% de similaridade (FIGURA 35) e a análise comparativa das seqüência N-terminal de JB3-1 e JB3-2 apresentou aproximadamente 87% de similaridade diferindo apenas em um resíduo de aminoácido na posição 5. Os resíduos de valina (V2 e V3), leucina (L4), serina (S5) e glutamina (Q9) encontram-se conservados nas seqüências dos três inibidores.

A FIGURA 35 mostra o alinhamento de JB1 com inibidores de tripsina da família Kunitz de sementes de leguminosas. A seqüência N-terminal de JB1 apresentou 40% de similaridade com o inibidor de tripsina de sementes de leucena, *Leucaena leucocephala* (LITI) e feijão alado, *P. tetragonolobus* (PtTI), e 60% de similaridade com a seqüência do inibidor de tripsina de sementes de copaíba-verdadeira, *Copaifera langsdorffii* (CITI). De acordo com o alinhamento, pode se observar à presença de um resíduo de tirosina (Y16) e um de leucina (L19) conservado em todas as seqüências N-terminal neste trabalho analisadas. O alinhamento comparativo de JB3-1 e JB3-2 com outros inibidores de tripsina da família Kunitz de sementes de outras leguminosas da subfamília Mimosoideae. A seqüência N-terminal de JB3-1 mostrou similaridade de 80% com inibidor de tripsina de sementes de acácia, *Acacia confusa* (AcTI) e tamboril, *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI), 73% de similaridade com inibidores de sementes de *P. juliflora* (PjTI), *A. pavonina* (ApTI), e *L. leucocephala* (LITI). Similaridade de 80% foi observada entre a seqüência de JB3-2 e as de AcTI, EcTI, LITI, e de 73% com PjTI e ApTI. De acordo com o alinhamento na FIGURA 35, foi observado a presença de resíduos de aminoácidos fortemente conservados em todas as seqüências analisadas como glicina (G8), asparagina (N13) e glicina (G14).

Os resultados dos alinhamentos das seqüências N-terminal obtidos de JB1, JB3-1 e JB3-2 com inibidores de tripsina de sementes de leguminosas, da família Kunitz, confirmam que os inibidores de tripsina aqui purificados, são os mais novos membros de inibidores de tripsina da família Kunitz.

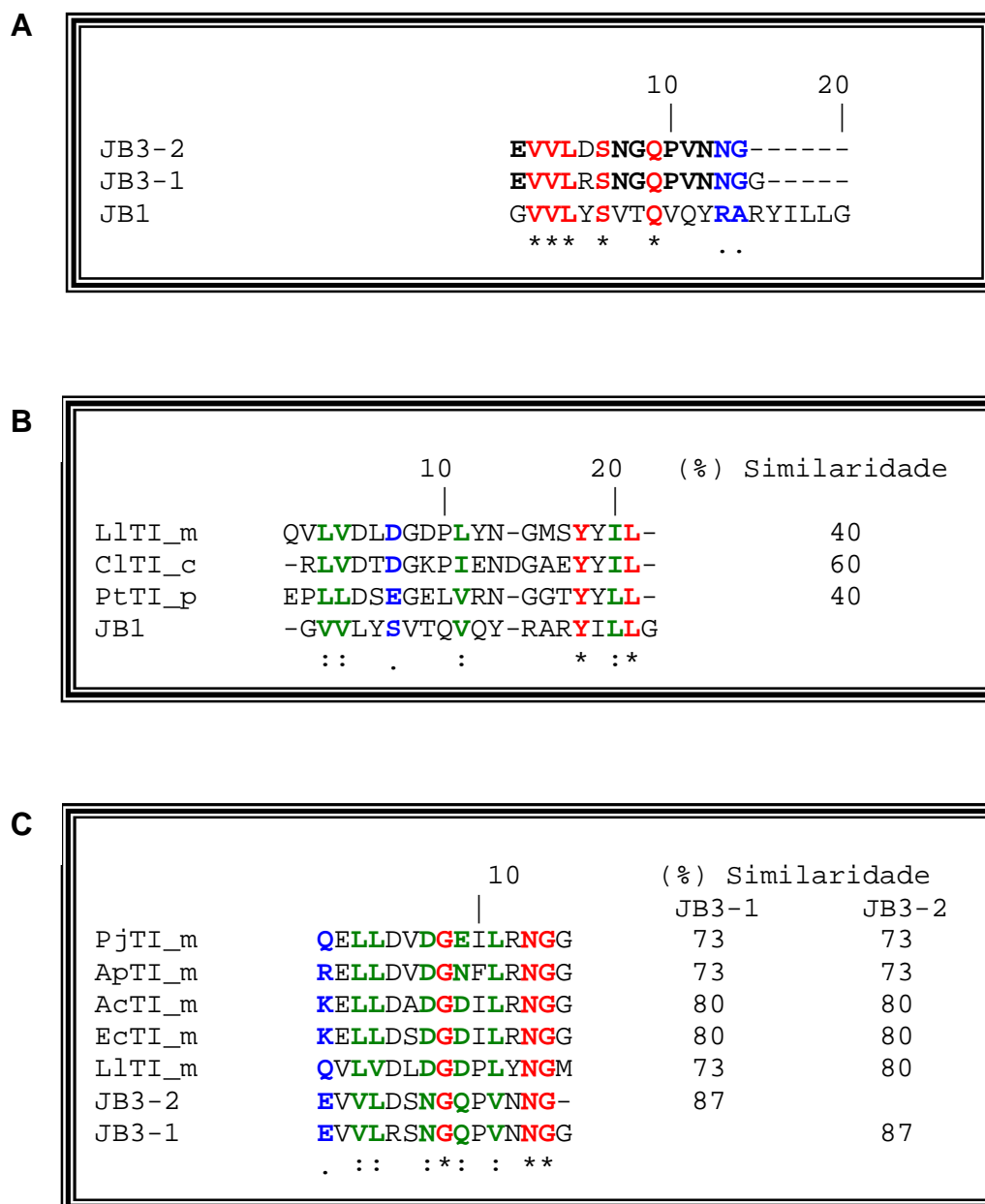


FIGURA 35: Alinhamento das seqüências N-terminal. (A) inibidores de tripsina purificados de sementes de Jurema Branca, (B) alinhamento de JB1 com inibidores da família Kunitz das três subfamílias de leguminosas e (C) alinhamento de JB3-1 e JB3-2 com inibidores da família Kunitz de leguminosas da subfamília mimosoideae. (*), Resíduos de aminoácidos conservados; (:),resíduos com forte similaridade e (.) resíduos com fraca similaridade. *Acacia confusa* (AcTI, gi: 166234, NCBI), *Enterolobium contortisiliquum* (EcTI, Batista *et al.*, 1996), *Prosopis juliflora* (PjTI, gi: 243386, NCBI), *Adenantha pavonina* (ApTI, gi: 225058, NCBI) *Leucaena leucocephala* (LITI, gi: 18202442, NCBI), *Copaifera langsdorffii* (CITI, gi: 49258682, NCBI), e *Psophocarpus tetragonolobus* (PtTI, gi: 124938, NCBI). m, Mimosoideae; c, Caesalpinoideae; p, Papilionoideae.

5.5 Estabilidade em diferentes pHs

A resistência dos inibidores purificados de Jurema Branca em diferentes pHs foi testada incubando-se o inibidor em soluções tampão com pHs variando de 2 a 12, por 30 min, a 37 °C. Nesses ensaios, verificou-se que a atividade de JB1 permaneceu praticamente inalterada quando testado na faixa de pH entre 2-8. No entanto, cerca de 20,00% de sua capacidade inibitória foi perdida em pH alcalino (pH 11 e 12). A estabilidade de JB2 em diferentes pHs. A resistência de JB2 em diferentes pHs foi similar ao observado para JB1. Praticamente não houve perda de atividade inibitória na faixa de pH entre 2-8. No entanto, redução de cerca de 10,00% de sua capacidade inibitória foi observado em pH alcalino (pH 11-12) como mostrado na FIGURA 36.

A FIGURA 37 mostra que JB3-1 manteve sua atividade inibitória máxima quando testado em variação de pH entre 2-8, mas em pH alcalino sua capacidade inibitória foi reduzida em cerca de 30,00%. A resistência de JB3-2 quando testados, em diferentes pHs foi similar a JB1 e JB2. JB3-2 manteve sua capacidade inibitória máxima (85,00% de inibição), havendo uma redução em cerca de 10,00% em pH alcalino, como mostrado na FIGURA 37.

Na FIGURA 38, observa-se que JB4 manteve sua capacidade inibitória sobre a atividade catalítica de tripsina após pré-incubação por 30 min, a 37 °C, na faixa de pHs testados.

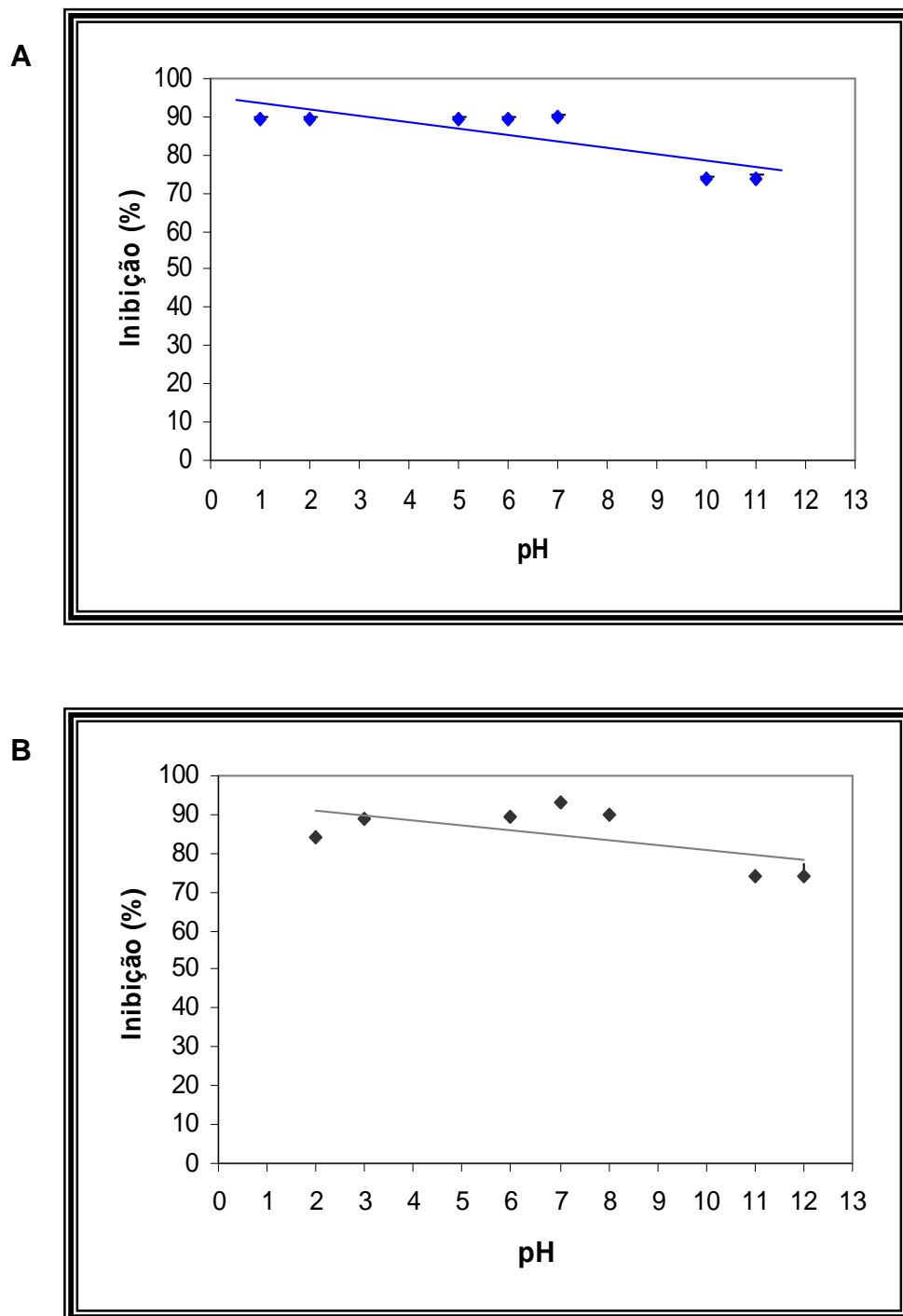


FIGURA 36: Estabilidade de JB1 (A) e JB2 (B) em diferentes pHs. Os inibidores (10 μ g de proteína) purificados foram pré-incubados por 30 min, a 37 $^{\circ}$ C, em diferentes intervalos de pH. A atividade inibitória sobre a tripsina foi determinada usando BAPNA como substrato.

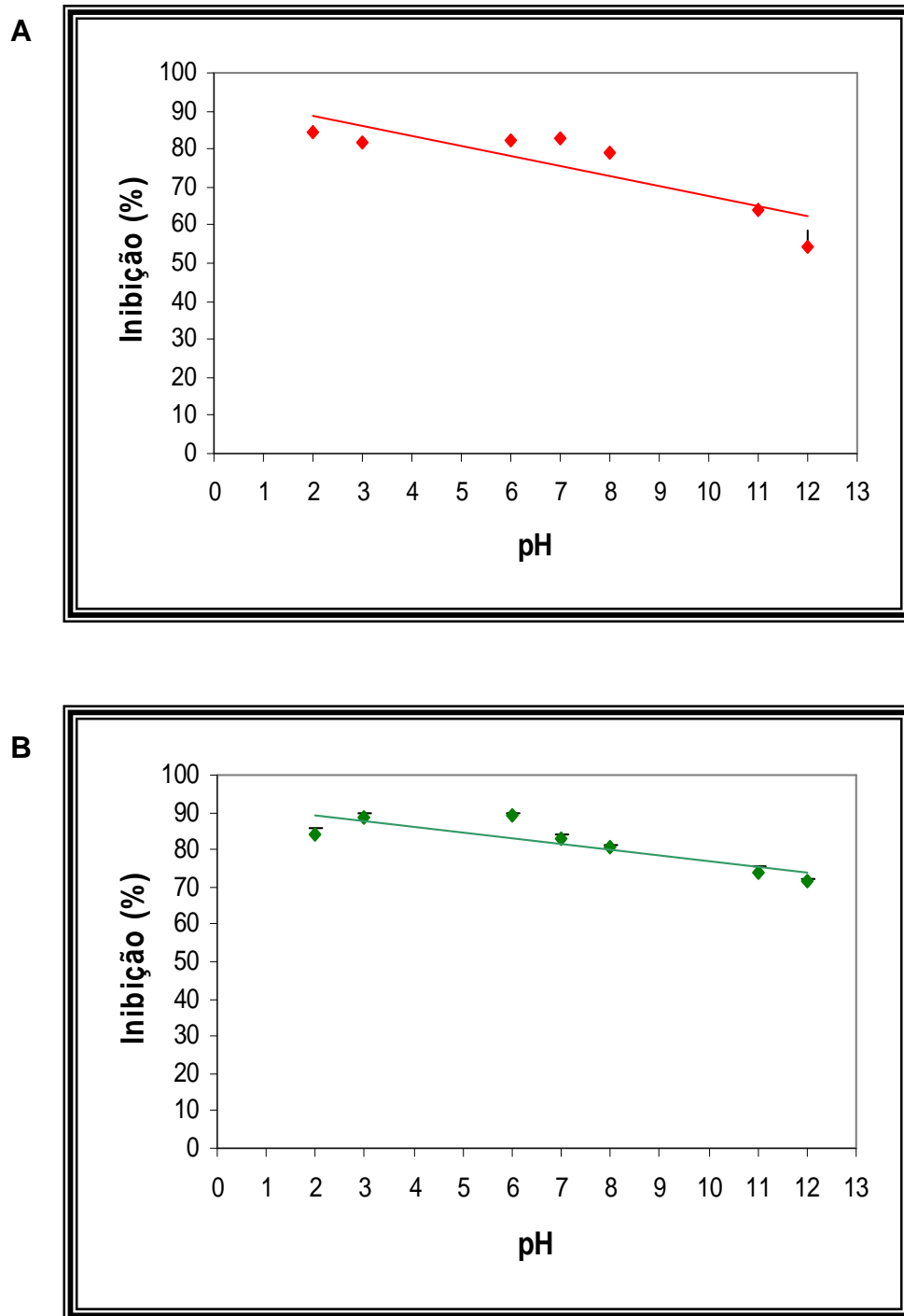


FIGURA 37: Estabilidade de JB3-1 (A) e JB3-2 (B) em diferentes pHs. Os inibidores (10 μg de proteína) purificados foram pré-incubados por 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$ em diferentes intervalos de pH. A atividade inibitória sobre a tripsina foi determinada usando BA_pNA como substrato.

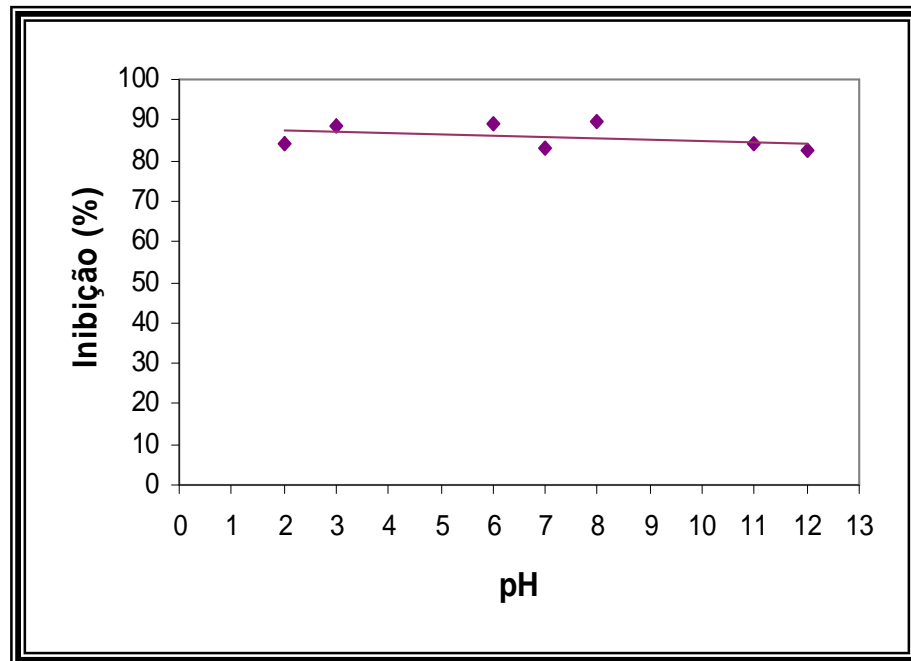


Figura 38: Estabilidade de JB4 em diferentes pHs. O inibidor purificado (10 μ g de proteína) foi pré-incubado por 30 min a 37 $^{\circ}$ C em diferentes intervalos de pH. A atividade inibitória sobre a tripsina foi determinada usando BApNA como substrato.

5.6 Estabilidade térmica

Os inibidores purificados de sementes de Jurema Branca também foram avaliados quanto a sua resistência em diferentes temperaturas (37 a 100 °C). Na FIGURA 39, observa-se que JB1 manteve sua atividade máxima de inibição sobre a atividade catalítica da tripsina (90,00% de inibição) quando testado em temperaturas de 37 e 40 °C. Cerca de 10,00% dessa atividade foi perdida em temperaturas de 60 e 70 °C. A pré-incubação desse inibidor em temperaturas de 90 e 100 °C, por 30 min reduziu sua capacidade inibitória em cerca de 40,00%. A FIGURA 39 mostra também que JB2 manteve sua estabilidade após pré-incubação nas temperaturas testadas, mantendo sua atividade inibitória máxima em mais de 90,00%. A FIGURA 40 mostra a estabilidade térmica de JB3-1 e JB3-2, onde, JB3-1 manteve sua atividade inibitória quando testado em temperaturas de 37, 40, 60, 70 e 90 °C, mas foi observado que a 100 °C sua atividade foi reduzida em cerca de 20,00%, em comparação com sua atividade observada a 37 °C. JB3-2, manteve-se estável em temperaturas de 37, 40, 60 e 70 °C, mas em temperaturas de 90 e 100 °C sua capacidade inibitória foi reduzida em aproximadamente 25,00%. A FIGURA 41 mostra que JB4 manteve sua atividade máxima de inibição sobre a atividade catalítica da tripsina em todas as temperaturas testadas.

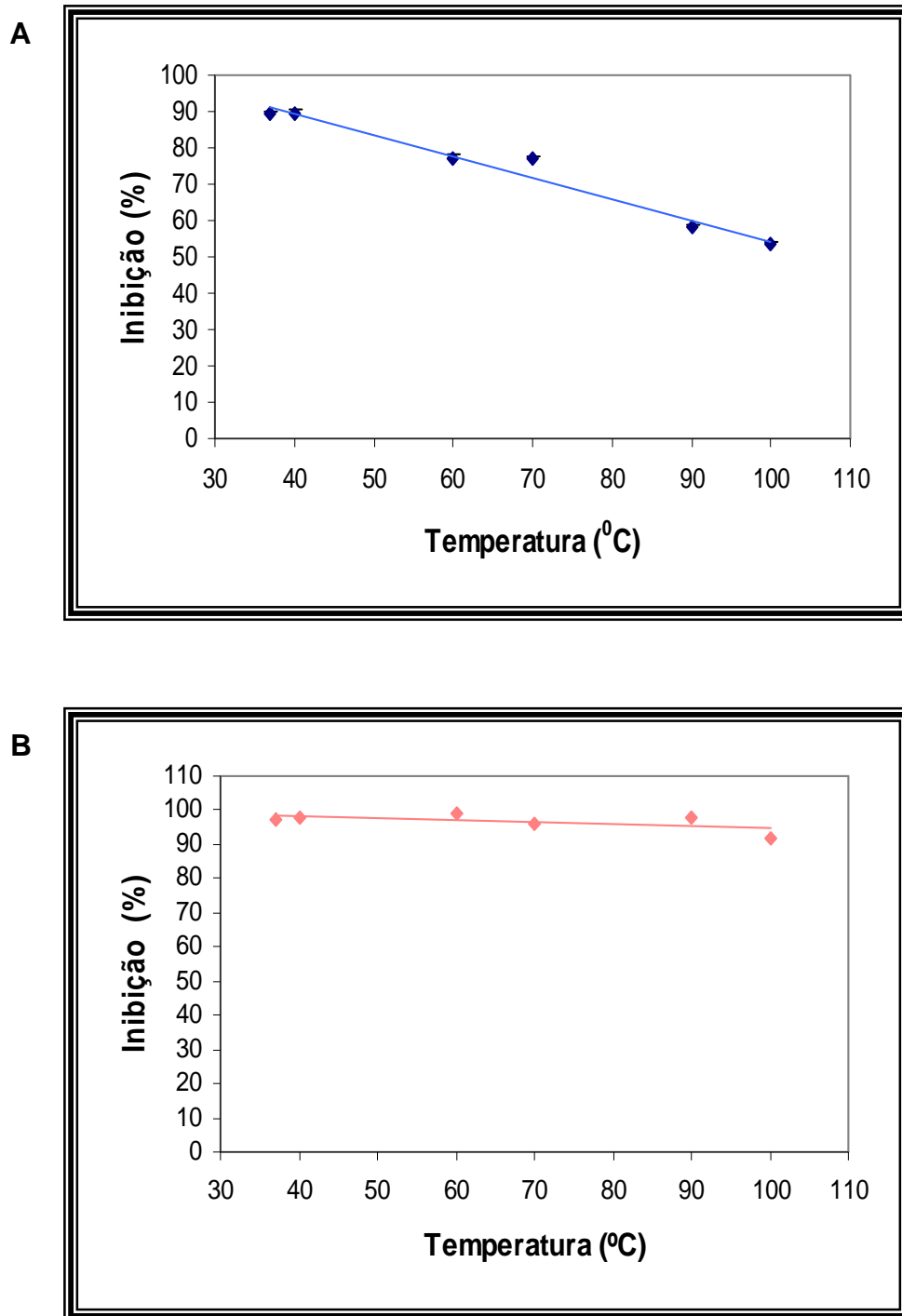


FIGURA 39: Estabilidade térmica de JB1 (A) e JB2 (B). Os inibidores (10 μ g de proteína) foram pré-incubados por 30 min em diferentes temperaturas. A atividade inibitória sobre a tripsina foi determinada usando BA_pNA como substrato.

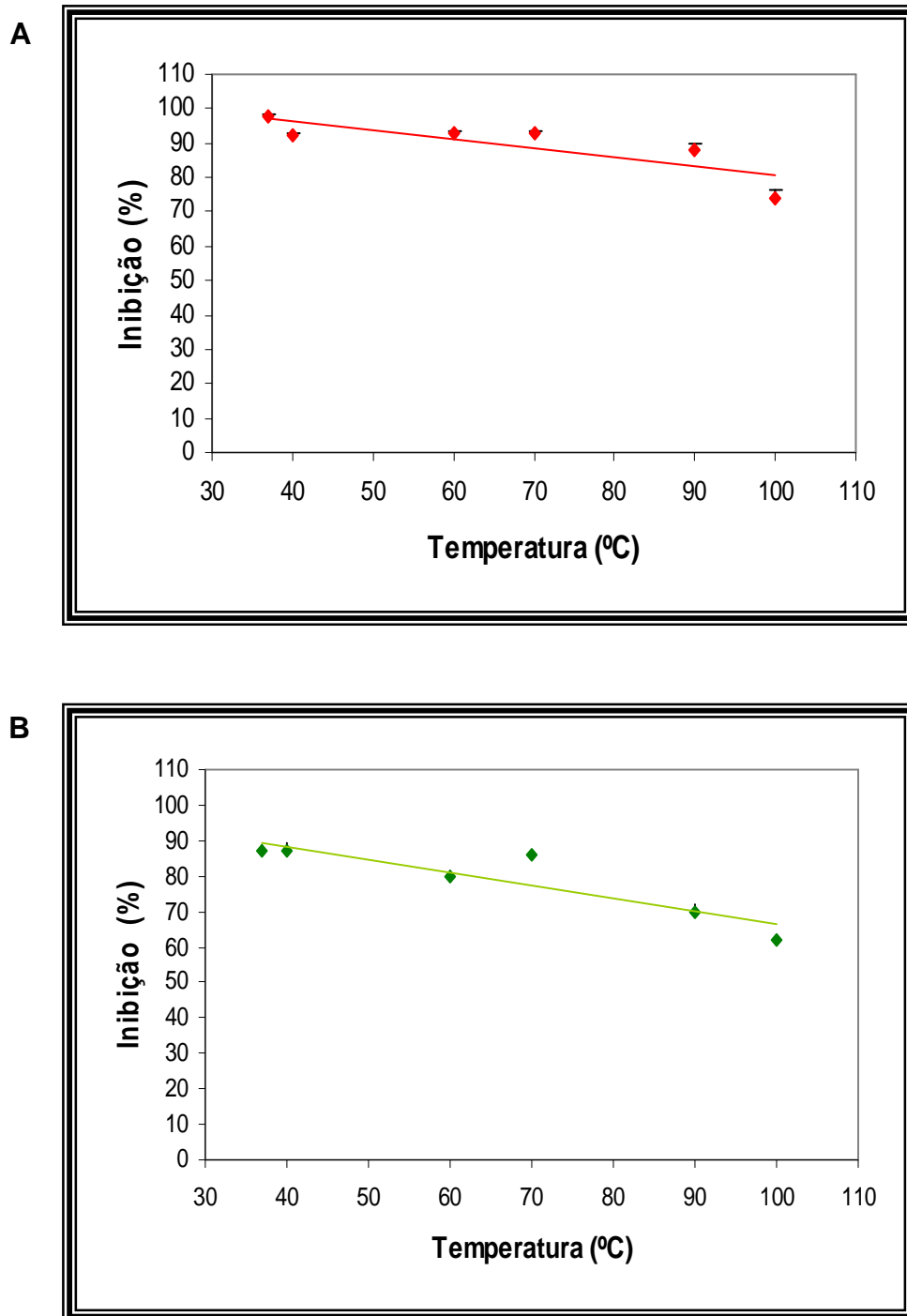


FIGURA 40: Estabilidade térmica de JB3-1 (A) e JB3-2 (B). Os inibidores (10 μg de proteína) foram pré-incubados por 30 min em diferentes temperaturas. A atividade inibitória sobre a tripsina foi determinada usando BApNA como substrato.

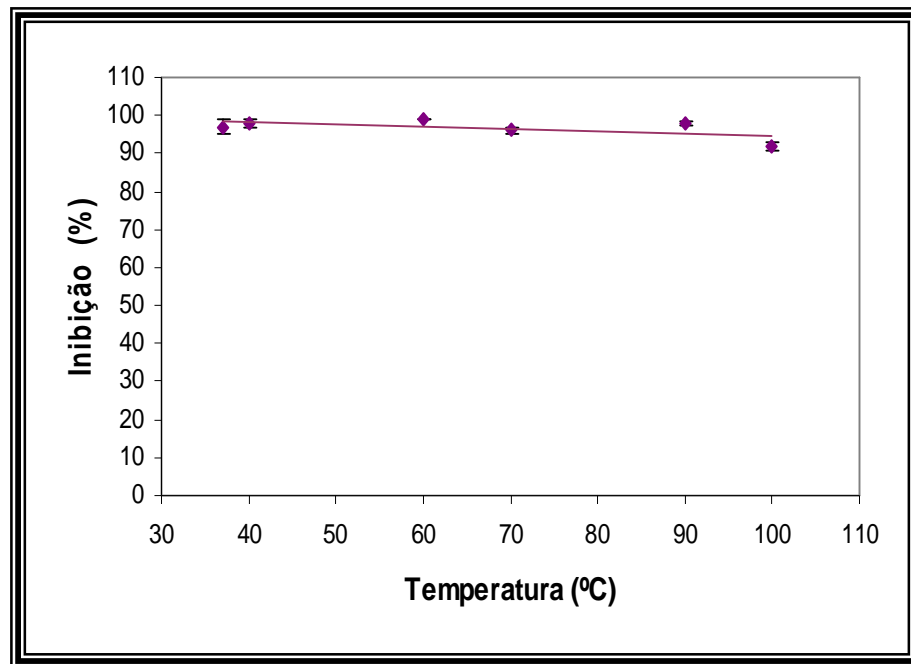


FIGURA 41: Estabilidade térmica de JB4. O inibidor (10 μg de proteína) foi pré-incubado por 30 min em diferentes temperaturas. A atividade inibitória sobre a tripsina foi determinada usando BApNA como substrato.

5.7 Especificidade para proteinases serínicas e cisteínicas

Para determinar a especificidade de inibição dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca (JB1, JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4), foram realizados ensaios utilizando-se proteinases serínicas e cisteínicas. Como pode ser observado na TABELA 8, com relação às proteinases serínicas, todos os inibidores purificados tiveram ação sobre a tripsina, suprimindo quase completamente sua atividade, cujos percentuais de inibição variaram entre 84,30 a 97,57%. Entre os inibidores purificados, apenas JB4 inibiu a atividade catalítica da quimotripsina em mais de 50%, enquanto que os demais inibidores suprimiram fracamente essa atividade. A atividade catalítica da elastase foi fracamente inibida por todos os inibidores. Em relação às proteinases cisteínicas testadas, a atividade catalítica da papaína foi inibida por JB1, JB2, JB3-1 e JB3-2 com percentual de inibição variando entre 32,93 a 48,82%, enquanto que JB4 suprimiu fracamente essa atividade. A atividade catalítica da bromelaína foi fracamente inibida por todos os inibidores purificados.

TABELA 8 - Especificidade de JB1, JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4 para proteinases serínicas e cisteínicas

Inibidores	Enzimas				
	Proteinases serínicas		Proteinases cisteínicas		
	Tripsina ^a	Quimotripsina ^b	Elastase ^b	Papaína ^c	Bromelaína ^b
	%I ± DP	%I ± DP	%I ± DP	%I ± DP	%I ± DP
JB1	88,69 ± 0,86	5,04 ± 0,11	4,03 ± 0,04	34,01 ± 1,44	1,10 ± 0,05
JB2	97,08 ± 0,34	10,20 ± 0,51	1,26 ± 0,08	48,82 ± 1,43	0,61 ± 0,07
JB3-1	84,30 ± 0,86	8,38 ± 0,54	1,53 ± 0,18	35,86 ± 0,24	1,24 ± 0,29
JB3-2	89,17 ± 1,89	15,33 ± 0,62	2,36 ± 0,28	32,93 ± 0,10	1,16 ± 0,23
JB4	97,57 ± 0,35	55,12 ± 0,93	2,28 ± 0,09	9,93 ± 1,18	1,21 ± 0,04

^a Atividade inibitória usando BApNA como substrato. ^b Atividade inibitória usando azocaseína como substrato. ^c Atividade inibitória usando BANA como substrato.

Os valores da tabela correspondem ao percentual de inibição (%I) e desvio padrão (DP) de experimentos realizados em triplicata.

A atividade inibitória foi determinada usando cerca de 20 µg de proteína de cada inibidor.

5.8 Mecanismo de inibição e valores de K_i

Os inibidores JB1, JB2 e JB4 foram avaliados quanto ao seu mecanismo de inibição sobre a atividade catalítica da tripsina e os valores de K_i foram determinados. Tendo em vista que alguns inibidores mostraram ação sobre a papaína, também foram analisados o mecanismo de inibição desses inibidores, bem como seus respectivos valores de K_i .

5.8.1 Mecanismo de inibição sobre a tripsina

Após a realização de ensaios utilizando concentrações variadas de inibidor e substrato (BApNA), foram construídos um gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk, para determinação do tipo de mecanismo de inibição de JB1, JB2 e JB4 para tripsina. Na FIGURA 45, é mostrado que JB1 suprimiu a atividade catalítica da tripsina de modo competitivo, caracterizado pela variação do valor de K_m (constante de Michaelis-Menten) e inalteração da velocidade máxima de reação. A FIGURA 45 mostra o mecanismo de inibição de JB2 sobre a atividade catalítica da tripsina, onde é observado que o mecanismo de inibição também foi do tipo competitivo.

Os estudos cinéticos realizados para determinar o mecanismo de inibição de JB4 sobre a atividade catalítica da tripsina mostraram que JB4 suprimiu a atividade da enzima de modo competitivo (FIGURA 46), similar ao mecanismo de ação observado para JB1 e JB2.

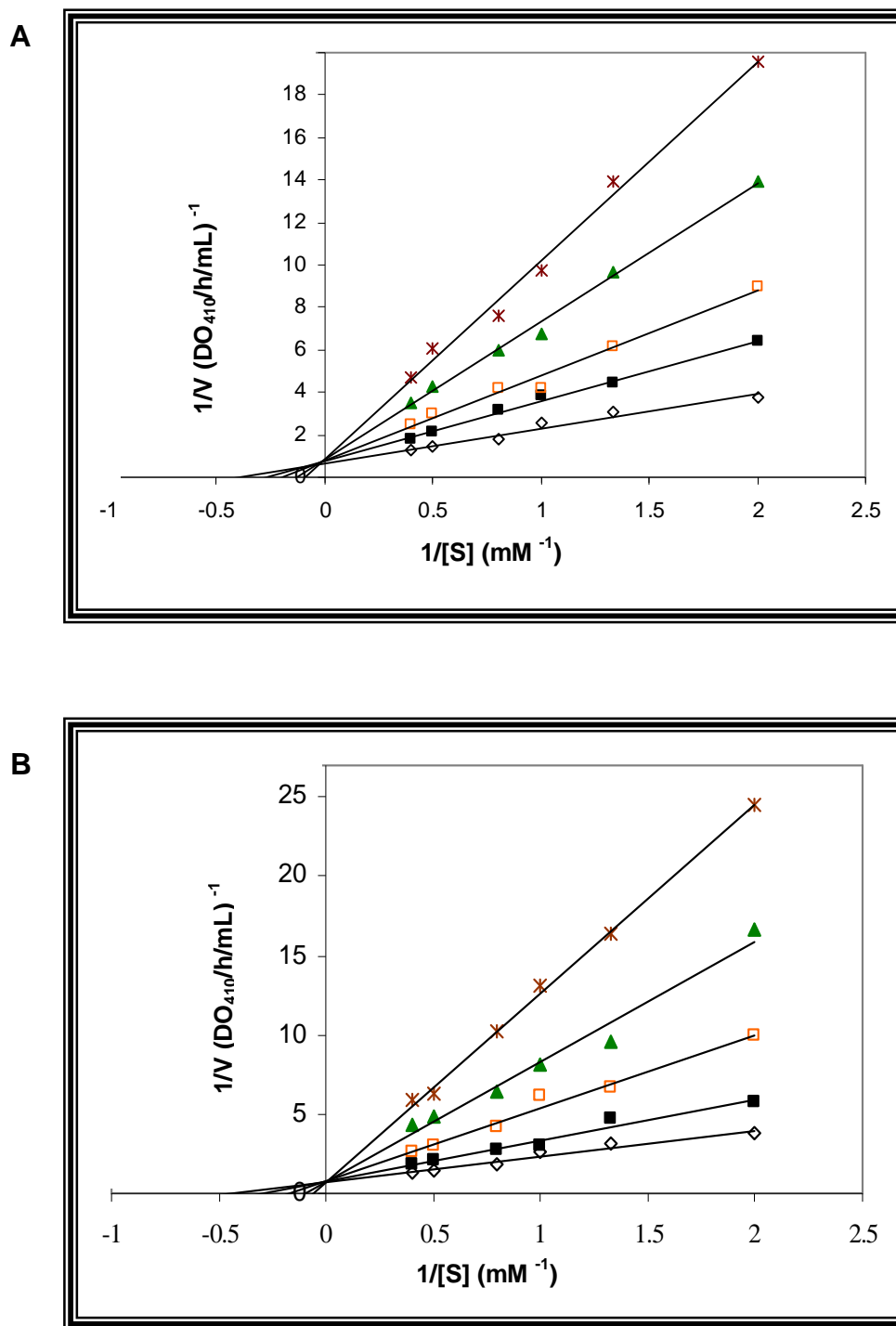


FIGURA 42: Mecanismo de inibição de JB1(A) e JB2 (B) sobre a atividade catalítica da tripsina. A atividade inibitória foi determinada usando várias concentrações de BA_pNA (0,4; 0,5; 0,8; 1; 1,33 e 2 mM). \diamond , controle positivo; \blacksquare , 2 ug; \square , 3 ug; \blacktriangle , 4 ug e $*$, 5 ug dos inibidores.

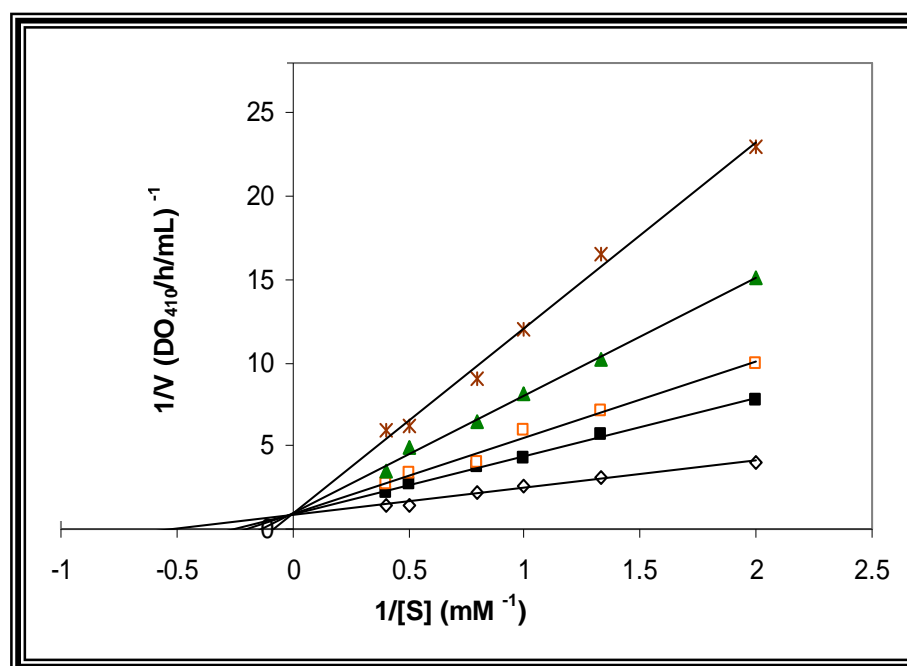


FIGURA 43: Mecanismo de inibição de JB4 sobre a atividade catalítica da tripsina. A atividade inibitória foi determinada usando várias concentrações de BApNA (0,4; 0,5; 0,8; 1; 1,33 e 2 mM). \diamond , controle positivo; \blacksquare , 2 μg ; \square , 3 μg ; \blacktriangle , 4 μg e \ast , 5 μg dos inibidores.

A TABELA 9 resume os valores determinados para as constantes de inibição (K_i) dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca.

TABELA 9 - Constante de inibição

Inibidores	K_i app ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	K_i ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	K_i (M)
JB1	0,841	0,702	$3,56 \times 10^{-8}$
JB2	0,395	0,330	$1,65 \times 10^{-8}$
JB3-1	0,989	0,829	$4,20 \times 10^{-8}$
JB3-2	0,677	0,567	$2,88 \times 10^{-8}$
JB4	0,0149	0,0125	$5,70 \times 10^{-10}$

5.8.2 Mecanismo de inibição para a papaína

Após realização dos ensaios com concentrações variadas de inibidores e substrato (BANA), foram construídos gráficos de duplo recíproco de Lineweaver-Burk, para determinação do mecanismo de inibição de JB1 e JB2 sobre a atividade catalítica da papaína. A FIGURA 44 mostra os gráficos duplos recíprocos obtidos para JB1 e JB2, respectivamente, sendo observado que esses inibidores suprimiram a atividade catalítica da papaína de modo não competitivo, caracterizado pela diminuição da velocidade máxima e não alteração do valor de K_m .

Com base nos dados obtidos, foram calculados os valores de K_i para JB1 e JB2, respectivamente (FIGURA 45). Os valores de K_i aparente foram 14 μg ou $7,60 \times 10^{-7}$ M para JB1, e 9 μg ou $5,10 \times 10^{-7}$ M para JB2.

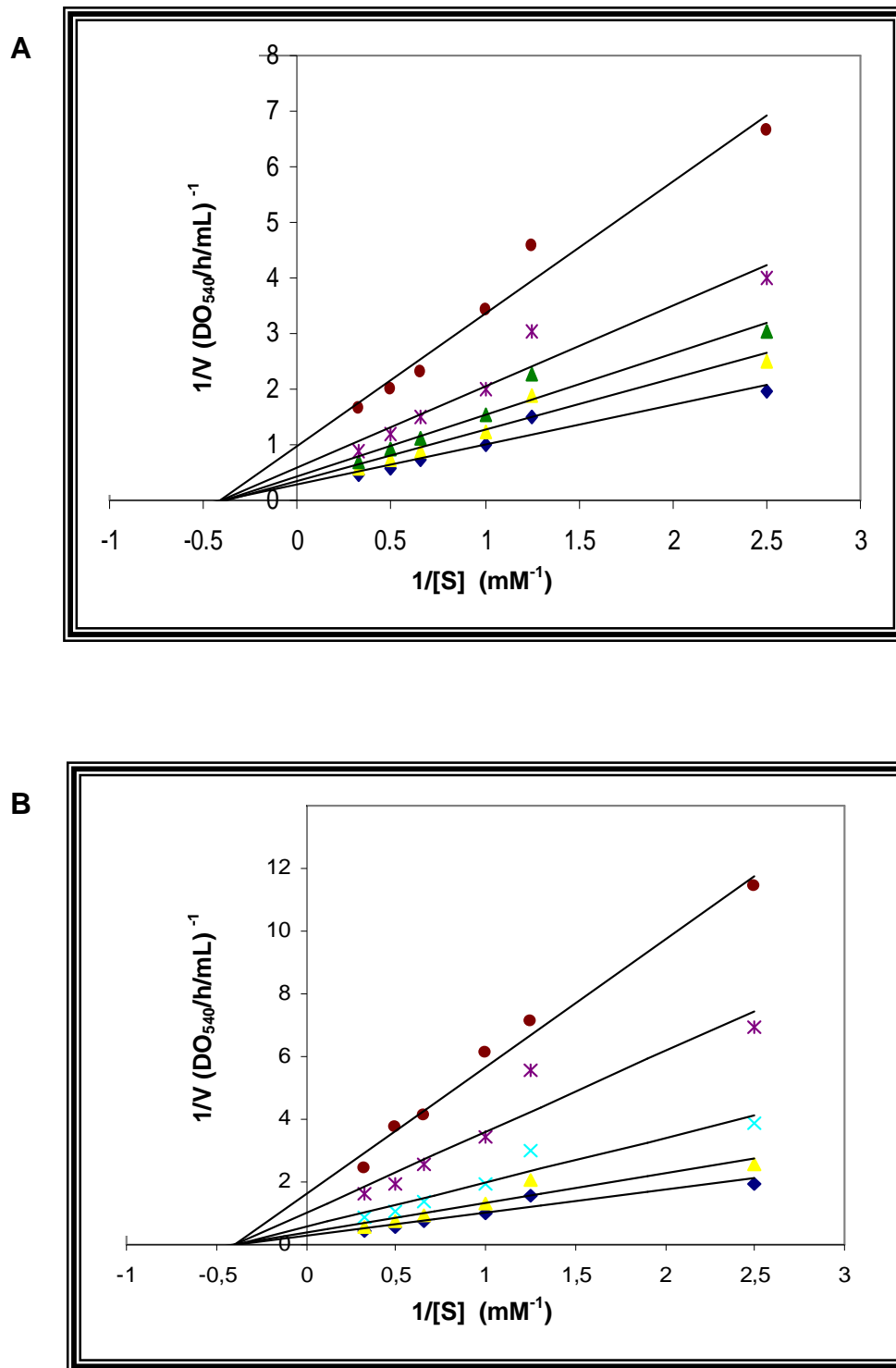


FIGURA 48: Mecanismo de inibição de JB1(A) e JB2 (B) sobre a atividade catalítica da papaína. Dados da cinética de inibição foram ilustrados pelo gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk. A atividade inibitória foi determinada usando várias concentrações de BANA (0,3, 0,5, 0,66, 1, 1,25, e 2,5 mM). \blacklozenge , controle positivo; \blacktriangle , 10 ug; \blacktriangle , 20 ug; \blackast , 30 ug e \bullet , 40 ug de JB1 e JB2.

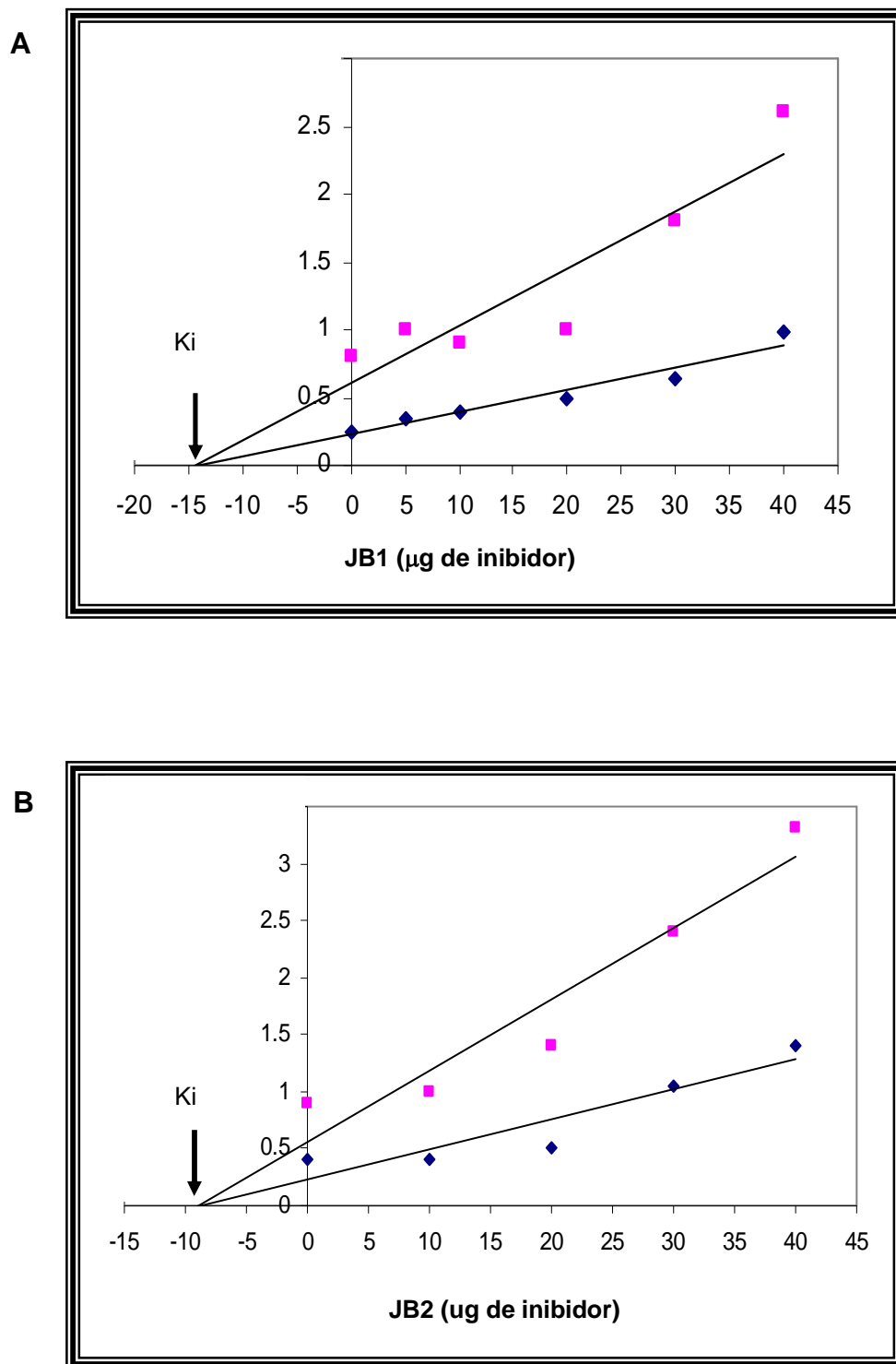


FIGURA 45: Valor de K_i de JB1 (A) e JB2 (B) sobre a papaína. O valor de K_i aparente foi de aproximadamente 14 μg ou $7,60 \times 10^{-7}$ M e 9 μg ou $5,10 \times 10^{-7}$ M para JB1 e JB2, respectivamente. \blacklozenge , intercepto e \blacksquare , inclinação.

5.9 Especificidade dos inibidores para enzimas digestórias de insetos

A atividade *in vitro* dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca para enzimas digestórias de diversos insetos-praga foi testada (TABELA 10). JB1 inibiu a atividade de enzimas digestórias de *C. maculatus*, *Z. subfasciatus*, *A. argillaceae*, *P. interpunctella* e *C. capitata* em 29,18; 68,87; 38,36; 44,35 e 65,53% de inibição, respectivamente. JB2 foi efetivo sobre as enzimas desses insetos inibindo suas atividades catalíticas em 70,04; 74,54; 13,58; 48,67 e 70,30%, respectivamente. As atividades digestórias de *C. maculatus*, *Z. subfasciatus*, *A. argillaceae*, *P. interpunctella* e *C. capitata* foram inibidas por JB3-1 em 7,98; 67,33; 15,52; 49,00 e 36,11% de inibição, respectivamente. JB3-2, foi capaz de inibir essas atividades em 5,17; 56,93; 10,15; 37,59 e 29,22% respectivamente. O percentual de inibição de JB4 sobre as enzimas digestórias de *C. maculatus*, *Z. subfasciatus*, *A. argillaceae*, *P. interpunctella* e *C. capitata* foram respectivamente, de 66,15; 60,12; 54,53; 8,97 e 37,47%.

TABELA 10 - Especificidade JB1, JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4 para enzimas digestórias de insetos.

Inibidores	Enzimas (homogenato intestinal)				
	<i>C. maculatus</i>	<i>Z. subfasciatus</i>	<i>A. argillaceae</i>	<i>P. interpunctella</i>	<i>C. capitata</i>
	%I ± DP	%I ± DP	%I ± DP	%I ± DP	%I ± DP
JB1	29,18 ± 1,10	68,87 ± 2,38	38,36 ± 1,22	44,35 ± 1,64	65,53 ± 0,58
JB2	70,04 ± 1,10	74,54 ± 0,86	13,58 ± 2,14	48,67 ± 0,71	70,30 ± 0,07
JB3-1	7,98 ± 1,93	67,33 ± 1,51	15,52 ± 1,83	49,00 ± 0,71	36,11 ± 1,35
JB3-2	5,17 ± 0,39	56,93 ± 1,33	10,15 ± 1,53	37,59 ± 1,33	29,44 ± 1,39
JB4	66,15 ± 1,65	60,12 ± 1,74	54,53 ± 0,91	8,97 ± 0,47	37,47 ± 0,58

Os ensaios inibitórios sobre a atividade catalítica de enzimas digestórias de insetos praga foram realizados em triplicata usando azocaseína como substrato e os valores apresentados na tabela corresponde à média do percentual de inibição (%I) e seus respectivos desvios padrões (DP). Para os ensaios inibitórios foram utilizados cerca de 20 µg de cada inibidor.

6 DISCUSSÃO

Inibidores de tripsina são extensivamente estudados sob os mais diversos aspectos, tais como: caracterização bioquímica, estrutura tridimensional, especificidade de inibição para diversas classes de proteinases e efeito *in vitro* e *in vivo* sobre pragas e patógenos (RYAN, 1990; JONGSMA; BOLTER, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2002; KRAUCHENCO *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2004). Além disso, eles são excelentes candidatos aos programas de melhoramento de plantas via transgenia, onde são utilizados na produção de plantas resistentes a pragas (FALCO; SILVA-FILHO, 2003; DE LEO *et al.*, 2001; MASOUD *et al.*, 1993). Para muitos desses estudos, a etapa de isolamento e purificação dos inibidores é imprescindível, onde a utilização de técnicas cromatográficas que empregam coluna de afinidade em Tripsina-Sepharose e coluna de fase reversa em sistema de CLAE para a purificação de inibidores de tripsina de sementes. Por exemplo, de *D. mollis* (MACEDO *et al.*, 2000; MELLO *et al.*, 2002), de sementes de copaíba (*C. langsdorfii*) (SILVA *et al.*, 2001), *P. dubium* (MACEDO *et al.*, 2003) e *T. indica* (ARAÚJO *et al.*, 2005a) foram purificados inibidores com elevado grau de pureza que, subseqüentemente, foram caracterizadas (MACEDO *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001; MACEDO *et al.*, 2003; ARAÚJO *et al.*, 2005a). Neste estudo, cinco inibidores de tripsina detectados em sementes de Jurema Branca (*P. dumosum*) foram purificados, sendo denominados de JB1, JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4. A análise desses inibidores em gel de poliacrilamida e a ausência de contaminantes revelaram que a utilização seqüencial dessas técnicas cromatográficas foram estratégias eficientes para o processo de purificação, onde os inibidores de Jurema Branca foram purificados na ordem de 100 a 217 vezes, com rendimentos variando em torno de 1,79-4,66% em comparação com o extrato bruto. Esses resultados foram similares a outros inibidores de tripsina purificados de várias sementes, dentre estes, dois de sementes de *D. mollis*: o inibidor denominado DMTI, purificado 116 vezes com índice de recuperação de 7,60% (MACEDO *et al.*, 2000); e outro, chamado DMTI-II, purificado 12,00 vezes, com percentual de recuperação calculado em 0,46% (MELLO *et al.*, 2002). Das sementes de feijão guandú (*Cajanus cajan*), um inibidor de tripsina foi purificado 1,89 vezes apresentando rendimento de 1,20% (HAQ; KHAN, 2003). Recuperação de 14,00 vezes foi obtido para um inibidor de

tripsina de sementes de mata-fome (*Pithecellobium dulce*), denominado PDTI (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2004). GOMES *et al.* (2005a) obtiveram de sementes de *C. pallida*, denominado CapTI, um inibidor purificado 180 vezes com recuperação de 0,50%. Já o inibidor de tripsina de sementes de *A. ellipticum* (AeTI) foi purificado 124,00 vezes com recuperação de, aproximadamente, 0,80% (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006). Para um inibidor de sementes de *T. indica*, denominado TTI, foi obtido rendimento de 2,00% que foi purificado, aproximadamente, 127,00 vezes (ARAÚJO *et al.*, 2005a). A metodologia empregada por Cavalcanti e colaboradores (2002) permitiu a obtenção de um rendimento de 66,00% para um inibidor existente em sementes de *S. pickellii* (SWTI) que foi purificado em 5 vezes. Mais recentemente, outro inibidor de tripsina foi obtido de sementes de *B. rufa*, denominado BrTI, com rendimento de 15,00% e grau de purificação de 225,00 vezes (NAKAHATA *et al.*, 2006).

Os inibidores da família Kunitz caracterizam-se por apresentar massas moleculares em torno de 19 a 26 kDa (RICHARDSON, 1991; RYAN, 1990, BHAT; PATTABIRAMAN, 1989, OLIVEIRA, 2001). A análise eletroforética dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca revelou a presença de bandas protéicas com massas moleculares aparentes entre 19,69 e 20,00 kDa. As massas moleculares de JB1, JB3-1 e JB3-2 determinadas por MALDI-TOF foi de, aproximadamente, 19,69 kDa e as massas moleculares de JB2 e JB4, determinada pela mobilidade eletroforética, foram de aproximadamente 18,08 e 20,85 kDa, respectivamente. As massas moleculares obtidas para os inibidores de tripsina purificados de Jurema Branca estão de acordo com aquelas determinadas para os seguintes inibidores da família Kunitz: os purificados de tubérculos de batata (WALSH; TWITCHELL, 1991, VALUEVA *et al.*, 1997, 1998) e sementes leguminosas da subfamília Caesalpinoidea como determinado para TTI (ARAÚJO *et al.*, 2005a); BvcTI de sementes de *B. variegata* (DI CIERO *et al.*, 1998); BuXI de *B. bauhinoides* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2001, OLIVA *et al.*, 2001); BrTI de *B. rufa* (NAKAHATA *et al.*, 2006); DrTI de sementes de *D. regia* (PANDO *et al.*, 2001); SWTI de sementes de *S. pickellii* (CAVALCANTI *et al.*, 2002); PDTI de sementes de *P. dubium* (MACEDO *et al.*, 2003); CeKI de pau-brasil, *Caesalpinia echinata* (CRUZ-SILVA *et al.*, 2004); COTI de sementes de fedegoso-branco (*C. obtusifolia*) (LIAO *et al.*, 2007); da subfamília Mimosoideae, como encontrado em sementes de *Acacia confusa*,

denominado AcTI (LIN *et al.*, 1991, HUNG *et al.*, 1994); EcTI de sementes de tamboríu, *E. contortisiliquum* (BATISTA *et al.*, 1996); LITI de sementes de *L. leucocephala* (OLIVA *et al.*, 2000); DMTI e DMTI-II (MACEDO *et al.*, 2000, MELLO *et al.*, 2002); AeTI de sementes de *A. ellipticum* (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006), PDTI (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2004), bem como, para aqueles inibidores da subfamília Papilionoideae como os inibidores purificados de sementes de *C. paulina* (PANDO *et al.*, 1999) e o PPTI purificado de sementes de coração-de-negro, *P. parviflora* (GARCIA *et al.*, 2004).

Inibidores de tripsina da família Kunitz foram encontrados em muitas espécies de plantas e em todas as subfamílias de leguminosas: Caesalpinoideae, Papilionoideae e Mimosoideae. Os inibidores de tripsina encontrados nas subfamílias Caesalpinoideae (OLIVA *et al.*, 1996; DI CIERO *et al.*, 1998; MACEDO *et al.*, 2003; CRUZ-SILVA *et al.*, 2004; NAKAHATA *et al.*, 2006; LIAO *et al.*, 2007) e Papilionoideae (PANDO *et al.*, 1999; GARCIA *et al.*, 2004), geralmente são constituídos por uma única cadeia polipeptídica, diferindo assim, dos inibidores purificados de sementes de leguminosas da subfamília Mimosoideae, que, geralmente, são formados por duas cadeias polipeptídicas unidas por pontes dissulfetos (NEGREIROS *et al.*, 1991; LIN *et al.*, 1991, HUNG; LEE; LIN, 1994; BATISTA *et al.*, 1996; OLIVA *et al.*, 2000; DELGADO-VERGAS *et al.*, 2004; MACEDO *et al.*, 2004; BHATTACHARYYA *et al.*, 2006). Entretanto, algumas exceções já foram documentadas. Neste trabalho, a análise em gel de poli(acrilamida) dos inibidores (JB1, JB2, JB3-1, JB3-2 e JB4) purificados de sementes de Jurema Branca, uma leguminosa da subfamília Mimosoideae, após tratamento com agente redutor (β -Me) revelou que todos eles, são inibidores com massa molecular entre 18,08 e 20,85 kDa, compostos por uma única cadeia polipeptídica. Esses resultados foram similares aos observados para os dois inibidores de tripsina, DMTI e DMTI-II, isolados de sementes de *D. mollis*, com massas moleculares de 20,00 e 23,00 kDa, respectivamente (MACEDO *et al.*, 2000, MELLO *et al.*, 2002) e o inibidor ILTI isolado de sementes de ingá-branco (*Inga laurina*) com massa molecular de 20,00 kDa distribuídos em uma cadeia polipeptídica (MACEDO *et al.*, 2007), que constituem as exceções de inibidores da família Kunitz de leguminosas da subfamília Mimosoideae sendo compostos por uma única cadeia polipeptídica em contraste com a grande maioria que é constituída por duas cadeias polipeptídicas.

A comparação das seqüências N-terminais de JB1, JB3-1 e JB3-2 mostrou fraca similaridade entre elas, e forte similaridade entre as seqüências de JB3-1 e JB3-2. Em adição, o alinhamento das seqüências N-terminais desses inibidores mostrou grau variado de similaridade com as seqüências N-terminais de outros inibidores de tripsina da família Kunitz de sementes de leguminosas, sugerindo que os inibidores de tripsina purificados de sementes de Jurema Branca são os mais novos membros de inibidores da família Kunitz.

Nas seqüências N-terminais de JB3-1 e JB3-2 foi observada a presença de um resíduo de asparagina (N13), conservado em muitos inibidores de tripsina da família Kunitz (BATISTA *et al.*, 1996, BHATTACHARYYA *et al.*, 2006, IWANAGA *et al.*, 1998, MACEDO *et al.*, 2003), que está envolvido na interação entre tripsina-inibidor (IWANAGA *et al.*, 1998, MEESTER *et al.*, 1998, ONESTI *et al.*, 1991, SONG e SHU, 1998). A presença desse resíduo em JB3-1 e JB3-2 sugere também o seu envolvimento na interação com tripsina. Por outro lado, na seqüência N-terminal de JB1 foi observado ausência desse resíduo de aminoácido. Esse resultado corrobora com aquele observado para DrTI de sementes de *D. regia*, que mesmo na ausência do resíduo de asparagina na sua extremidade N-terminal foi capaz de suprimir, eficientemente, a atividade da tripsina (PANDO *et al.*, 2001, KRAUCHENCO *et al.*, 2003). A ausência desse resíduo de asparagina também foi observada em outros membros da família Kunitz que inibem eficientemente a tripsina, como os dois inibidores de tripsina purificados de tubérculos de batata, PSPI-21 e PSPI-22 (VALUEVA *et al.*, 1998). Em estudos realizados para determinar o mecanismo de inibição e o padrão de interação entre LITI e a tripsina, não foi observada uma interação entre o resíduo de asparagina do inibidor com a tripsina. Assim, a atividade inibitória de LITI sobre a atividade catalítica da tripsina foi atribuída, particularmente, à sua interação com os resíduos de aminoácidos presentes no seu sítio reativo (SATTAR *et al.*, 2004). Do mesmo modo, a ausência desse resíduo de aminoácido, em particular, não interferiu na atividade inibitória de JB1 sobre a tripsina, o que sugere que outros resíduos de aminoácidos estejam envolvidos na formação do complexo (enzima-inibidor) como aqueles presentes em seu sítio reativo. Contudo, para se ter uma confirmação destas suposições, faz-se necessário, estudos mais aprofundados que incluem a modelagem molecular e a obtenção da seqüência completa desses inibidores.

As pontes dissulfetos presentes na estrutura de inibidores de proteinases, incluindo os inibidores da família Kunitz são, presumivelmente, responsáveis pela estabilidade funcional dessas proteínas na presença de agentes desnaturantes físicos e químicos como temperatura, pH e agentes redutores (BROZE; GIRARD; NOVOTNY, 1990, GARCIA *et al.*, 2004). Baseado nessas observações, os inibidores purificados neste trabalho foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir a atividade catalítica da tripsina após tratamento térmico e variações de pH. Como resultado foi observado que a atividade inibitória dos inibidores de sementes de Jurema Branca não era alterada quando eles foram submetidos às variações de pH (2 a 12), por 30 min. Somente JB3-1 mostrou uma sensível perda de sua capacidade inibitória. Esses resultados foram similares aos observados para outros inibidores Kunitz (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006, GRUEN; TAO; KORTT, 1984; HAQ; KLAN, 2003). A pré-incubação de EcTI, com massa molecular de 22,00 kDa distribuídos em duas cadeias polipeptídicas unidas por duas pontes dissulfetos, quando submetido a variações de pH entre 2-12, por 10 min, não teve a sua capacidade inibitória sobre a atividade catalítica da tripsina afetada (BATISTA *et al.*, 1996). A estabilidade funcional de outros inibidores também foi avaliada nessas mesmas condições de ensaio. Os resultados mostraram que esses inibidores mantiveram inalterada sua capacidade de inibir a atividade catalítica da tripsina como relatado para BrTI de sementes de *B. rufa*, que foi caracterizado como uma proteína consistindo de 18 kDa distribuídos em uma cadeia polipeptídica, onde foi observado ausência de pontes dissulfetos (NAKAHATA *et al.*, 2006) e para BjTI de sementes de *B. juncea*, que foi caracterizado como um inibidor da família Kunitz de 20,00 kDa, distribuídos em uma cadeia polipeptídica contendo duas pontes dissulfetos (MANDAL *et al.*, 2002). A capacidade inibitória de outros inibidores de tripsina foi mantida após pré-incubação em pHs variados, por um período de 30 min, como observado para: DMTI-II de 20,00 kDa distribuídos em uma única cadeia polipeptídica (MELLO *et al.*, 2002); PDTI de sementes de *P. dubium*, um kunitz de 19,60 kDa, contendo duas pontes dissulfeto em sua estrutura (MACEDO *et al.*, 2003); CpaTI, composto de 32,50 kDa com duas cadeias polipeptídicas (GOMES *et al.*, 2005a); ILTI de sementes de *I. laurina*, caracterizado com um inibidor Kunitz de 20,00 kDa com duas cadeias polipeptídicas e uma única ponte dissulfeto (MACEDO *et al.*, 2007) e o de sementes de *Caesalpinia bonduc*, denominado CbTI (BHATTACHARYYA; RAI; BABU, 2007).

Em adição, os inibidores de Jurema Branca foram estáveis às variações de pH quando comparados ao inibidor de sementes de *P. parviflora*, denominado PPTI, que manteve sua atividade máxima de inibição sobre a tripsina após pré-incubação em intervalo de pH de 2 a 10, também por 60 min (GARCIA *et al.*, 2004).

Alguns inibidores mostraram uma estabilidade à variação de pH ainda maior, como observado para o inibidor de tripsina purificado de tubérculo de inhame-selvagem (*Colocasia esculenta*) que manteve sua atividade inibitória máxima sobre a atividade catalítica da tripsina tanto em pH ácido (1-4) como em básico (12-13), mesmo após pré-incubação por, aproximadamente, 17 horas (OLIVEIRA, 2001). Outro inibidor que também manteve sua estabilidade funcional quando pré-incubado por 16 horas, nesse mesmo intervalo de pH, foi aquele purificado do látex de *C. papaya*, denominado PPI, que após esse tratamento ainda inibiu a atividade catalítica da tripsina em 95% (AZARKAN *et al.*, 2006). Liao e colaboradores (2007) relataram que COTI, um inibidor com massa molecular de 19,80 kDa e por uma única cadeia polipeptídica, manteve-se estável após 24 horas de incubação no intervalo de pH de 2 a 12.

A análise da estabilidade térmica dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca revelou que JB2, JB3-1 e JB4 foram mais resistentes ao tratamento térmico, mantendo sua atividade inibitória máxima sobre a atividade catalítica da tripsina, mesmo após pré-incubação por 30 min, a 100 °C. JB1 e JB3-2 submetidos a essa mesma temperatura perderam, aproximadamente, 60,00% de sua capacidade de inibição sobre a atividade catalítica da tripsina sendo, dessa forma, os inibidores menos resistentes ao tratamento térmico quando comparado a JB2, JB3-1 e JB4. Os inibidores de sementes de Jurema Branca apresentaram maior estabilidade térmica do que os outros inibidores de tripsina da família Kunitz que foram mais sensíveis ao tratamento térmico, como observado para EcTI que manteve sua atividade inibitória somente em temperaturas até 60 °C, por 10 min, mas não a 100 °C (BATISTA *et al.*, 1996). Resultado similar foi observado também para BjTI (MANDAL *et al.*, 2002), BrTI (NAKAHATA *et al.*, 2006), PPI (AZARKAN *et al.*, 2006), e COTI (LIAO *et al.*, 2007) os quais perderam drasticamente sua capacidade de inibição, após pré-incubação em temperatura de 90 °C, por 10 min. A estabilidade térmica de outros inibidores foi avaliada após pré-incubação em diferentes temperaturas por 30 min. Contudo, para alguns desses inibidores, foi observado um declínio gradativo em sua

capacidade inibitória, resultando em perda de, aproximadamente, 80,00% de atividade, em temperaturas entre 80 e 100 °C, como observado para CbTI de sementes de *C. bonduc* (BHATTACHARYYA; RAI; BABU, 2007) e DMTI-II (MELLO *et al.* 2002). Por outro lado, a estabilidade térmica observada para os inibidores de Jurema Branca foi concordante com os resultados obtidos para outros inibidores que foram resistentes ao tratamento térmico, mantendo mais de 55,00% de sua atividade inibitória, a 100 °C, como observado para CpaTI (GOMES *et al.*, 2005a), PDTI (MACEDO *et al.*, 2003), ILTI (MACEDO *et al.*, 2007), AeTI (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006), inibidor de quimotripsina, denominado SPCI, purificado de sementes de guapuruva, *Schizolobium parahyba* (SOUZA *et al.*, 1995, 2000; TELES *et al.*, 2004), inibidor Kunitz purificado de folhas de *Azolla pinnata* que manteve, aproximadamente, 80% de sua atividade inibitória, após pré-incubação por 30 ou 60 min, a 90 °C (MAITY; PATRA, 2003); inibidor de tripsina purificado de sementes de *C. cajan* (HAQ; KHAN, 2003), e PPTI de sementes de *P. parviflora*, que manteve sua capacidade máxima de inibição sobre a tripsina, após tratamento a 100 °C (GARCIA *et al.*, 2004)

Os inibidores, purificados neste trabalho foram caracterizados como proteínas constituídas por uma única cadeia polipeptídica, e embora não tenha sido observada a presença de resíduos de cisteína em suas seqüências N-terminais, presumimos que esses inibidores possuam, em suas estruturas, pontes dissulfetos intramoleculares, semelhante a outros inibidores Kunitz de cadeia polipeptídica única (SOUZA *et al.*, 1995, 2000; MACEDO *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2004; TELES *et al.*, 2004; NAKAHATA *et al.*, 2006; MACEDO *et al.*, 2007). Partindo desse pressuposto, a elevada estabilidade funcional desses inibidores diante da variação de temperatura e pH poderia ser explicada, em parte, devido à presença de pontes dissulfeto intramolecular em concordância com os já referidos autores (SOUZA *et al.*, 1995, 2000; MACEDO *et al.*, 2003; GARCIA *et al.*, 2004; TELES *et al.*, 2004; NAKAHATA *et al.*, 2006; MACEDO *et al.*, 2007). Por outro lado, alguns autores sugerem que a estabilidade funcional de alguns inibidores Kunitz não está relacionada com a presença de pontes dissulfeto e isso pode ser comprovado pelo tratamento desses inibidores com agentes redutores como, o DTT.

Macedo e colaboradores (2007) relataram que a atividade inibitória de ILTI foi mantida após redução de pontes dissulfeto com DTT (MACEDO *et al.*, 2007).

Resultados similares foram observados para ETI, um inibidor Kunitz de *Erythrina caffra* (LEHLE *et al.*, 1994), DMTI-II (MACEDO *et al.*, 2003) e SPCI (SOUZA *et al.*, 2000; TELES *et al.*, 2004). Souza e colaboradores (2000) sugeriram que a redução de pontes dissulfeto resulta na mudança conformacional de SPCI de sementes de *S. parahyba*. Dessa forma, as pontes dissulfeto são necessárias apenas para a estabilidade estrutural da proteína, mas não para sua estabilidade funcional, tendo em vista que o tratamento com DTT não alterou o sítio reativo do inibidor, mantendo, assim, sua capacidade inibitória. Resultado similar foi obtido por Lehle e colaboradores (1994) que relataram que o sítio reativo de ETI era, principalmente, estabilizado por pontes de hidrogênio. A ausência de pontes dissulfetos foi descrita também para alguns inibidores Kunitz isolados de espécies de *Bauhinia* (NAKAHATA *et al.*, 2006; OLIVA *et al.*, 2001). Em adição, a ausência de pontes dissulfeto é uma característica marcante das fitocistatinas que, também, são conhecidas pela sua estabilidade estrutural e funcional em temperaturas e pHs variados (ABE *et al.*, 1987; ABE; WHITAKER, 1988; WALSH; STRICKLAND, 1993; ROGELJ *et al.*, 1998; WU; HAARD, 2000; LAWRENCE; NIELSEN, 2001). Essa estabilidade das fitocistatinas é assumida pela presença de inúmeras pontes de hidrogênio (SEEMULER *et al.*, 1980; NAGATA *et al.*, 2000). Com base nessas observações, se a ausência de pontes dissulfeto for confirmada para os inibidores purificados de sementes de Jurema Branca, podemos inferir que a estabilidade funcional desses inibidores seja devido à presença de pontes de hidrogênio.

Nos estudos para determinar a especificidade dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca sobre a atividade catalítica de proteinases serínicas, foi observado que todos eles são potentes inibidores de tripsina sendo capazes de suprimir sua atividade em mais de 87,00%. Entretanto, nenhum deles foi capaz de suprimir significativamente a atividade catalítica da elastase ou quimotripsina, com exceção de JB4 que reduziu a atividade da quimotripsina em 55,00%. Esses resultados corroboram com a especificidade determinada para muitos inibidores Kunitz, entretanto, algumas exceções foram observadas.

Poucos inibidores Kunitz são potentes inibidores de elastase pancreática como relatado para BrEI, uma glicoproteína purificada de sementes de *Bauhinia rufa* com massa molecular de 20,00 kDa, que apresentou um valor de K_i de 6.18×10^{-8} M frente a esta enzima (SUMIKAWA *et al.*, 2006). Um valor de k_i de $4,0 \times 10^{-8}$ M foi

descrito para um inibidor de cruzipaina purificado de sementes de *B. baunhinoides*, denominado BbCI (ARAUJO *et al.*, 2005 b). Outros inibidores, entretanto, foram menos efetivos frente a elastase como é o caso de SPCI de sementes de *S. parahyba* que suprimiu a atividade catalítica dessa enzima em, aproximadamente, 15,00% (SOUZA *et al.*, 1995; TELES *et al.*, 2004); isso foi observado também para CpaTI (GOMES *et al.*, 2005a). Por outro lado, a atividade catalítica da elastase pancreática não foi significativamente inibida por TTI (ARAUJO *et al.*, 2005a), DMTI-II (MELLO *et al.*, 2002), BrTI (NAKAHATA *et al.*, 2006) nem por PSPI-22 (VALEUVA *et al.*, 1998), como é o caso dos inibidores purificados de Jurema Branca.

Alguns inibidores dessa família inibem a atividade catalítica de tripsina e quimotripsina apresentando valores de K_i na mesma ordem de grandeza. Valores de K_i na ordem de 10^{-7} M foi determinado para PPI de *C. papaya* (ODANI *et al.*, 1996), na ordem de 10^{-8} M para LITI (OLIVA *et al.*, 2000) e AiTI de sementes de *A. ellipticum* (BHAT; PATTABIRAMAN, 1989), e na ordem de 10^{-10} M para CbTI-2 de sementes de *C. bonduc* (BHATTACHARYYA; RAI; BABU, 2007) e ApTI (MACEDO *et al.*, 2004). Por outro lado, poucos são específicos para quimotripsina e não inibem a tripsina como o inibidor de quimotripsina, denominado ECI, de sementes de *Erythina variegata* (IWANAGA *et al.*, 2005), WCI2 de sementes de *P. tetragonolobus* (IWANAGA *et al.*, 2005) e o SPCI de sementes de *S. parahyba* (SOUZA *et al.*, 1995; 2000). Esses efeitos contrastam com os observados para JB1, JB2, JB3-1 e JB3-2 que inibiram, eficientemente, a atividade catalítica da tripsina, mas apresentaram baixa percentagem de inibição sobre a quimotripsina. Esses resultados são concordantes com os observados para WTI-1 de *P. tetragonolobus* (YAMAMOTO; HARA; IKENAKA, 1983), ILTI (MACEDO *et al.*, 2007), TTI (ARAUJO *et al.*, 2005a), BrTI (NAKAHATA *et al.*, 2006), DMTI (MACEDO *et al.*, 2000), DMTI-II (MELLO *et al.*, 2002), e para o inibidor purificado de sementes de *P. dulce* (DELGADO-VARGAS *et al.*, 2004), que inibem eficientemente a tripsina, mas não inibem a quimotripsina.

Os testes para determinar a especificidade de JB4 mostraram que esse inibidor suprimiu, efetivamente, a atividade catalítica da tripsina em 97,00% e a da quimotripsina em 55,00%. Esses resultados são concordantes com os descritos para PPTI que inibiu completamente a atividade catalítica da tripsina (65%) e, em menor extensão, também foi efetivo sobre a quimotripsina (GARCIA *et al.*, 2004). Resultado similar foi observado para CpaTI que foi caracterizado como um potente inibidor de

tripsina, mas também inibiu a atividade catalítica da quimotripsina em 36,00% (GOMES *et al.*, 2005a). Isso foi observado também para SWTI de sementes de *S. pickelli* (CAVALCANTI *et al.*, 2002), ECTI (BATISTA *et al.*, 1996), PDTI (MACEDO *et al.*, 2003) e para os inibidores purificados de *Bauhinia forficata* e *B. pentandra* que suprimiram com maior eficiência a atividade da tripsina do que a quimotripsina (SAMPAIO *et al.*, 1996).

O teste de especificidade dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca sobre a bromelaína mostrou que esses inibidores não possuem capacidade para suprimir essa atividade, concordando com os relatos da falta de atividade inibitória sobre outros inibidores Kunitz (ARAUJO *et al.*, 2005a; GOMES *et al.*, 2005a; OLIVEIRA *et al.*, 2000). A inibição da atividade catalítica da bromelaína só foi relatada para poucos inibidores, como os inibidores de proteinases cisteínicas purificados de caule de abacaxi que apresentam similaridade estrutural com inibidores de tripsina da família Bowman-Birk (HEINRIKSON; KEZDY, 1976; LENARCIC *et al.*, 1992; ZIMACHEVA; MOSOLOV, 1995; HATANO *et al.*, 1996; 1998).

Dos cinco inibidores purificados de Jurema Branca, quatro deles inibiram, moderadamente, a atividade catalítica da papaína (32,93 a 48,82%), com exceção da JB4 que inibiu essa atividade em apenas 9,93%. Os elevados percentuais de inibição exibidos por JB1, JB2, JB3-1 e JB3-2 sobre a atividade catalítica da tripsina e a inibição moderada sobre a atividade catalítica da papaína foram indicativos da bifuncionalidade desses inibidores. Entretanto, essa característica tem sido pouco observada nos inibidores da família Kunitz. O primeiro relato da bifuncionalidade de um inibidor Kunitz foi descrito por Oliveira e colaboradores (2002) para um inibidor purificado de sementes de algaroba, *Prosopis juliflora*, e essa característica foi comprovada por estudos de modelagem de proteínas feitos por Franco e colaboradores (2002) que mostraram que esse inibidor possuía sítios reativos de inibição tanto para tripsina como para papaína. Outro inibidor purificado de sementes de *A. pavonina*, denominado ApTI, inibiu a atividade catalítica da papaína em, aproximadamente, 52,00%, além de inibir as atividades da tripsina e quimotripsina, em 63,40 e 62,00%, respectivamente. (MACEDO *et al.*, 2004). Outro inibidor que apresentou essa característica foi purificado de sementes de *C pallida*, CpaTI, que inibiu a atividade catalítica da papaína em 43,90% além de reduzir a atividade da

quimotripsina em 36,20% e suprimir, completamente, a atividade catalítica da tripsina (GOMES *et al.*, 2005a).

Lakowski e Kato (1980), Fushiki e Kazuo (1989), bem como, Lakowski e Sealock (1971) afirmaram que os inibidores de proteinases serínicas são inibidores competitivos e reversíveis, e interagem com sua proteinase alvo de modo semelhante à interação da enzima com o substrato. O mecanismo de inibição de JB1, JB2 e JB4 para a tripsina foram avaliados como sendo o mecanismo de interação do tipo competitivo. No entanto, nossos resultados contrastam com os relatos de inibidores que interagem com a tripsina de modo não competitivo, como observado com aqueles um inibidor de tripsina purificado de tubérculo de *C. esculenta* (OLIVEIRA, 2001) e *C. antiquorum* (SUMAHI; PATTABIRAMAN, 1979), e de sementes de leguminosas como CpaTI (GOMES *et al.*, 2005a), ApTI (MACEDO *et al.*, 2004), TTI (ARAÚJO *et al.*, 2005a), e uma fitocistatina purificada de castanheira (*Castanea sativa*), denominada CsC, que inibiu não competitivamente a tripsina exibindo um K_i de $3,49 \times 10^{-6}$ M (PERNAS *et al.*, 1998). Em adição, foi descrito também que a tripsina foi inibida de modo incompetitivo pelos inibidores purificados de sementes de *Caesalpinia pulcherima* (HASE; KOYAMA; DAIYASU, 1986) e *A. integrifolia* (BHAT; PATTABIRAMAN, 1989).

Os valores de K_i determinados para os inibidores purificados de sementes de Jurema Branca revelaram que, dentre eles, o JB4 demonstrou ser o mais potente inibidor de tripsina com valor de K_i de $5,7 \times 10^{-10}$ M, enquanto que, JB1, JB2, JB3-1 e JB3-2 inibiram a tripsina com valores de K_i na mesma ordem de grandeza, isto é, 10^{-8} M, o que sugere maior compatibilidade estrutural entre o sítio reativo de JB4 e o sítio ativo da tripsina. JB2 foi o segundo inibidor mais potente para a tripsina com valor de K_i de $1,65 \times 10^{-8}$ M, seguido de JB3-2 ($2,88 \times 10^{-8}$ M), JB1 ($3,56 \times 10^{-8}$ M), e JB3-1 ($4,20 \times 10^{-8}$ M). Comparando-se os valores de K_i dos inibidores de sementes de Jurema Branca com outros inibidores da família Kunitz, foi observado que esses inibidores são mais potentes inibidores de tripsina do que o inibidor de *C. esculenta* (OLIVEIRA, 2001) e ETIa (IWANAGA *et al.*, 2005; KOUZUMA *et al.*, 2002) que apresentaram valor de K_i da ordem de 10^{-6} M; CpaTI (GOMES *et al.*, 2005a), PPTI (GARCIA *et al.*, 2004), PPI (ODANI *et al.*, 1996), e COTI (LIAO *et al.*, 2007) que tiveram os K_i s determinados da ordem de 10^{-7} M. Os valores de K_i determinados para JB1, JB2, JB3-1 e JB3-2 foram similares, em ordem de grandeza, àqueles

determinados para os inibidor de sementes de *C. paulina* (PANDO *et al.*, 1999), LITI (OLIVA *et al.*, 2000), DrTI (PANDO *et al.* 2001), BuXI de sementes de *B. unguilata* (OLIVA *et al.*, 1996) e BpTI de sementes de *B. pentandra* (SAMPAIO *et al.*, 1996).

Os inibidores de Jurema Branca (JB1, JB2, JB3-1 e JB3-2) apresentaram valores de K_i menores do que TTI (ARAUJO *et al.*, 2005a), BrTI (NAKAHATA *et al.*, 2006), SWTI (CAVALCANTI *et al.*, 2002), ECTI (BATISTA *et al.*, 1996), DMTI-II (MELLO *et al.*, 2002), DMTI (MACEDO *et al.*, 2000), AeTI (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006), BbKI (OLIVA *et al.*, 2001), PDTI (MACEDO *et al.*, 2003), ILTI (MACEDO *et al.*, 2007), CbTI-2 (BHATTACHARYYA, RAI; BABU, 2007), e os inibidores de sementes de *M. koenigii* (SHEE; SHARMA, 2007) que apresentaram valores de K_i da ordem de 10^{-9} e 10^{-10} M.

Em adição, o valor de K_i determinado para JB4 foi similar, em ordem de magnitude (10^{-10} M), àqueles determinados para DMTI (MACEDO *et al.*, 2000), AeTI (BHATTACHARYYA *et al.*, 2006), BbKI (OLIVA *et al.*, 2001), PDTI (MACEDO *et al.*, 2003), CbTI-2 (BHATTACHARYYA, RAI; BABU, 2007), BjTI (MANDAL *et al.*, 2002), ApTI (MACEDO *et al.*, 2004), e AcTI de sementes de *Acacia confusa* (HUNG *et al.*, 1994; WU; LIN, 1993). Esses dados confirmam que os valores de K_i determinados para os inibidores de Jurema Branca encontram-se dentro dos padrões de K_i de outros inibidores Kunitz.

O mecanismo de inibição não competitivo é frequentemente observado para as fitocistatinas frente a proteinases cisteínicas semelhantes à papaína (ABE *et al.*, 1987; 1994; FERNANDES *et al.*, 1991; ZHAO *et al.*, 1996; PERNAS *et al.*, 1998; JACINTO *et al.*, 1998; WU; HAARD, 2000). Esse mecanismo de inibição também foi observado para JB1 e JB2 que nos estudos cinéticos, causaram uma diminuição da velocidade máxima sem alterar o K_m da enzima. Resultados similares foram observados para os inibidores da família Kunitz purificados de *Prosopis juliflora* (OLIVEIRA *et al.*, 2002) e ApTI (MACEDO *et al.*, 2004).

Os valores de K_i determinados para JB1 e JB2 sobre a papaína foram de $7,60 \times 10^{-7}$ e $5,10 \times 10^{-7}$ M, respectivamente, que foram maiores do que o valor determinado para ApTI ($1,0 \times 10^{-5}$ M) (MACEDO *et al.*, 2004), e menores do que o encontrado para *P. juliflora* ($K_i = 0,59 \times 10^{-9}$ M) (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Proteinases digestivas predominantes em insetos da ordem Lepidóptera e Díptera pertencem à classe mecanística de proteinases serínicas, como tripsina,

quimotripsina e elastase (TERRA; FERREIRA, 1994, HAQ; ATIF; KHAN, 2004, GATEHOUSE *et al.*, 1999, SILVA *et al.*, 2006). Por isso, os inibidores de proteinases serínicas foram considerados como agentes naturais de controle contra estes insetos herbívoros, devido a capacidade de suprimir a atividade dessas enzimas proteolíticas *in vitro* (HARSULKAR *et al.*, 1999; REED; CHANDLER; SANDEMAN, 1999; DE LEO *et al.*, 2001; MACEDO *et al.*, 2003; TELANG *et al.*, 2003, 2005; TAMHANE *et al.*, 2005; GARCIA *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2005b; SRINIVANSAN *et al.*, 2005; LIAO *et al.*, 2007); de retardar o crescimento e desenvolvimento larval (GATEHOUSE *et al.*, 1999); de diminuir a fertilidade e fecundidade de fêmeas (DE LEO; GALLERANI, 2002; TELANG *et al.*, 2003; TAMHANE *et al.*, 2005); de causar deformidades (FRANCO *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2005b) e de aumentar a taxa de mortalidade dessas famílias de insetos pragas (MACEDO *et al.*, 2002; GOMES *et al.*, 2005a; ARAUJO *et al.*, 2005a). O primeiro passo para a escolha de um inibidor, como ferramenta para o controle de um determinado organismo, é baseado em ensaios *in vitro* onde se determina o grau de especificidade do inibidor pela enzima alvo (JONGSMA; BOLTER, 1997; DE LEO *et al.*, 2001; MACEDO *et al.*, 2003). A eficácia de um inibidor específico é dependente da compatibilidade estrutural do sítio reativo do inibidor com o sítio de especificidade das proteinases no organismo alvo (BROADWAY, 1996, 1997; JONGSMA *et al.*, 1995; GARCIA *et al.*, 2004). Neste sentido, vários inibidores purificados de sementes foram testados *in vitro*, como o inibidor de tripsina de sementes de *P. dubium*, denominado PDTI, que foi capaz de suprimir diferencialmente a atividade catalítica de enzimas digestórias semelhante à tripsina de vários lepidópteros. PDTI foi ineficiente para enzimas de *Sitotroga cerealella* e *Anticarsia gemmatalis*, inibiu moderadamente (60,00% de inibição) as enzimas de *D. saccharalis*, e inibiu as enzimas de *A. Kuehniella* em 95,00%. Após esta análise preliminar, foi feita uma avaliação *in vivo* deste inibidor. Quando incorporado em sistema de dieta artificial, esse inibidor reduziu em 66,00% o peso de larvas de *A. Kuehniella* provocando 56% de redução na sobrevivência de adultos (MACEDO *et al.*, 2003). Outro inibidor purificado de sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum*), denominado CaTI, apresentou atividade inibitória de 73,00 e 51,00% sobre proteinases digestórias de *A. grandis* e *S. frugiperda*, respectivamente. Quando esse inibidor foi incorporado em dieta artificial para *A. grandis*, foi observado retardo no desenvolvimento larval, além de mortalidade, de aproximadamente, 43% (GOMES *et al.*, 2005b). Proteinases serínicas de larvas de *L. oleraceae* foram

inibidas em 50,00% por SKTI. Estudos *in vivo*, mostraram que SKTI reduziu o crescimento e sobrevivência de larvas de *L. oleraceae* em 33,00 e 40,00%, respectivamente (GATEHOUSE *et al.*, 1999).

Ensaio de inibição *in vitro* para determinar a atividade dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca sobre proteinases serínicas presentes no homogenato intestinal de larvas de insetos Lepidopteras (*A. argillaceae* e *P. interpuctella*) e Díptera (*C. capitata*) foram realizados. Proteinases serínicas presentes no homogenato intestinal de larvas de *A. argillacea* foi fracamente inibida por JB2, JB3-1 e JB3-2 com percentual de inibição menor que 16,00%. Em adição, JB1 e JB4 inibiram essa atividade em 38,36 e 54,53%, respectivamente. Resultado similar foi observado para o inibidor de tripsina de sementes de *T. indica*, denominado TTI. Esse inibidor suprimiu a atividade de proteinases serínicas de *A. argillacea*, em aproximadamente, 54,00% (ARAUJO *et al.*, 2005a). Proteinases serínicas de *A. argillacea* foram inibidas em 98% pelo inibidor de tripsina purificado de sementes de *C. pallida*, denominado CpaTI, (GOMES *et al.*, 2005a). Enzimas digestórias semelhantes à tripsina presente no homogenato intestinal de larvas de *P. interpuctella* foram inibidas por JB3-2 e JB4 com percentual de inibição inferior a 38%, no entanto, essa atividade foi inibida entre 44,35 e 49,00% por JB1, JB2 e JB3-1. TTI suprimiu em, aproximadamente, 27,00% a atividade de proteinases serínicas de larvas de *P. interpuctella* (ARAUJO *et al.*, 2005a). Por outro lado, CapTI suprimiu essa atividade em 67,00% (GOMES *et al.*, 2005a). Proteinases serínicas presentes no homogenato intestinal de larvas de *C. capitata* foram inibidas em cerca de 66,00 e 70,00% por JB1 e JB2, respectivamente. O JB3-1, JB3-2 e JB4 foram menos efetivos para enzimas digestivas desse inseto inibindo essa atividade entre 29,44 e 37,47%. TTI suprimiu as enzimas digestórias desse inseto em 53,00% (ARAUJO *et al.*, 2005a). Entretanto, CapTI causou inibição máxima dessa atividade (GOMES *et al.*, 2005a).

Esses resultados mostraram maior interação entre o sítio ativo de proteinases serínicas presentes no homogenato intestinal de larvas de *A. argillacea* com o sítio reativo de JB4, e de proteinases serínicas de *C. capitata* com o sítio reativo de JB1 e JB2. Em adição, também foi observada uma compatibilidade estrutural moderada entre os sítios ativos de enzimas digestórias de *P. interpuctella* e os sítios reativos de JB1, JB2 e JB3-1. Desta maneira, a inibição substancial das proteinases

serínicas desses insetos *in vitro* sugerem que esses inibidores podem interferir no crescimento e desenvolvimento desses insetos quando incorporados em um sistema de dieta artificial.

Proteinases digestivas predominantes em insetos da ordem coleóptera da família bruquídeos pertencem à classe mecanística de proteinases aspárticas e cisteínicas (KITCH; MURDOCK, 1986; XAVIER-FILHO; COELHO, 1980; WIEMAN; NIELSEN, 1988; CAMPOS *et al.*, 1989; SILVA; XAVIER-FILHO, 1991). No entanto, no homogenato intestinal de larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, foi detectada a presença de proteinases serínicas envolvidas na digestão de proteínas da dieta (KITCH; MURDOCK, 1986; CAMPOS *et al.*, 1989; ISHIMOTO; CHRISPEELS, 1996; SILVA; TERRA; LIMA, 2001), sendo essa atividade no homogenato intestinal de larvas de *Z. subfasciatus* duas vezes mais ativa em comparação com essa mesma atividade no homogenato intestinal de *C. maculatus* (SILVA; TERRA; LIMA, 2001). A presença de proteinase serínica no homogenato intestinal desses bruquídeos indica que essa atividade pode ser efetivamente suprimida por inibidores de proteinases serínicas de plantas (MACEDO *et al.*, 2002; 2004; ARAUJO *et al.*, 2005a; GOMES *et al.*, 2005a). Neste sentido, foram realizados experimentos *in vitro* com o objetivo de determinar a especificidade dos inibidores de tripsina purificados de sementes de Jurema Branca sobre enzimas digestórias de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*. JB1, JB3-1 e JB3-2 não inibiram, eficientemente, as proteinases serínicas presentes no homogenato intestinal de larvas de *C. maculatus*. Por outro lado, foi observado que JB2 e JB4 inibiram, eficientemente, as proteinases serínicas de *C. maculatus* com 70,04 e 66,15% de inibição, respectivamente, sugerindo maior compatibilidade estrutural entre os sítios reativos desses inibidores com o sítio de especificidade das proteinases serínicas do inseto. Esses resultados foram similares aos observados em outros estudos. Recentemente, foi investigado o efeito de um inibidor de proteinase serínica da família Kunitz, denominado DMTI-II, sobre a atividade de enzimas digestórias de *C. maculatus*. Nesse estudo, foi observado que DMTI-II inibiu em 80,00% a atividade semelhante à proteinase serínica presente no homogenato intestinal de larvas de *C. maculatus* (MACEDO *et al.*, 2002). Outro inibidor de tripsina (CpaTI) eficientemente inibiu a atividade de proteinase serínica de *C. maculatus* em 75,00% (GOMES *et al.*, 2005a). O inibidor de tripsina purificado de sementes de *T. indica*, denominado TTI, suprimiu essa atividade em 87,00% (ARAUJO *et al.*,

2005a). Similarmente, Macedo e colaboradores (2004) observaram que o inibidor de sementes de *A. pavonina*, denominado ApTI, inibiu essa atividade em 75,00%. Os inibidores de tripsina purificados de Jurema Branca inibiram as proteinases serínicas presentes no homogenato intestinal de larvas de *Z. subfasciatus* com percentual de inibição entre 56,93 e 74,54%, sendo que JB2 foi o mais efetivo, inibindo essa atividade em, aproximadamente, 74,54%. Proteinases serínicas presentes no homogenato intestinal de larvas de *Z. subfasciatus* foram inibidas em 52,00% quando testadas *in vitro* com o inibidor de tripsina de sementes de *T. indica*, denominado TTI (ARAUJO *et al.*, 2005a), em 37,00% com o inibidor de sementes de *C. pallida* (GOMES *et al.*, 2005a), e em 60,00% com o inibidor de sementes de *A. pavonina*, denominado ApTI. O ApTI também foi efetivo sobre enzimas digestórias de *A. obtectus* (MACEDO *et al.*, 2004). Valores de inibição similares aos obtidos com os inibidores de sementes de Jurema Branca sobre as enzimas digestórias de coleópteras foram observados para outros inibidores Kunitz e proteinases serínicas de lepidópteras. Testes *in vitro* mostraram que o inibidor purificado de sementes de *C. obtusifolia*, denominado COTI, inibiu em 60,00% a atividade proteolítica semelhante à tripsina de larvas de *Pieris rapae* (LIAO *et al.*, 2007). O inibidor de sementes de *P. parviflora*, denominado PPTI, inibiu em 63,00, 57,00 e 42,00% as enzimas digestórias de *S. frugiperda*, *Corcyra cephalonica* e *A. kuehniella*, respectivamente (GARCIA *et al.*, 2004). O inibidor da família Kunitz, purificado de sementes de soja, denominado SKTI, suprimiu a atividade de proteinases serínicas de *S. litura* em 55,00%, similar ao efeito causado pelo inibidor purificado de sementes de *C. bonduc* sobre o mesmo inseto (BHATTACHARYYA; RAI; BABU, 2007), SKTI também inibiu em 61,00% enzimas semelhantes à tripsina de *S. exigua* (JONGSMA *et al.*, 1995).

As atividades inibitórias observadas para os inibidores purificados de sementes de Jurema Branca sobre enzimas digestórias de *Z. subfasciatus* foram maiores em comparação com as obtidas sobre *C. maculatus*. Esses resultados mostraram maior compatibilidade estrutural entre os sítios reativos dos inibidores com o sítio ativo de proteinases serínicas semelhantes à tripsina, presentes no homogenato intestinal de larvas de *Z. subfasciatus*. A compatibilidade estrutural também pode explicar a maior especificidade de JB2 e JB4 sobre as proteinases serínicas existentes no homogenato intestinal de larvas de *C. maculatus*. Em adição,

o fato de que as atividades sobre as proteinases serínicas serem mais ativas no homogenato intestinal de larvas de *Z. subfasciatus*, em comparação com as existentes no homogenato intestinal de larvas de *C. maculatus* (Silva; Terra; Lima, 2001), pode explicar a maior especificidade dos inibidores de sementes de Jurema Branca sobre as proteinases serínicas do intestino de larvas de *Z. subfasciatus*. Diferente das lepidópteras e dípteras, os insetos da ordem coleoptera, particularmente os bruquídeos (*A. obtectus*, *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*) expressam, preferencialmente, proteinases cisteínicas para a digestão de proteínas da dieta (MURDOCK *et al.*, 1987; LEMOS *et al.*, 1990; SILVA; XAVIER-FILHO, 1991). Por outro lado, os inibidores de tripsina purificados de sementes de Jurema Branca suprimiram a atividade catalítica da papaína, com exceção de JB4, indicando a bifuncionalidade desses inibidores. Essa bifuncionalidade também pode ser responsável pelos efeitos inibitórios observados sobre enzimas intestinais de larvas de *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*.

7 CONCLUSÕES

As massas moleculares, as potentes atividades inibitórias sobre a atividade catalítica da tripsina, bem como, as similaridades estruturais dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca, *P. dumosum*, com outros inibidores de sementes de leguminosas da família Kunitz são indicativos de que esses são os mais novos membros de inibidores de tripsina da família Kunitz;

A estabilidade dos inibidores purificados de sementes de Jurema Branca às variações de temperaturas e pHs pode sugerir a presença de pontes dissulfeto intramoleculares ou a presença de inúmeras pontes de hidrogênio;

Os inibidores purificados neste trabalho inibiram, *in vitro*, diferencialmente, enzimas proteolíticas pertencentes às classes mecanísticas das proteinases serínicas e cisteínicas;

A capacidade de inibir a atividade catalítica da tripsina e papaína revelou a bifuncionalidade de alguns desses inibidores;

Os inibidores purificados de sementes de Jurema Branca exibiram capacidade de inibir diferencialmente, *in vitro*, as enzimas digestórias de insetos pragas pertencentes a diferentes ordens;

A perspectiva que se abre em relação aos resultados dos ensaios *in vitro* obtidos com os inibidores de sementes de Jurema Branca é que estes possam afetar o crescimento e desenvolvimento de insetos quando forem incorporados em um sistema de dieta artificial e serem fortes candidatos aos programas de melhoramento via transgenia;

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, M.; ABE, K.; IWABUCHI, K.; DOMOTO, C.; ARAI, S. Corn cystatin I expressed in *Escherichia coli*: investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels. **Journal of biochemistry**, 116, 488–492, 1994.

ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin: molecular cloning and expression studies. **FEBS Letter**, 209, 932–937, 1992.

ABE, M.; ARAI, S. Some properties of a cysteine proteinase inhibitors from corn endosperm. **Agricultural and Biological Chemistry**, 55(9), 2417-2418, 1991.

ABE, K.; KONDO, H.; ARAI, S. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. **Agricultural and Biological Chemistry**, 51(1), 2763–2768, 1987.

ABE, J. I.; SIDENIUS, U.; SVENSON, B. Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. **Biochemical Journal**, 293, 151-155, 1993.

ABE, M.; WHITAKER, J. R. Purification and characterization of a cysteine proteinase inhibitor from the endosperm of corn. **Agricultural and Biological Chemistry**, 52(1), 1583-1588, 1988.

AGRIOS, G. N. How plants defend themselves against pathogens. In: **Plant pathology**, 3.^o ed. Academic Press, New York: 1988, p. 97-115.

AGUIAR, J. M.; FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; BLOCH JR, C.; MONTEIRO, A. C. S.; FLORES, V. M. Q.; JACINTO, T.; XAVIER-FILHO, J.; OLIVEIRA, A. E. A.; GROSSI-DE-AS, M. F.; FERNANDES, K. V. S. Molecular modeling and inhibitory activity of cowpea cystatin against bean bruchid pests. **PROTEINS: Structure, Function, and Bioinformatics**, 63, 662–670, 2006.

ALAM, N.; GOURINATH, S.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T. P. Substrate-inhibitor interactions in the kinetics of α -amylase inhibition by Ragi α -amylase/trypsin inhibitor (RATI) and its various N-terminal fragments. **Biochemistry**, 40, 4229-4233, 2001.

ALARCON, F. J.; MARTINEZ, T. F.; BARRANCO, P.; CABELLO, T.; DIAZ, M.; MOYANO, F. J. Digestive proteases during development of larvae of red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier, 1790) (Coleoptera: Curculionidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 32, 265-274, 2002.

ALVAREZ-ALFAGEME, F.; MARTINEZ, M.; PASCUAL-RUIZ, S.; CASTANERA, P.; DIAZ, I.; ORTEGO, F. Effects of potato plants expressing a barley cystatin on the predatory bug *Podisus maculiventris* via herbivorous prey feeding on the plant. **Transgenic Research**, 16, 1–13, 2007.

AMORIM NETO, M.; BELTRÃO, N. E. M. Zoneamento do algodão herbáceo no Nordeste. p.211-227 In: EMBRAPA ALGODÃO. **O agronegócio do algodão no Brasil**. Brasília: Embrapa Comunicação para transferência de tecnologia. 1023p. 1999.

ANDRADE JÚNIOR, A. S.; SANTOS, A. A.; SOBRINHO, C. A.; BASTOS, E. A.; MELO, F. B.; VIANA, F. M. P.; FREIRE FILHO, F. R.; CARNEIRO, J. S.; ROCHA, M. M.; CARDOSO, M. J. SILVA, P. H. S.; RIBEIRO, V. Q. Cultura de feijão caupi. Teresina/PI: **Embrapa Meio Norte, 2003. Circular técnica 28**. Disponível em: <http://sistemaproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi/pragas.htm>. Acesso em: 5 abr. 2007.

APPLEBAUM, S. W. Biochemistry of digestion. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I. (eds.) *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Pergamon Press, Oxford, 1985, p. 270-311.

ARAÚJO, C. L.; BEZERRA, I. W. L.; OLIVEIRA, A. S.; MOURA, F. T.; MACEDO, L. L. P.; GOMES, C. E. M.; BARBOSA, A. E. A. D.; MACEDO, F. P.; SOUZA, T. M. S.; FRANCO, O. L.; BLOCH-JR, C.; SALES, M. P. In vivo bioinsecticidal activity toward *Ceratitis capitata* (fruitfly) and *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and in vitro bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (*Tamarindus indica*) seeds. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 53, 4381-4387, 2005a.

ARAÚJO, A. P.; HANSEN, D.; VIEIRA, D. F.; OLIVEIRA, C.; SANTANA, L. A., BELTRAMINI, L. M.; SAMPAIO, C. A.; SAMPAIO, U. M.; OLIVA, M. L. Kunitz-type *Bauhinia bauhinoides* inhibitors devoid of disulfide bridges: isolation of the cDNAs, heterologous expression and structural studies. **Biological Chemistry**, 386, 561-568, 2005b.

ARAÚJO, C. L.; BEZERRA, I. W. L.; DANTAS, I. C.; LIMA, T. V. S.; OLIVEIRA, A. S.; MIRANDA, M. R. A., LEITE, E. L.; SALES, M. P. Biological activity of proteins from pupils of tropical fruits. **Food Chemistry**, 5, 107-110, 2004.

ARGALL, M. E.; BRADBURY, J. H.; SHAW, D. C. Amino-acid sequence of a trypsin/chymotrypsin inhibitor from giant taro (*Alocasia macrorrhiza*). **Biochimica et Biophysica Acta**, 1204 (2), 189-194, 1994.

ARY, M. B.; RICHARDSON, M.; SHEWRY, P. R. Purification and characterization of an insect α -amylase inhibitor/endochitinase from seeds of Job's Tears (*Coix lachryma-jobi*). **Biochimica et Biophysica Acta**, 913, 260-266, 1989.

AZARKAN, M.; DIBIANI, R.; GOORMAGHTIGH, E.; RAUSSENS, V.; BAEYENS-VOLANT, D. The papaya Kunitz-Type trypsin inhibitor is a highly stable β -sheet glycoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1764, 1063-1072, 2006.

BARNEBY, R. C.; GRIMES, J. W. Silk tree, guanacaste, monkey's earring: a generic system for the synandrous Mimosaceae of the Americas. Part I. *Abarema*, *Albizia*, and allies. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, 74(1), 144, 1996.

BASTOS, J. A. M. Avaliação dos prejuízos causados pelo gorgulho, *Callosobruchus maculatus*, em amostras de feijão-de-corda, *Vigna sinensis*, colhidos em Fortaleza, Ceará. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 8, 131-132, 1973.

BATISTA, I. F. C.; OLIVA, M. L. V.; ARAUJO, M. S.; SAMPAIO, U. M.; RICHARDSON, M.; FRITZ, H.; SAMPAIO, C. A. M. Primary structure of a kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds. **Phytochemistry**, 41, 1017-1022, 1996.

BAUDYS, M.; GOSH, M.; HARLOS, K.; MARES, M.; FUSEK, M.; KOSTKA, V.; BLAKE, C. C. F. Crystallization and preliminary crystallographic study of cathepsin D inhibitors from potatoes. **Journal of Molecular Biology**, 218, 21-22, 1991.

BEINTEMA, J. J. Structural features of plants chitinases and chitin binding proteins. **FEBS Letters**, 350, 159-163, 1994.

BELTRÃO, N. E. M.; BEZERRA, J. R. C. **Recomendações técnicas para o cultivo do algodoeiro herbáceo de sequeiro e irrigado, nas regiões Nordeste e Norte do Brasil**. Campina Grande, PB. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de Algodão. 1994. 74p. (EMBRAPA-CNPA. Circular Técnica, 17).

BERNARDI, R.; TEDESCHI, G.; RONCHI, S.; PALMIERI, S. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hubner (Lepidoptera: Pyralidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 26, 883-889, 1996.

- BEZERRA, I. W.; TEIXEIRA, F. M.; OLIVEIRA, A.; S.; ARAUJO, C. L.; LEITE, E. L.; QUEIROZ, K. C.; SALES, M. P. Alpha-amylase inhibitors from *ficus* sp seeds and their activities towards coleoptera insect pests. **Protein and Peptide Letters**, 11 (2), 181-187, 2004.
- BHAT, A. V.; PATTABIRAMAN, T. N. Protease inhibitors from jackfruit seed (*Artocarpus integrifolia*). **Journal of Bioscience**, 14 (4), 351-365, 1989.
- BHATTACHARYYA, A.; MZUMDAR, S.; LEIGHTON, S. M.; BABU, C. R. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: Purification, characterization, and kinetic properties. **Phytochemistry**, 67, 232-241, 2006.
- BHATTACHARYYA, A.; RAI, S.; BABU, C. R. A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Caesalpinia bonduc* seeds: Isolation, partial characterization and insecticidal properties. **Plant Physiology and Biochemistry**, 45, 169-177, 2007.
- BLOCH JR, C.; RICHARDSON, M. A new family of small (5 kD) protein inhibitors of insect α -amylase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) have sequence homologies with wheat purothionins. **FEBS Letters**, 279 (1) 101-104, 1991.
- BLUM, H.; BEIER, H.; GROSS, H. J. Improved Silver Staining of Plant-Proteins, Rna and DNA in Polyacrylamide Gels. **Electrophoresis**, 8 (2), 93-99, 1987.
- BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, 204, 433-451, 1992.
- BODE, W.; HUBER, R. Structural basis of the endoproteinases-protein inhibitor interaction. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1477, 241-252, 2000.
- BOHLMANN, H.; APEL, K. Thionins. **Annual Review of Plant Physiology**, 42, 227-240, 1991.
- BOLTER, C.J. Methyl jasmonate induces papain inhibitor(s) in tomato leaves. **Plant Physiology**, 103, 1347-1353, 1993.
- BONADÉ-BOTTINO, M.; LERIN, J.; ZACCOMER, B.; JOUANIN, L. Physiological adaptation explains the insensitivity of *Baris coerulescens* to transgenic oilseed rape expressing oryzacystatin I. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 29 (2), 131-138, 1999.

BOSTERLING, B; QUAST, U. Soybean trypsin inhibitor (Kunitz) is doubleheaded. Kinetics of the interaction of alpha-chymotrypsin with each site. **Biochimica et Biophysica Acta**, 657, 58-72, 1981.

BOTELLA, M. A.; XU, Y.; PRABHA, T. N.; ZHAO, Y.; NARASIMHAN, M. L.; WILSON, A.; NIELSEN, S. S.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, E. P. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. **Plant physiology**, 112, 1201–1210, 1996.

BOULTER, D.; EDWARDS, G. A.; GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J.A.,HILDER, V. A. Additive protective effects of incorporating two different higher plant derived insect resistance genes in transgenic tobacco plants. **Crop protection**, 9,351-354, 1990.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; JPGSMA, M. A.; GATEHOUSE, J. A. Characterization of cysteine proteinases responsible for digestive proteolysis in gut of larval western corn rootworm (*Diabrotica virgifera*) by expression in the yeast *Pichia pastoris*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 34, 305-320, 2004.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. **Analytical Biochemistry**, 72, 218-254, 1976.

BROZE, G. J.; GIRARD, T. J.; NOVOTNY, W. F. Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor. **Biochemistry**, 29, 7539-7546, 1990.

BROADWAY, R. M. Plant dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 32, 39–53, 1996.

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

BRZIN, J.; KIDRIC, M. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, 13, 421-467, 1995.

BRZIN, J.; POPOVIC, T.; RITONJA, A.; PUIZDAR, V.; KIDRIC, M. Related cystatin inhibitors from leaf and from seed of *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Science**, 138, 17–26, 1998.

BUENO, N. R.; FRITZ, H.; AUERWALD, E. A.; MENTELE, R.; SAMPAIO, M.; SAMPAIO, C. A. M.; OLIVA, M. L. V. Primary structure of *Dioclea glabra* trypsin inhibitor, DgTI, um Bowman-Birk inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 261, 838-843, 1999.

CALDWELL, J. B.; STRIKE, P. M.; KORTT, A. A. Amino acid sequence of the acidic Kunitz-type trypsin inhibitor from winged-bean seed [*Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC]. **Journal of protein chemistry**, 9 (4), 493-499, 1990.

CAMPOS, J. E.; WHITAKER, J. R.; YIP, T. T.; HUTCHENS, T. W.; BLANCO-LABRA, A. Unusual structural characterization and complete amino acid sequence of a protease inhibitor from *Phaseolus acutifolius* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, 42, 209-214, 2004.

CAMPOS, F. A. P.; XAVIER-FILHO, J.; SILVA, C. P.; ARY, M. B. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). **Comparative Biochemistry and Physiology, part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 92, 51-57, 1989.

CARDONA, C.; KORNEGAY, J.; POSSO, C. E.; MORALES, F.; RAMIREZ, H. Comparative values of four arcelin variants in the development of dry bean lines resistant to the Mexican bean weevil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 56, 197-206, 1990.

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

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

CASU, R. E.; JARMEY, J. M.; ELVIN, C. M.; EISEMANN, C. H. Isolation of a trypsin-like serine protease gene family from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. **Insect Molecular Biology**, 3, 159-70, 1994.

CAVALCANTI, M. S. M.; OLIVA, M. L.V.; FRITZ, H.; JACHUM, M.; MENTELE, R.; SAMPAIO, M.; COELHO, L. C. B. B.; BATISTA, I. F.C.; SAMPAIO, C. A. M. Characterization of a kunitz trypsin inhibitor with one disulfide bridge purified from *Swartzia pickellii*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 29, 635-639, 2002.

CHARITY, J. A.; ANDERSON, M. A.; BITTISNICH, D. J.; WHITECROSS, M.; HIGGINS, T. J. V. Transgenic tobacco and peas expressing a proteinase inhibitor from *Nicotinia glauca* have increased insect resistance. **Molecular Breeding**, 1995, 5, 357-365.

CHENG, Y. C.; PRUSOFF, W. H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. **Biochemical Pharmacology**, 22, 3099-3108, 1973.

CHESIN, M.; ZIPF, A. E. Alam systems in higher plants. **The Botanical Review**, 56, 193-235, 1990.

CHRISPEELS, M. J.; RAIKHEL, N. V. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. **The Plant Cell**, 3, 1-10, 1991.

CHRISPEELS, M. J.; GROSSI-DE-SA, M. F.; HIGGINS, T. J. V. Genetic engineering with α -amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. **Seed Science Research**, 8, 257-263, 1998.

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

CIPRIANI, G.; MICHAUD, F.; BRUNELLE, A.; GOLMIRZAIE, A.; ZHANG, D. P. Expression of soybean proteinase inhibitor in sweetpotato. **CIP Program Report**, 1997-98, 271-277, 1999.

CLOUTIER, C.; JEAN, C.; FOURNIER, M.; YELLE, S.; MICHAUD, D. Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over production of insensitive proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 44, 69-81, 2000.

COLEBATCH, C. M.; EAST, P.; COOPER, P. Preliminary characterization of digestive proteases of the green mirid *Creontides dilutus* (Hemiptera: Miridae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 31, 415-423, 2001.

COLLINGE, D. B.; KRAGH, K. M.; MIKKELSEN, J. D.; NIELSEN, K. K.; RASMUSSEN, U.; VAD, K. Plant chitinase. **The Plant Journal**, 3, 31-40, 1993.

COX, P. D.; BELL, C. H. Biology and ecology of moth pests of stored food. In: Gorham, J.R. (Ed.), **Ecology and Management of Food-Industry Pests**. FDA Technical Bulletin 4, Association of Official Analytical Chemistry, Arlington, VA, p. 181–193, 1991.

CRISTOFOLETTI, P. T.; RIBEIRO, A. F.; DERAISON, C.; RAHBE, Y.; TERRA, W. R. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. **Journal of Insect. Physiology**, 49, 11-24, 2003.

CRISTOFOLETTI, P. T.; RIBEIRO, A. F.; TERRA, W. R. The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: Sequence, properties, immunocytochemical localization and function. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 35, 883-901, 2005.

CRUZ-SILVA, I; GOZZO, A. J; NUNES, V. A; CARMONA, A. K; FALJONI-ALARIO, A; OLIVA, M. L. V; SAMPAIO, U. M; SAMPAIO, C. A. M; ARAÚJO, M. S. A proteinase inhibitor from *Caesalpinia echinata* (pau-Brail) seeds for plasma kallikrein, plasmin and factor XIIIa. **Biological Chemistry**, 385, 1083-1086, 2004.

DASGUPTA, J.; SEN.; U.; DATTAGUPTA, J. K. In silico mutations and molecular dynamics studies on a winged bean chymotrypsin inhibitor protein. **Protein Engineering**, 16 (7), 489-496, 2003.

DATTAGUPTA, J. K.; PODDER, A.; CHAKRABARTI, C.; SEM, U.; MUKHOPADHYAY, D.; DUTTA, S. K.; SING, M.; Refined crystal structure (2.3 Å) of a double-headed winged bean alpha-chymotrypsin inhibitor and location of its second reactive site. **Proteins**, 35, 321-331, 1999.

DAYLER, C. S. A.; MENDES, P. A. M.; PRATES, M. V.; BLOCH JR, C.; FRANCO, O. L.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Identification of a novel bean α -amylase inhibitor with chitinolytic activity. **FEBS Letters**, 579, 5616-5620, 2005.

DEAN, R.; KUC, J. Induction systemic protection in cucumber. The source of the signal. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, 28, 227-233, 1986.

DE LEO, F.; BONADE-BOTINO, M.; CECI, R. L.; GALERANI, R.; JOUANIN, L. Effects of mustard trypsin inhibitors expressed in different plants on three different lepidopteran pests. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 31, 593-602, 2001.

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

DELGADO-VARGAS, F.; LÓPEZ-VALDÉS, H. E.; VALDES-RODRIGUEZ, S.; BLANCO-LABRA, A.; CHAGOLLA-LOPEZ, A.; LOPEZ-VALENZUELA, E. J. Isolation and properties of a Kunitz-type protein inhibitor obtained from *Pithecellobium dulce* seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 6115-6121, 2004.

DE OLIVEIRA, C.; SANTANA, L. A.; CARMONA, A. K.; CEZARI, M. H.; SAMPAIO, U. M.; SAMPAIO, C. A.; OLIVA, M. L. Structure of cruzipain/cruzain inhibitors isolated from *Bauhinia bauhinoides*. **Biological Chemistry**, 382, 847-852, 2001.

DESHIMARU, M.; WATANABE, A.; SUEMATSU, K.; HATANO, M. Purificação, amino acid sequence, and cDNA cloning of trypsin inhibitors from Onion (*Allium cepa* L.) bulbs. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 67, 1653-1659, 2003.

DI CIERO, L.; OLIVA, M. L. V.; TORQUATO, R.; KOHLER, P.; WEDER, J. K. P.; NOVELLO, J. C.; SAMPAIO, C. A. M.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. The complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from *Bauhinia variegata* var. cãndida seeds. **Journal of Protein Chemistry**, 17, 827-834, 1998.

DIOP, N. N.; KIDRI, M.; REPELLIN, A.; GAREIL, M.; D'ARCY-LAMETA, A.; THI, A. T. P.; ZUILY-FODIL, Y. A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. **FEBS Letters**, 577 (3), 545-550, 2004.

EDMOND, H. S.; GATEHOUSE, L. N.; HILDER, V. A.; GATEHOUSE, J. A. The antimetabolic effects of oryzacystatin on larvae of the Southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*): use of a bacterial expression system for oryzacystatin. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 78, 83-92, 1996.

ELPIDINA, E. N.; TSYBINA, T. A.; DUNAEVSKY, Y. E.; BELOZERSKY, M. A.; ZHUZHNIKOV, D. P. OPPERT, B. A chymotrypsin-like proteinase from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. **Biochimie**, 87, 771-779, 2005.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br>>. Acesso em: 3 mar. 2007.

EMBRAPA MEIO-NORTE. **Cultivo de Feijão-caupi**. CT 20. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijão/FeijãoCaupi/pragas.htm>>. Acesso em: 3 mar. 2007.

ERLANGER, B. F.; KOLOWSKY, N.; COHEN, W. The action of chymotrypsin on two chromogenic substrates. **Archives of Biochemistry**, 95, 271-278, 1961.

FABRICK, J.; BEHNKE, C.; CZAPLA, T.; BALA, K.; RAO, A. G.; KRAMER, K. J.; REECK, G. R. Effects of a potato cysteine proteinase inhibitor on midgut proteolytic enzyme activity and growth of the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 32, 405–415, 2002.

FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, 41, 761-766, 2003.

FAN, S. G.; WU, G. J.. Characteristic of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, 46, 273-292, 2005.

FANG, H. J.; LI, D. L.; WANG, G. L.; LI, Y. H. Na insect-resistant transgenic cabbage plant with the cowpea trypsin inhibitor (CpTI) gene. **Acta botanica Sinica**, 39, 940-945, 1997.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Statistical Databases**. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 10 mar. 2007.

FENG, G. H.; RICHARDSON, M.; CHEN, M. S.; KRAMER, K. J.; MORGAN, T. D.; REECK, G. R. Amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human amylases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 26, 419-426, 1996.

FERNANDES, K. V. S.; SABELLI, P. A.; BARRATT, D. H. P.; RICHARDSON, M.; XAVIER-FILHO, J.; SHEWRY, P. R. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase-inhibitors. **Plant Molecular Biology**, 23, 215–219, 1993.

FOISSAC, X.; EDWARDS, M. G.; DU J. P.; GATEHOUSE, A. M.; GATEHOUSE, J. A. Putative protein digestion in a sap-sucking homopteran plant pest (rice brown plant hopper; *Nilaparvata lugens*: Delphacidae)--identification of trypsin-like and cathepsin B-like proteases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 32, 967-978, 2002.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; BLOCH JR, C.; SILVA, C. P.; GRAOSSI-DE-SA, M. F. Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -

amylase and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry**, 267 (8), 1466-1473, 2000.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; FRANCISLETE R. MELO, F. R.; GROSSI-DE-AS, M. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: Structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, 269, 397-412, 2002.

FRANCO, O. L.; DIAS, S. C.; MAGALHÃES, C. P.; MONTEIRO, A. C. S.; BLOCH-JR, C.; MELO, F. R.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SÁ, M. F. Effects of soybean kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). **Phytochemistry**, 65, 81-89, 2004.

FRANCO, O. L.; MELO, F. R.; MENDES, P. A.; PAES, N. S.; YOKOYAMA, M.; COUTINHO, M. V.; BLOCH JR, C.; GROSSI-DE-AS, M. F. Characterization of two *Achanthoscelides obtectus* α -amylases and their inactivation by wheat inhibitors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53, 1585-1590, 2005.

FRIZZAS, M. R.; CUNHA, U. S.; MACEDO, L. P. M. Plantas transgênicas resistentes a insetos. **Revista Brasileira de Agrociência**, 10, 13-18, 2004.

FUSCALDI, K. C.; PRADO, G.R. Análise econômica da cultura do feijão. **Revista de Política Agrícola**, 1, 17-30, 2005.

GADDOUR, K.; VICENTE-CARBAJOSAC, C. J.; LARAC, P.; ISABEL-LAMONEDA, I.; DIAZ, I.; CARBONERO, P. A constitutive cystatin-encoding gene from barley (*Icy*) responds differentially to abiotic stimuli. **Plant Molecular Biology**, 45, 599-608, 2001.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA-NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATIST, G. C.; BERTI-FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCHINI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D. **Manual de entomologia Agrícola**. Ed. Ceres, São Paulo. p. 486, 1988.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C. de; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Entomologia agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 2002. 920 p. (Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz, 10).

GAO, Y. F.; ZHU, Z.; XIAO, G. F.; ZHU, Y.; WU, Q.; LI, X. H. Isolation of soybean kunitz trypsin inhibitor gene and its application in plant insect-resistant genetic engineering. **Acta Botanica Sinica**, 40, 405-411, 1998.

GARCIA, V. L.; FREIRE, G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MACEDO, M. L. R. Trypsin inhibitor from *Poecilantha parviflora* seeds: Purification, characterization, and activity against pest protease. **The Protein Journal**, 23, 343-350, 2004.

GARCIA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; SEGURA, A.; MORENO, M. The defense role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. **Trends in Microbiology**, 3, 72-74, 1995.

GARCIA-OLMEDO, F.; SALCEDO, G.; SANCHEZ-MONGE, R.; HERNANDEZ-LUCAS, C.; CARMONA, M. J.; LOPEZ-FANDO, J. J.; FERNANDEZ, J. A.; GOMEZ, L.; ROYO, J.; GARCIA-MAROTO, F.; CASTAGNARO, A.; CARBONERO, P. Trypsin/ α -amylase inhibitors and thionins: possible defense proteins from barley. In: **Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology** (Shewry, P. R. ed.), CAB International, p. 335-350, 1992. Wallingford, UK.

GATEHOUSE, A. M. R.; KITCH, K. J.; FENTON, K. A.; GATEHOUSE, J. A. Presence and partial characterization of a major proteolytic enzyme in the larval gut of *Callosobruchus maculatus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 39, 279-286, 1985.

GATEHOUSE, A. M. R., BOULTER, D., HILDER, V. A. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. In: **Biotechnology in Agriculture, Plant Genetic Manipulation for Crop Protection**, CAB International, 7, 155-181, 1992.

GATEHOUSE, A. M. R.; SHU, Y.; POWELL, K. S.; BROUGH, C.; HILDER, V. A.; HAMILTON, W. D. O.; NEWLL, C. A.; MERRYWEATHER, A.; BOULTER, D.; GATEHOUSE, J. A. Approaches to insect resistance using transgenic plants. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, 342, 279-286, 1993.

GATEHOUSE, A. M. R.; DAVISON, G.; NEWLL, C. A.; MERRYWEATHER, A.; HAMILTON, W. D. O.; BURGESS, E. J.; GILBERT, R. J. C.; GATEHOUSE, J. A. Transgenic potato plants with enhanced resistance to the tomato moth, *Lacanobia oleracea*. **Molecular Breeding**, 3, 49-63, 1997.

GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Pesticide Science**, 52, 165-175, 1998.

GATEHOUSE, A. M.; NORTON, E.; DAVISON, G. M.; BARBE, S. M.; NEWELL, C. A.; GATEHOUSE, J. A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. **Journal of Insect Physiology**, 45, 545-558, 1999.

GIRARD, C.; LE METAYER, M.; BONADE-BOTTINO, M.; PHAMDELEGUE, M. H.; JOUANIN, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be proteolytic cleavage in beetle larvae. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 28, 229-237, 1998a.

GIRARD, C.; LE METAYER, M.; ZACCOMER, B.; BARTLET, E.; WILLIAMS, I.; BONADE-BOTTINO, M.; PHAM-DELEGUE, M. H.; JOUANIN, L. Growth stimulation of beetle larvae reared on a transgenic oilseed rape expressing a cysteine proteinase inhibitor. **Journal of Insect Physiology**, 44, 263–270, 1998b.

GOMES, C. E. M; BARBOSA, E. A. D; MACEDO, L. L. P; PITANGA, J. C. M; MOURA, F. T; OLIVEIRA, A. S; MOURA, R. M; QUEIROZ, A. F. S; MACEDO, F. P; ANDRADE, L. B. S; VIDAL, M. S; SALES, M. P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). **Plant Physiology and Biochememistry**, 46, 1095-1102, 2005a.

GOMES, A. P. G.; SIMONI C. DIAS, S. C.; CARLOS BLOCH JR., C.; MELO, F. R; FURTADO JR, J. R.; MONNERAT, R. G.; MARIA F. GROSSI-DE-SA, M. F.; FRANCO, O. L. Toxicity to cotton boll weevil *Anthonomus grandis* of a trypsin inhibitor from chickpea seeds. **Comparative Biochemistry and Physiology, part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 140, 313–319, 2005b.

GOODCHILD, A. J. P. Evolution of the alimentary canal in the Hemiptera. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**. 41, 97-140, 1966.

GOTTSTEIN, H. D.; KUC, J. Induction of systemic resistance in cucumber by phosphates. **Phytopathology**, 79, 176-179, 1989.

GRAHAM, J.; McNICOL, R. J.; GREIG, K. Towards genetic based insect resistance in strawberry using cowpea trypsin inhibitor. **The Annals of Applied Biology**, 127, 163-173, 1995.

GRAHAM, J.; GORDON, S. C.; McNICOL, R. J. The effect of the CpTI gene in strawberry against attack by vine weevil (*Otiorhynchus sulcatus* F. Coleoptera:Curculionidae). **The Annals of Applied Biology**, 131, 133-139, 1997.

GROSSI DE SÁ, M. F.; CHRISPEELS, M. J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) amylase cDNA and interaction of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 27, 271-278, 1997a.

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

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

GRUDEN, K.; POPOVIC, T.; CIMERMAN, N.; KRIZAJ, I.; STRUKELJ, B. Diverse enzymatic specificities of digestive proteases, "intestains", enable Colorado potato beetle larva to counteract the potato defense mechanism. **Biological Chemistry**, 384, 305-310, 2003.

GRUDEN, K.; STRUKELJ, B.; RAVNIKAR, M.; POLJSK-PRIJATELJ, M.; MAVRIC, I.; BRZIN, J.; PUNGERCAR, J.; KREGAR, I. Potato cysteine proteinase inhibitor gene family: molecular cloning, characterisation and immunocytochemical localisation studies. **Plant Molecular Biology**, 34 (2), 317-323, 1997.

GRUEN, L. C.; TAO, Z. J.; KORTT, A. A. Stability and physicochemical properties of a trypsin inhibitor from winged bean seed (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC). **Biochimica et Biophysica Acta**, 791 (3), 285-293, 1984.

HAMMOND-KOSACK, K. E.; JONES, J. D. G. Resistance gene-dependent plant defense response. **The Plant Cell**, 8, 1773-1791, 1997.

HARSULKAR, A. M.; GIRI, A. P.; PATANKAR, A. G.; GUPTA, V. S.; SAINANI, M. N.; RANJEKAR, P. K.; DESHPANDE, V. V. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. **Plant Physiology**, 121, 497-506, 1999.

HARTWECK, L. M.; OSBORN, T. C. Altering protein composition by genetically removing phaseolin from common bean seeds containing arcelin or phytohemagglutinin. **Theoretical and Applied Genetics**, 95, 1012-1017, 1997.

HARTWECK, L. M.; CARDONA, C.; OSBORN, T. C. Bruchid resistance of common bean lines having an altered seed protein composition. **Theoretical and Applied Genetics**, 95, 1018-1023, 1997.

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

HAQ, S. K.; KHAN, R. H. Characterization of a proteinase inhibitor from *Cajanus cajan* (L.). **Journal of Protein Chemistry**, 22 (6), 543-554, 2003.

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

HATANO, K; KOJIMA, M.; TANOKURA, M; TAKAHASHI, K. Primary structure, sequence-specific ¹H-NMR assignments and secondary structure in solution of bromelain inhibitor VI from pineapple stem. **European Journal of Biochemistry**, 232 (2), 335-43, 1995.

HATANO, K-I.; KOJIMA, M. TANOKURA, M.; TAKAHASHI, K. Solution Structure of bromelain inhibitor VI from pineapple stem: Structural similarity with Bowman-Birk trypsin/chymotrypsin inhibitor from soybean. **Biochemistry**, 35, 5379-5384, 1996.

HATANO, K; TANOKURA, M; TAKAHASHI, K. The amino acid sequences of isoforms of the bromelain inhibitor from pineapple stem. **Journal of Biochemistry**, 124 (2), 457-461, 1998.

HEINRIKSON, R. L.; KEZDY, F. J. A novel bifunctional mechanism of surface recognition by phospholipase A2. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 279, 37-47, 1990.

HILDER, V. A.; GETEHOUSE, A. M. R.; SHEERMAN, S.E.; BAKER, R. F.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, 330, 160-163, 1987.

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

HIRASHIKI, I.; OGATA, F.; YOSHIDA, N.; MAKISUMI, S.; ITO, A. Purification and complex formation analysis of a cysteine proteinase inhibitor (cystatin) from seeds of *Wisteria floribunda*. **Journal of Biochemistry**, 108, 604-608, 1990.

HOUSEMAN, J. G.; DOWNE, A. E. R. Endoproteinase activity in the posterior midgut of the *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Biochemistry**, 17, 363-366, 1980.

HOUSEMAN, J. G.; DOWNE, A. E. R. Exopeptidase activity in the posterior midgut of *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Biochemistry**, 11, 579-582, 1981.

HOUSEMAN, J. G.; MORRISON, P. E.; DOWNE, A. E. R. Cathepsin B and aminopeptidase in the posterior midgut of *Phymata wolffii* (Hemiptera: Phymatidae). **Canadian Journal of the Zoology**, 63, 1288-1291, 1985.

HUNG, C-H; LEE, M-C; LIN, J-Y. Inactivation of *Acacia confusa* trypsin inhibitor by site-specific mutagenesis. **FEBS Letters**, 353, 312-314, 1994.

IBRAF, I. B. D. F.-. **Exportação por país de destino**. Disponível em: <www.ibraf.org.br/x-es/f-esta.html>. Acesso em: (21/03/2007).

IRIE, K.; HOSOYAMA, H.; TABEUCHI, T.; IWABUCHI, K.; WATANABE, H.; ABE, M.; ABE, K.; ARAI, S. Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteinases. **Plant Molecular Biology**, 30, 149-157, 1996.

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

ISHIMOTO, M., KITAMURA, M. Tolerance to the seed α -amylase inhibitor by the 2 insect pests of the common bean, *Zabrotes subfasciatus* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae). **Applied Entomology and Zoology**, 27, 243-251, 1992.

ISHIMOTO, M.; SATO, T.; CHRISPEELS, M. J.; KITAMURA, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α -amylase inhibitor of common bean. **Entomologica Experimentalis et Applicata**, 79, 309-315, 1996.

ISHIMOTO, M.; YAMADA, T.; KAGA, A. Insecticidal activity of an K-amylase inhibitor-like protein resembling a putative precursor of K-amylase inhibitor in the common bean, *Phaseolus vulgaris* L. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1432, 104-112, 1999.

IWANAGA, S.; YAMASAKI, N.; KIMURA, M.; KOUZUMA, Y. Contribution of conserved Asn residues to the inhibitory activities of kunitz-type protease inhibitors from plants. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 69 (1), 220-223, 2005.

JACINTO, T.; FERNANDES, K. V. S.; MACHADO, O. L. T.; SIQUEIRA-JUNIOR, C. L. Leaves of transgenic tomato plants overexpressing prosystemin accumulate high levels of cystatin. **Plant Science**, 138, 35–42, 1998.

JOHNSON, J. A.; WOFFORD, P. L.; WHITEHAND, L. C. Effect of diet and temperature on development rates, survival, and reproduction of the Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology**, 85, 561–566, 1992.

JOHNSON, J.A.; WOFFORD, P.L.; GILL, R.F. Developmental thresholds and degree-day accumulations of Indian meal moth (Lepidoptera: Pyralidae) on dried fruits and nuts. **Journal of Economic Entomology**, 88, 734–742, 1995a.

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

JONGSMA, M. A.; BAKKER, P. L.; PETERS, J.; BOSCH, D.; WILLEM J. STIEKEMA, W. J. Adaptation of *Spodoptera exigua* larvae to plant proteinase inhibitors by induction of gut proteinase activity insensitive to inhibition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 92, 8041-8045, 1995.

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

JOSHI, B. N.; SAINANI, M. N.; BASTAWADE, K. B.; GUPTA, V. S.; RANJEKAR, P. K. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 246, 382– 387, 1998.

JOUANIN, L.; BONADE-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance, **Plant Science**, 131, 1-11, 1998.

KADER, J. C. Lipid transfer proteins: a puzzling family of plant proteins. **Trends in Plant Science**, 2, 66-70, 1997.

KASAHARA, K.; HAYASAKI, K.; ARAKAWA, T.; PHILO, J.S.; WEN, J.; YAMAGUSHI, H. Complete sequence subunit structure, and complexes with pancreatic amylase of in amylase amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney beans. **Journal of Biochemistry**, 250, 8030-8037, 1996.

KHAMRUI, S.; DASGUPTA, J.; DATTA GUPTA, J.; SEN, U. Single mutation at P1 of a chymotrypsin inhibitor changes it to a trypsin inhibitor: X-ray structural (2.15Å) and biochemical basis. **Biochemica et Biophysica Acta**, 1752, 65-72, 2005.

KIM, J. Y.; CHUNG, Y. S.; PAEK, Y. I.; KIM, J. K.; YU, S. N.; OH, B. J.; SHIN, J. S. Isolation and characterization of a cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor, induced upon flower maturation in carnation using suppression subtractive hybridization. **Molecules and Cells**, 31 (9), 392-397, 1999.

KIMURA, K.; IKEDA, T.; FUKUMOTO, D.; YAMASAKI, N.; YONEKURA, M. Primary structure of a cysteine proteinase inhibitor from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 59, 2328-2329, 1995.

KIMURA, M.; KOUZUMA, Y.; YAMASAKI, N. Amino acid sequence of chymotrypsin inhibitor ECI from the seeds of *Erythrina variegata* (Linn.) var. Orientalis. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 57(1), 102-6, 1993.

KITCH, L. W.; MURDOCK, L. L. Partial characterization of a major gut thiol proteinase from larvae of *Callosobruchus maculatus* F. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 3, 561-575, 1986.

KOGAN, M. Natural chemicals in plant resistance to insects. Iowa State **Journal Research**, 60, 501-527, 1986.

KLUH, I.; HORN, M.; HYBLOVA, J.; HUBERT, J.; DOLECKOVA-MARESOVA, L.; VOBURKA, Z.; KUDLIKOVA, I.; KOCOUREK, F.; MARES, M. Inhibitory specificity and insecticidal selectivity of alpha-amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. **Phytochemistry**, 66 (1), 31-39, 2005.

KOIDE, T.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitors: Amino acid sequence of the carboxyl-terminal region and the complete amino acid sequence of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). **European Journal of Biochemistry**, 32, 417-431, 1973.

KOIWA, H.; SUBRAMANIAN, L.; SHADE, R. E.; ZHU, K. Y.; NIELSEN, S. S.; MURDOCK, L. L.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Insecticidal activities of soybean cysteine proteinase inhibitors are correlated with their papain-binding affinities as phage-displayed proteins. **Plant Physiology**, 114, 1115-1120, 1997.

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

KOIWA, H.; SHADE, R. E.; ZHU-SALZMAN, K.; D'URZO, M. P.; MURDOCK, L. L.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive cysteine proteinases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). **FEBS Letter**, 471, 67-70, 2000.

KONDO, H.; ABE, K.; NISHIMURA, I.; WATANABE, H.; EMORI, Y.; ARAI, S. Two distinct cystatin in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. **The Journal of Biological Chemistry**, 265, 15832-15837, 1990.

KOO, J. C.; CHOI, Y. J.; LIM, C. O.; YOON, H. W.; HONG, J. C.; BAHK, J. D.; CHOI, Y. D.; CHO, M. J. Construction of insect resistant transgenic tobacco plants by expression of soybean Kunitz trypsin inhibitor. **Molecules and cells**, 2, 321-327, 1992.

KORTT, A. A.; JERMYN, M. A. Acacia proteinase inhibitors. Purification and properties of the trypsin inhibitors from *Acacia elata* seed. **European journal of biochemistry**, 115, 551-557, 1981.

KOUZUMA, Y.; KAWANO, K.; KIMURA, M.; YAMASAKI, N.; KADOWAKI, T.; YAMAMOTO, K. Purification, characterization and sequencing of two cysteine proteinase inhibitors, *Sca* and *Scb*, from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **Journal of Biochemistry**, 119, 1106-1113, 1996.

KOUZUMA, Y.; INANAGA, H.; DOI-KAWANO, K.; YAMASAKI, N.; KIMURA, M. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor with three cystatin domains from sunflower seeds. **Journal of Biochemistry**, 128, 161-166, 2000.

KRAUCHENCO, S.; NAGEM, R. A. P.; SILVA, J. A.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Three-dimensional structure of an unusual kunitz (STI) type trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorfii*. **Biochimie**, 86, 167-172, 2004.

KRAUCHENCO, S.; PANDO, S. C.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Crystal structure of the kunitz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 312, 1303-1308, 2003.

KRIZAJ, I.; DROBNIC-KOSOROK, M.; BRZIN, J.; JERALA, R.; TURK, V. The primary structure of inhibitor of cysteine proteinases from potato. **FEBS Letter**, 333 (1-2), 15-20, 1993.

LAEMMLI, V. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680-685.

LAM, W.; COAST, G. M.; RAYNE, R. C. Characterization of two chymotrypsin from the midgut of *Lacustra migratoria*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 29, 85-94, 1999.

LAM, W.; COAST, G. M.; RAYNE, R. C. Characterization of multiple trypsins from the midgut of *Lacustra migratoria*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 30, 85-94, 2000.

LASKOWSKI, M. JR.; E KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review Biochemistry**, 49, 593-626, 1980.

LAWRENCE, J. C.; NIELSEN, S. S. Partial isolation and characterization of a cysteine proteinase inhibitor from lima bean (*Phaseolus lunatus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, 1020-1025, 2001.

LAWRENCE, P. L.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electronic Journal of Biotechnology**, 5 (1), 93-109, 2002.

LE BERRE-ANTON, V.; NAHOUM, V.; PAYAN F.; ROUGÉ, P. Molecular basis for the specific binding of different amilase inhibitors from *Phaseolus vulgaris* seeds to the active site of amilase. **Plant Physiology and Biochemistry**, 38, 657-665, 2000.

LECARDONNEL, A.; CHAUVIN, L.; JOUANIN, L.; BEAUJEAN, A.; PREVOST, G.; SANGWAN-NORREEL, B. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. **Plant Science**, 140, 71-79, 1999.

LEE, S. I.; LEE, S. H.; KOO, J. C.; CHUN, H. J.; LIM, C. O.; MUN, J. H.; SONG., Y. H.; CHO, M. J. Soybean kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confer resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) in transgenic rice. **Molecular Breeding**, 5, 1-9, 1999.

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

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

LEMOS, F. J. A.; CAMPOS, F. A. P. SILVA, C. P., XAVIER-FILHO, J. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 56, 219-227, 1990.

LENARCIC, B.; RITONJA, A.; DOLENC, I.; STOKA, V.; BERBIC, S; PUNGERCAR, J.; STRUKELJ, B.; TURK, V. Pig leukocyte cysteine proteinase inhibitor (PLCPI), a new member of the stefin family. **FEBS Letter**, 336(2),289-292, 1993.

LEONARD, B.R.; GRAVES, J. B.; ELLSWORTH, P. C. Insect and mite pests of Cotton. In: SMITH, C. Wayne; COTHREN, J. Tom. **Cotton: origin, history, technology and production**. New York: John Wiley & Sons. 491-493, 1999.

LEPLE, J. C.; BONADE-BOTTINO, M.; AUGUSTIN, S.; PILATE, G. Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase inhibitor. **Molecular Breeding**, 1, 319–328, 1995.

LEVLEVA, E. V.; RUDENSKAYA, Y. A.; DUNAEVSKY, Y. E.; MOSOLOV, V. V. A 7.5-kD inhibitor of cysteine proteinases from pumpkin seeds. **Biochimie**, 62, 551-644, 1997.

LIAO, H.; REN, W.; KANG, Z.; JIANG, J-H.; ZHAO, X-J.; DU, L-F. A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*. **Biotechnology letters**, 29 (4), 653-658, 2007.

LIN, J. Y; CHU, S. C; WU, H. C; HSICH, Y. S. Trypsin inhibitor from the seeds of *Acacia confuse*. **Journal of Biochemistry**, 110, 879-883, 1991.

LI, Y. E.; ZHU, Z.; CHEN, Z. X.; WU, X.; WANG, W.; LI, S. J. Obtaining transgenic cotton plant with cowpea plants with cowpea trypsin inhibitor gene. **Acta Gossypii Sinica**, 10, 237-243, 1998.

LI, Z.; SOMMER, A.; DINGERMANN, T.; NOE, C. R. Molecular cloning and sequence analysis of a cDNA encoding a cysteine proteinase inhibitor from *Sorghum bicolor* seedlings. **Molecular & General Genetics**, 251, 499-502, 1996.

LIU, Y.; SALZMAN, R. A.; PANKIW, T.; ZHU-SLAZMAN, K. Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 34, 1069-1077, 2004.

LUCKETT, S.; GARCIA, R. S.; BARKER, J. J.; KONAREV, A. L. V.; SHEWRY, P. R.; CLARKE, A. R.; BRADY, R. L. High-resolution structure of a potent, cyclic proteinase inhibitor from sunflower seeds. **Journal of Molecular Biology**, 290, 525-533, 1999.

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

MACEDO M. R. L.; FERNANDES, K. V. S.; SALES, M. P.; XAVIER-FILHO, J. Purification and Properties of storage proteins (vicilin) from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds which are susceptible or resistant to the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 28, 183-190, 1995.

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

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; CABRINI, E. C.; TOYAMA, M. H.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta Kuehniella*. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1621, 170-182, 2003.

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

MACEDO, M. L. R.; SA, C. M.; FREIRE, M. G. M.; PARRA, J. R. P. A kunitz-type inhibitor of Coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 2533-2540, 2004.

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

MACEDO, L. L. P. **Atividades de frações proteicas de *Erythrina velutina* sobre o desenvolvimento larval de *Ceratitis capitata* (diptera: tephritidae)**. 2005. 74 f. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2005.

MALAVASI, A.; BARROS, M. D. Comportamento sexual e de oviposição em moscas-das-frutas (Tephritidae). In: **Moscas-das-Frutas**. Anais. Souza, H. M. L., (coord.). Fundação Cargill. p. 25-53, 1988.

MANDAL, S.; KUNDU, P.; ROY, B.; MANDAL, R. K. Precursor of the inactive 2S seed storage protein from the indian mustard *Brassica juncea* is a novel trypsin inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, 277, 37161-37168, 2002.

MARCHETTI, S. M.; DELLEDONNE, C., FOGHER, C., CHIABA, C., CHIESA, F., SAVAZZINI, F., GLORDANO, A. Soybean kunitz, C-II and PI-IV inhibitor genes confer different levels of insect resistance to tobacco and potato transgenic plants. **Theoretical and Applied Genetics**, 101, 519-526, 2000.

MARGIS, R.; REIS, E. M.; VILLET, V. Structural and Phylogenetic Relationships among Plant and Animal Cystatins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 359 (1), 24-30, 1998.

MARGIS-PINHEIRO, M.; MARIVET, J.; BURKARD, G. Bean class IV chitinase gene: structure, developmental expression and induction by heat stress. **Plant Science**, 98, 161-173, 1994.

MARKWICH, N. P.; REID, S. J.; LAING, W. A.; CHRISTELLER, J. T. Effects of dietary protein and protease inhibitors on codling moth (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**, 88, 33-39, 1995.

MATSUDAIRA, P. Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, 262 (21), 10035-10038, 1987.

MATSUMOTO, I; EMORI, Y.; ABE, K; ARAI, S. Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (maize weevil), and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells. **Journal of Biochemistry**, 121 (3), 464-76, 1997.

MASOUD, S. A.; JOHNSON, L. B.; WHITE, F. F.; REECK, G. R. Expression of a cysteine proteinase inhibitor (oryzacystatin-I) in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, 21, 655-663, 1993.

MBATA, G. N. Studies on the susceptibility of groundnut varieties to infestation by *Plodia interpunctella* (Hubner) (Lepidoptera, Pyralidae). **Journal of Stored Products Research**, 23, 57-63, 1987.

McMANUS, M. T.; BURGESS, E. P. J. Expression of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor in transgenic tobacco: Effects on larval development of *Spodoptera litura*. **Transgenic Research**, 8, 383-395, 1999.

McMANUS, M. T.; BURGESS, E. P. J. Effects of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor on growth and digestive proteases of larvae of *Spodoptera litura*. **Journal of Insect Physiology**, 41, 731-738, 1995.

MAITY, J.; PATRA, B. C. Isolation and characterization of trypsin Inhibitor from the water fern, *Azolla pinnata*. **Journal of Food Biochemistry**, 27, 281-294, 2003.

MEESTER, P. D.; BRICK, P.; LLOYD, L. F.; BLOW, D. M. ONESTI, S. Structure of the Kunitz type trypsin inhibitor (STI): implication for the interactions between members of the family and tissue plasminogen activator. **Acta Crystallographica**, 54, 589-597, 1998.

MELO, F. R.; SALES, M. P.; PEREIRA, L. S.; BLOCH JR., C.; FRANCO, O. L.; ARY, M. B. Alpha amylase inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Protein and Peptide letters**, 6 (6), 385-390, 1999.

MELLO, G. C; OLIVA, M. L. V; SUMIKAWA, J. T; MACHADO, O. L. T; MARANGONI, S; NOVELLO, J. C; MACEDO, M. L. R Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. **Journal of Protein Chemistry**, 20, 625-632, 2001.

MELLO, M. O.; TANAKA, A. S.; SILVA-FILHO, M. C. Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 27, 103-112, 2003.

MIRKOV, T. E.; EVANS, S. V.; WAHLSTROM, J.; GOMEZ, L.; YOUNG, N. M. ; CHRISPEELS, M. J. Location of the active site of the bean α -amylase inhibitor and involvement of a Trp, Arg, Tyr triad. **Glycobiology**, 5, 45-50, 1995.

MISAKA, T.; KURODA, M.; IWABUCHI, K.; ABE, K.; ARAI, S. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. **European Journal of Biochemistry**, 240, 614–690, 1996.

MOCHIZUKI, A.; NISHIZAWA, Y.; ONODERA, H.; TABELI, Y.; TOKI, S.; HABU, Y.; UGAKI, M.; OHASHI, Y. Transgenic rice plants expressing a trypsin inhibitor are resistant against rice stem borers, *Chilo suppressalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 93, 173-178, 1999.

MOFFAT, M. R.; BLAKEMORE, D.; LEHANE, M. L. Studies on the synthesis and secretion of trypsin in the midgut of *Stomoxys calcitrans*. **Comparative Biochemistry and Physiology, part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 110, 291-300, 1995.

MOHANDASS, S.; ARTHUR, F. H.; ZHU, K. Y.; THRONE, J. E. Biology and management of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) in stored products. **Journal of Stored Products Research**, 43, 302-311, 2006.

MORGANTE, J. S., **Moscas-das-frutas (Tephritidae): características biológicas, detecção e controle**. *Boletim Técnico*, Brasília, vol. 2, p 19., 1991.

MOURA, F. T.; OLIVEIRA, A. S.; MACEDO, L. L. P.; VIANNA, A. L. B. R.; ANDRADE, L. B. S.; MARTINS-MIRANDA, A. S.; OLIVEIRA, J. T. A.; SANTOS, E. A. ; SALES, M. P. Effects of a Chitin-Binding Vicilin from *Enterolobium contortisiliquum* Seeds on Bean Bruchid Pests (*Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*) and Phytopathogenic Fungi (*Fusarium solani* and *Colletrichum lindemuntianum*). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 55, 260-266, 2006.

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

MUHARSINI, S; DALRYMPLE, B; VUOCOLO, T; HAMILTON, S; WILLADSEN, P; WIJFFELS, G. Biochemical and molecular characterization of serine proteases from larvae of *Chrysomya bezziana*, the Old World Screwworm fly. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 31, 1029-1040, 2001.

MÜLLER, H. M.; CRAMPTON, J. M.; TORRE, A. D.; SINDEN, R.; CRISANTI, A. Members of a trypsin gene family in *Anopheles gambiae* are induced in the gut by blood meal. **The EMBO Journal**, 12, 2891–2900, 1993.

MURDOCK, L. L.; BROOKHART, G.; DUNN, P. E.; FOARD, D. E.; KELLEY, S.; KITCH, L.; SHADE, R. E.; SHUKLE, R. H.; WOLFSON, J. L. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology, part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 87, 783-787, 1987.

NA, J. H.; RYOO, M. I. The influence of temperature on development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae) on dried vegetable commodities. **Journal of Stored Products Research**, 36, 125-129, 2000.

NAGATA, K.; KUDO, N.; ABE, K.; ARAI, S.; TANOKURA, M. Threedimensional solution of oryzacystatin-I, a cysteine proteinase inhibitor of rice, *Oryza sativa* L. japonica. **Biochemistry**, 39, 14753–14760, 2000.

NAKAHATA, A. M.; BUENO, N. R.; ROCHA, H. A. O., FRANCO, C. R. C.; CHAMMAS, R.; NAKAIE, C. R.; JOSIUTIONIS, M. G.; NADER, H. B.; SANTANA, L. A.; SAMPAIO, U. M.; OLIVA, M. L. V. Structural and inhibitory properties of a plant proteinase inhibitor containing the RGD motif. **International Journal of Biological Macromolecules**, 40, 22-29, 2006.

NEGREIROS, A. N. M.; CARVALHO, M. M.; XAVIER-FILHO, J.; BLANCO-LABRA, A.; SHEWRY, P. R.; RICHARDSON, M. **Phytochemistry**, 30 (9), 2829-2833, 1991.

NEURATH, H. Proteolytic processing and physiological regulation. **Trends in Biochemical Sciences**, 14, 268-271, 1989.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: Beynon, R. J. & Bond, J. S. (ed.), *Proteolytic enzymes: A practical approach*. New York, Oxford University Press, 1, 1-14, 1996.

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). 1992. **Enzyme nomenclature**. Orlando: Academic Press, New York.

NORIOKA, N.; HARA, S.; IKENAKA, T.; ABE, J. Distribution of the kunitz and Bowman-Birk family proteinase inhibitor in leguminosae seeds. **Agricultural and Biological Chemistry**, 52, 1245-1252, 1988.

NOVILLO, C.; CASTANERO, P.; ORTEGO, F. Inhibition of digestive trypsin-like proteases from larvae of several Lepidopteran species by the diagnostic cysteine protease inhibitor E-64. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 27 (3), 247-254, 1997.

ODANI, S.; YOKOKAWA, Y.; TAKEDA, H.; A. B. E, S.; ODANI, S. The primary structure and characterization of carbohydrate chains of the extracellular glycoproteinase inhibitor from látex of *Carica papaya*. **European Journal of Biochemistry**, 241, 70-82, 1996.

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on soybean trypsin inhibitor. (VII)-Dissulfide bridges in soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor. **Journal Biochemistry**, 74 (4), 697-715, 1973a.

ODANI, S.; IKENAKA, T. Scission of soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor into two small fragments having either trypsin or chymotrypsin inhibitory activity. **Journal Biochemistry**, 74 (4), 857-860, 1973b.

OJIMA, A.; SHIOTA, H.; HIGASHI, K.; KAMADA, H.; SHIMMA, Y.; WADA, M.; SATOH, S. An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell culture and seeds of carrot. **Plant Molecular Biology**, 34, 99-109, 1997.

OLIVA, M. L. V.; SALLAI, R. C.; SAMPAIO, C. A. M.; FRITZ, H.; AUERSWALD, E. A.; TANAKA, A. S.; TORQUATO, R. J.; SAMPAIO, M. U. *Bauhinia* serine proteinase inhibitors: effect on factor X, factor XII and plasma kallikrein. **Immunopharmacology**, 32, 85-87, 1996.

OLIVA, M. L.; MENDES, C. R.; SANTOMAURO-VAZ, E. M.; JULIANO, M. A.; MENTELE, R.; AUERSALD, E. A.; SAMPAIO, U. M.; SAMAPAIO, C. A. *Bauhinia bauhinoides* plasma kallikrein inhibitor: interaction with synthetic peptides and fluorogenic peptide substrates related to the reactive site sequence. **Current Medicinal Chemistry**, 8, 977-984, 2001.

OLIVA, M. L. V.; SOUZA-PINTO, J. C.; BATISTA, I. F. C.; ARAÚJO, M. S.; SILVEIRA, V. F.; AUERSWALD, E. A.; MENTELE, R.; ECKERSKORN, C.; SAMPAIO, U. M.; SAMPAIO, C. A. M. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and paw edema. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1477, 64-74, 2000.

OLIVEIRA, C. M. **Isolamento e caracterização parcial de inibidores de tripsina e quimotripsina de tubérculos de *Colocasia esculenta***. 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2001.

OLIVEIRA, A. S.; PEREIRA, R. A.; LIMA, L. M.; ANA H. A. MORAIS, A. H. A.; MELO, F. R.; FRANCO, O. L.; BLOCH JR., C.; GROSSI-DE-SA, M. F.; SALES, M. P. Activity toward Bruchid Pest of a Kunitz-Type Inhibitor from Seeds of the Algaroba Tree (*Prosopis juliflora* D.C.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 72, 122–132, 2002.

OLIVEIRA-NETO, O. B; BATISTA, J. A; RIGDEN, D. J; FRAGOSO, R. R; SILVA, R. O; GOMES, E. A; FRANCO, O. L; DIAS, S. C; CORDEIRO, C. M; MONNERAT, R. G; GROSSI-DE-SA, M. F. A diverse family of serine proteinase genes expressed in cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*): implications for the design of pest-resistant transgenic cotton plants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 34, 903-918, 2004a.

OLIVEIRA-NETO, O. B; BATISTA, J. A; RIGDEN, D. J; FRANCO, O. L; FRAGOSO, R. R; MONTEIRO, A. C; MONNERAT, R. G; GROSSI-DE-AS, M. F. Molecular cloning of a cysteine proteinase cDNA from the cotton boll weevil *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, 68, 1235-42, 2004b.

ONESTI, S.; BRICK, P.; BLOW, D. M. Crystal structure of a kunitz-type trypsin inhibitor from *Erythrina caffra* seeds. **Journal of Molecular Biology**, 217, 154-176, 1991.

ORR, G.; STRICKLAND, J.; WALSH, T. Inhibition of *Diabrotica* larval growth by multicystatin from potato tubers. **Journal of Insect Physiology**, 40, 893–900, 1994.

ORTEGO, F.; NOVILLO, C.; CASTANERO, P. Characterization and distribution of digestive proteases of the stalk corn borer, *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lepidoptera: Noctuidae). **Archives of Insect Biochemistry Physiology**, 33, 163-180, 1996.

ORTEGO, F.; FARINÓS, G. P.; RUIZ, M.; MMARCO, M.; CASTANERA, P. Characterization of digestive proteases in the weevil *Aubeonymus mariafranciscae* and effects of proteinase inhibitors on larval development and survival. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 88, 265-274, 1998.

PAES, N. S.; GERHARDT, I. R.; COUTINHO, M. V.; YOKOYAMA, M.; SANTANA, E.; HARRIS, N.; CHRISPEELS, M. J.; GROSSI-DE-SA, M. F. The effect of arcelin-1 on

the structure of the midgut of bruchid larvae and immunolocalization of the arcelin protein. **Journal of Insect Physiology**, 46, 393-402, 2000.

PANDO, L. A.; DI CIERO, L.; NOVELLO, J. C.; OLIVEIRA, B.; WEDER, J. K.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of a new trypsin inhibitor from *Crotalaria paulina* seeds. **IUBMB Life**, 48, 519-523, 1999.

PANDO, S. C.; OLIVA, M. L. V.; SAMPAIO, C. A. M.; DI CIERO, L.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. **Phytochemistry**, 57, 625-631, 2001.

PAIVA, P. M. G.; OLIVA, M. L. V.; FRITZ, H.; COELHO, L. C. B. B.; SAMPAIO, C. A. M. Purification and primary structure determination of two Bowman-Birk type isoinhibitors from *Cratylia mollis* seeds. **Phytochemistry**, 67, 545-552, 2006.

PARK, S-S.; SUMI, T.; OHBA, H.; NAKAMURA, O.; KIMURA, M. Complete amino acid sequences of three proteinase inhibitors from white sword bean (*Canavalia gladiata*). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 64 (10), 2272-2275, 2000.

PERLSTEIN, S. H.; KEZDY, F. J. Isolation and characterization of a protease inhibitor from commercial stem bromelain acetone powder. **Journal of Supramolecular Structure**, 1 (3), 249-54, 1973.

PERNAS, M.; SANCHEZ-MONGE, R.; GÓMEZ, L.; SALCEDO, G. A. Chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. **Plant Molecular Biology**, 38, 1235-1242, 1998.

POMPERMAYER, P.; LOPES, A. R.; TERRA, W. R.; PARRA, J. R. P.; FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Effects of soybean proteinase inhibitors on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. **Entomologia experimentalis et applicata**, 99, 79-85, 2001.

PONTE, J. J. Nematóides do caupi. In: Araújo, J. P. P. de Watt, E. E. (eds.). O Caupi no Brasil. **Brasília: IITA/ EMBRAPA**, 20, 591-601, 1988.

PRAKASH, B.; SELVARAJ, S.S.; MURTHY, M.R.N.; SREERAMA, Y.N.; RAO, D.; GOWDA, L. R. Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors. **Journal Molecular Evolution**, 42, 558-560, 1996.

PUEYO, J.J.; MORGAN, T. D.; AMEENUDDIN, N.; LIANG, C.; REECK, G. R.; CHRISPPEELS, M. J.; KRAMAR, K. J. Effects of bean and wheat α -amylase activity and growth of stored product insect pests. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, 75, 237-244, 1995.

PURCELL, J. P.; GREENPLATE, J. T.; SAMMONS, R. D. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 22, 41-47, 1992.

QI, R. F.; SONG, Z. W.; CHI, C. W. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, 37, 283-292, 2005.

RAICKHEL, N. V.; LEE, H. I.; BROEKAERT, W. F. Structure and function of chitin-binding proteins. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, 44, 591-615, 1993.

RAHBE, Y.; DERAISON, C.; BONADE-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; NARDON, C.; JOUANIN, L. Effects of the cysteine protease inhibitor oryzacystatin (OC-I) on different aphids and reduced performance of *Myzus persicae* on OC-I expressing transgenic oilseed rape. **Plant Science**, 164, 441-450, 2003.

RAMALHO, F.S. Cotton pest management. Par 4. A Brazilian perspective. **Annual Review Entomology**, 39, 563-578, 1994.

RAMALHO-ORTIGAO, J. M.; KAMHAWI, S.; ROWTON, E. D.; RIBEIRO, J. M.; VALENZUELA, J. G. Cloning and characterization of trypsin- and chymotrypsin-like proteases from the midgut of the sand fly vector *Phlebotomus papatasi*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 33, 63-171, 2003.

REED, B. J.; CHANDLER, D. S.; SANDEMAN, R. M. Aminopeptidases as potential target for the control of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. **International Journal for Parasitology**, 29, 839-850, 1999.

REDDY, M. N.; KEIM, P. S.; HEINRIKSON, R. L.; KEZDY, F. J. Primary structural analysis of sulfhydryl protease inhibitors from pineapple stem. **The Journal of Biological Chemistry**, 250 (5), 1741-1750, 1975.

REES, D. Insects of Stored Products. **CSIRO Publishing**, Collingwood, Victoria, Australia, 2004.

RICHARDSON, M; CAMPOS, F. A. P; XAVIER-FILHO, J; MACEDO, M. L. R; MAIA, G. M. C; YARWOOD, A. The amino acid sequence and reactive (inhibitory) site of the major trypsin isoinhibitor (DE5) isolated from seeds of the Brazilian Carolina tree (*Adenanthera pavonina*). **Biochimica et Biophysica Acta**, 872, 134-140, 1986.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitor. In: Methods in plants Biochemistry. **New York, Academic Press**. 5, 259-305. 1991.

RITONJA, A.; KRIZAJ, I; MESKO, P.; KOPITAR, M.; LUCOVNIK, P.; STRUKELJ, B.; PUNGERCAR, J.; BUTTLE, D.J.; BARRET, A.J.; TURK, V. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. **FEBS Letters**, 504, 41-44, 1990.

RODENBURG, K. W.; VARALLYAY, E.; SVENDSON, I.; SVENSSON, B. Arg-27, arg-127 and arg-155 in the α -trefoil protein barley α -amylase/subtilisin inhibitor are interface residues in the complex with barley α -amylase. **Biochemical Journal**, 309, 969-976, 1995.

ROGEL, J. B.; POPOVIC, T.; RITONJA, A.; STRUKELJ, B.; BRZIN, J. Chelidocystatin, a novel phytocystatin from *Chelidonium majus*. **Phytochemistry**, 49 (6), 1645-1649, 1998.

ROSOLEM, C. A.; MARUBAYASHI, O. M. Seja o doutor do seu feijoeiro. **Informações Agronômicas** (Brasil). 68, 1-16, 1994.

ROWAN, A. D.; BRZIN, J.; BUTTLE, D. J.; BARRETT, A. J. Inhibition of cysteine proteinases by a protein inhibitor from potato. **FEBS Letter**, 269 (2), 328-330, 1990.

RYAN, C. A. Protease inhibitor in plants: Genes for Improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, 28, 425-449, 1990.

RYAN, S. N.; LAING, W. A.; MCMANUS, M. T. A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit. **Phytochemistry**, 38 (3), 846-852, 1998.

SALES, M. P.; GOMES, V. M.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J. Chitin binding proteins from cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 29, 319-326, 1996.

SALES, M. P.; GERHARDT, I. R.; GROSSI-DE-SA, M. F.; XAVIER-FILHO, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**, 124, 515–522, 2000.

SALES, M. P.; PIMENTA, P. P.; PAES, N. S.; GROSSI-DE-SA, M. F.; XAVIER-FILHO, J. Vicilins (7s storage globulins) of cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds bind to chitinous structure of the midgut of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) larvae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 34, 27-34, 2001a.

SALES, M. P.; GERHARDT, I. T.; GROSSI-DE-SA, M. F.; XAVIER-FILHO, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids?. **Plant Physiology**, 124, 515-522, 2001b.

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

SANTINO, A.; GALLO, A.; LEONE, A.; POLTRONIERI, P.; ZACHEO, G. Purification and characterisation of a novel papain inhibitor from common bean (*Phaseolus vulgaris*) seed. **Physiologia Plantarum**, 104, 293–298, 1998.

SATTAR, R.; ALI, S. A.; KAMAL, M.; KHAN, A. A.; ABBASI, A. Molecular mechanism of enzyme inhibition: prediction of the three-dimensional structure of the dimeric trypsin inhibitor from *Leucaena leucocephala* by homology modelling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 314, 755-765, 2004.

SCHIMOLER-OROURKE, R.; RICHARDSON, M.; SELITRENNIKOFF, C. P. Zeamatin inhibits trypsin and α -amylase activities. **Applied and Environmental Microbiology**, 67 (5), 2365-2366, 2001.

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

SCHUMAKER, T. T. S.; CRISTOFOLETTI, P. T.; TERRA, W. R. Properties and compartmentalization of digestive carbohydrases and proteases in *Scatotrigona bipunctata* (Aphid: Meliponinae) larvae. **Apidologie**, 23, 3-17, 1993.

SCHROEDER, H. E.; GOLLASH, S.; MOORE, A.; TABE, L. M.; CRAIG, S.; HARDIE, D.; CHRISPPEELS, M. J.; SPENCER, D.; HIGGINS, T. J. V. Bean α -amylase inhibitor

confers resistance to the pea weevil, *Bruchus pisorum*, in genetically engineered peas (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology**, 107, 1233-1239, 1995.

SHEE, C; SHARMA, A. K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from seeds of *Murraya koenigii*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 22 (1), 115-120, 2007.

SEGURA, A.; MORENO, M.; GARCIA-OLMEDO, F. Purification and antipathogenic activity of lipid transfer proteins (LTPs) from the leaves of *Arabidopsis* and spinach. **The FEBS Journal**, 332, 243-246, 1993.

SHADE, R. E.; SCHROEDER, H. E.; PUEYO, J. J.; TABE, L. L.; MURDOCK, T. J. V.; HIGGINS, M. J.; CHRISPPELLS, M. J. Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. **Biotechnology**, 2, 793-796, 1994.

SHADE, R. E.; MURDOCK, L. L.; FOARD, D. E.; POMEROY, M. A. Artificial seed system for bioassay of cowpea weevil (Coleoptera Bruchidae) growth and development. **Environmental Entomology**, 15, 1286-1291, 1986.

SILVA, C. B. L. F.; ALCAZER, A. A.; MACEDO, L. L. P.; OLIVEIRA, A. S.; MACEDO, F. P.; ABREU, L. R. D.; SANTOS, E. A.; SALES, M. P. Digestive enzymes during development of *Ceratitis capitata* (Díptera:Tephritidae) and effects of SBTI on its digestive serine proteinase targets. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 36, 561-569, 2006.

SILVA, C. P.; TERRA, W. R.; LIMA, R. M. Differences in midgut serine proteinases from larvae of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, 47 (1), 18-28, 2001.

SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. Comparasion between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh.)(Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 99, 529-533, 1991.

SIMMONS, P. O; NELSON, H. D. Insects on dried fruits. **USDA, Agricultural Handbook**, Washington, DC. 1975.

SIQUEIRA-JUNIOR, C. L.; FERNANDES, K. V. S.; MACHADO, O.L.T.; DA CUNHA, M.; GOMES, V. M.; MOURA, D.; JACINTO, T. 87 kDa tomato cystatin exhibits

properties of a defense protein and forms protein crystals in prosystemin overexpressing transgenic plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, 40, 247–254, 2002.

SOBRINHO, C.A.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doenças do feijão caupi. In: Cardoso, M. J. (Org.) A Cultura do Feijão Caupi no Meio-Norte do Brasil, Teresina, **Embrapa Meio-Norte**, 2000. 264p. (Embrapa Meio-Norte. Circular Técnica, 28).

SONG, H. K.; SUH, S. W. Kunitz type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interaction between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue type plasminogen activator. **Journal of Molecular Biology**, 275, 347-363, 1998.

SONG, I.; TAYLOR, M.; BAKER, K.; BATEMAN, R. C. Inhibition of cysteine proteinases by *Carica papaya* cystatin produced in *Escherichia coli*. **Gene**, 162, 221–224, 1995.

SOUZA, E. M. T.; MIZUTA, K.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. M. Purification and partial characterization of a *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **Phytochemistry**, 39, 521-525, 1995.

SOUZA, E. M. T.; TELES, R. C. L.; SIQUEIRA, E. M. A.; FREITAS, S. M. Effects of denaturing and stabilizing agents on the inhibitory activity and conformational stability of *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. **Journal of Protein Chemistry**, 19 (6), 507-513, 2000.

STOREY, R. D.; WAGNER, F. W. Plant proteases: a need for uniformity. **Phytochemistry**, 25, 2701-2709, 1986.

STROBL, S.; MASKOS, K.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GOMIS-RUTH, F. X.; GLOCKSHUBER, R. A novel strategy for inhibition of α -amylase in complex with the *Ragi* bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. **Structure**, 6, 911-921, 1998.

STUBBS, M.T.; LABER, B.; BODE, W.; HUBER, R.; JERALA, R.; LENARCIC, B.; TURK, V. The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. **The EMBO Journal**, 9, 1939–1947, 1990.

SRINIVASAN, A.; CHOUGULE, N. P.; ASHOK P. GIRI, A. P.; Gatehouse, J. A.; Gupta, V. S. Podborer (*Helicoverpa armigera* Hubn.) does not show specific

adaptations in gut proteinases to dietary *Cicer arietinum* Kunitz proteinase inhibitor. **Journal of Insect Physiology**, 51, 1268–1276, 2005.

SUMATHI, S., PATTABIRAMAN, T. N. Natural plant enzyme inhibitors IV. Studies on trypsin inhibitors of *Colocasia antiquorum* tubers. **Biochimica et Biophysica Acta**, 566, 115-127, 1979.

SUMIKAWA, J. T.; NAKAHATA, A. M.; FRITZ, H.; MENTELE, R.; SAMPAIO, M. U.; OLIVA, M. L. A Kunitz-type glycosylated elastase inhibitor with one disulfide bridge. **Planta Medica**, 72, 393-397, 2006.

TAMHANE, V. A.; CHOUGULE, N. P.; GIRI, A. P.; DIXIT, A. R.; SAINANI, M. N.; GUPTA, V. S. *In vitro* and *in vivo* effects of *Capsicum annum* proteinase inhibitors on *Helicoverpa armigera* gut proteinases. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1722, 155–167, 2005.

TANAKA, A. S.; SAMPAIO, M. U.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E. A.; SAMPAIO, C.A. Sequence of a new Bowman-Birk inhibitor from *Torresea acreana* seeds and comparison with *Torresea cearensis* trypsin inhibitor (TcTI2). **Journal of the Protein Chemistry**, 15, 553-560, 1996.

TECNIGRAN PROTEÇÃO DE GRÃOS E SEMENTES LTDA. Disponível em: <http://www.tecnigran.com.br/html/pragas5.htm>. Acesso em: 2 fev. 2007.

TEIXEIRA, F. M. **Vicilinas de sementes de leguminosas selvagens: purificação, caracterização, efeito deletério e mecanismo de ação para bruquídeos e fungos fitopatogênicos**. 2006. 60 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2006.

TELANG, M. A.; SRINIVASAN, A.; PATANKAR, A. G.; HARSULKAR, A. M.; JOSHI, V.; DAMLE, A.; DESHPANDE, V. V.; SAINANI, M. N.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, G. P.; BIRAH, A.; RANI, S.; KACHOLE, M.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Phytochemistry**, 63, 643–652, 2003.

TELANG, M. A.; GIRI, A. P.; SAINANI, M. N.; GUPTA, V. S. Elastaselike proteinase of *Helicoverpa armigera* is responsible for inactivation of a proteinase inhibitor from chickpea. **Journal of Insect Physiology**, 51, 513–522, 2005.

TELES, R. C. L.; SOUZA, E. M. T.; CALDERON, L. A.; FREITAS, S. M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. **Phytochemistry**, 65, 793-799, 2004.

TERRA, W. R.; CRISTOFOLETTI, P. T. Midgut proteinases in three divergent species of coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology, part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 113, 725-730, 1996.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology, part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 109, 1-62, 1994.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; BIANCHI, A. G. Action pattern, kinetical properties and eletrophoretical studies on an α -amylase present in midgut homogenates from *Rhyncosciara americana* (Diptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology, part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 56, 201-209, 1977.

TITARENKO, E.; CHRISPEELS, M. J. cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the α -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 30, 979-990, 2000.

THEVISSSEN, K.; GHAZI, A.; DE SAMBLANX, G.; BROWNLEE, C.; OSBORN, R. W.; BROEKAERT, W. F. Fungal membrane responses induced by plant defensin and thionins. **The Journal of Biological Chemistry**, 271, 15018-15025, 1996.

THIE, N. M. R.; HOUSEMAN, J. G. Identification of cathepsin B, D and H in the larval midgut of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera : Chrysomelidae). **Insect Biochemistry**, 20, 313-318, 1990.

THOMPSON, J. D; HIGGINS, D. G; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22, 4673-4680, 1994.

UCHOA, A. F.; CARVALHO, C. D. S. C; OLIVEIRA, A. E. A.; XAVIER-FILHO, J. **Sementes e suas defesas contra insetos**. Disponível em: <http://www.jxavierfilho.jpg.ig.com.br/sementes.htm>. Acesso em: 23 mai 2006.

UCHOA, A. F.; DAMATTA, R. A.; RETAMAL, C. A.; ALBUQUERQUE-CUNHA, J. M.; SOUZA, S. M.; SAMUELS, R. L.; SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. Presence of the

storage seed protein vicilin in internal organs of larval *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Insect Physiology**, 52, 169-178, 2006.

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

VALENCIA, A.; BUSTILLO, A. E.; OSSA, G. E.; CHRISPPEELS, M. J. α -amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 30, 207-213, 2000.

VALUEVA, T. A.; REVINA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Potato tuber protein proteinase inhibitor belonging to the kunitz soybean inhibitor family. **Biochemistry**, 62, 1367-1600, 1997.

VALUEVA, T. A.; REVINA, T. A.; KLADNITSKAYA, G. V.; MOSLOV, V. V. Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and *Phytophthora*-infected potato tubers. **FEBS Letters**, 426, 131-134, 1998.

VALUEVA, T. A.; REVINA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Reactive sites of a 21-kD protein inhibitor of serine proteinases from potato tubers. **Biochemistry**, 64, 1074-1078, 1999.

VASCONCELOS, I. M.; OLIVEIRA, J. T. A. Antinutritional properties of plant lectins. **Toxicon**, 44 (4), 385-403, 2004.

VIDAL, M. S.; SALES, M. P.; AMORIM, T. M. L.; SOUSA, D. M. M. Atividade proteolítica do tipo tripsínica durante o desenvolvimento larval de curuquerê-doadogoeiro (*Alabama argillacea* Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae). **EMBRAPA**. Campina Grande, PB, P. 1-5, 2005.

WALDRON, C.; WEGRICH, L. M.; MERLO, P. A. O.; WALSCH, T. A. Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight domain cysteine proteinase inhibitor. **Plant Molecular Biology**. 23, 801–812, 1993.

WALSH, T. A.; TWITCHELL, W. P. Two kunitz-type proteinase inhibitor from potato tubers. **Plant Physiology**, 97, 15-18, 1991.

WANDER, A. E. Cultivo do Feijão Irrigado na Região Noroeste de Minas Gerais Embrapa Arroz e Feijão. Sistemas de Produção, No.5. ISSN

1679-8869. Versão eletrônica.
Dezembro/2005 <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoIrrigadoNoroesteMG/index.htm> em 28/06/2007

WEBER, K.; OSBORNE, M. The reability of molecular weight determination by sodium dodecil sulfate polyacrilamide gel eletroforesis. **Journal of Biological Chemistry**, 244, 4406-4412, 1969.

WEDER, J. K. P.; HINKERS, S. C. Complete amino acid sequence of the lentil trypsin-chymotrypsin inhibitor LCI-1.7 and a discussion of atypical binding sites of Bowman-Birk inhibitors. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 52, 4219-4226, 2004.

WIEMAN, K. F.; NIELSEN, S. S. Isolation and partial characterization of a major gut proteinase from larval *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae). **Comparative Biochemistry and Physiology, part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 89, 419-426, 1988.

WIJAYA, R.; NEUMANN, G. M.; CONDON, R.; HUGHES, A. B.; POLYA, G. M. Defense proteins from seed of *Cassia fistula* include a lipid transfer protein homologue and a protease inhibitory plant defensin. **Plant Science**, 159, 243-255, 2000.

WILSON, K. A.; LASKOWSKI, M. S. R. The partial amino acid sequence of trypsin inhibitor II from garden bean, *Phaseolus vulgaris*, with location of the trypsin and elastase-reactive sites. **Journal of Biological Chemistry**, 250 (11), 4261-4267, 1975.

WU, J.; HAARD, J. N. Purification and characterization of a cystatin from the leaves of methyl jasmonate treated tomato plants. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Pharmacology, Toxicology & Endocrinology**, 127, 209-220, 2000.

WU, H. C.; LIN, J. Y. The complete amino acid sequence of a kunitz family trypsin inhibitor from seeds of *Acacia confusa*. **Journal of Biochemistry**, 113 (2), 258-263, 1993.

WU, C.; WHITAKER, J. R. Homology among trypsin/chymotrypsin inhibitors from red kidney bean, Brazilian pink bean, lima bean and soybean; **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 39, 1583-1589, 1991.

XAVIER-FILHO, J. Sementes e suas defesas contra insetos. Projeto Multinacional de Biotecnologia e Alimentos. **Organização dos Estados Americanos-OEA**. 1993. 1-31.

XU, D.; XUE, Q.; McELROY, D.; MAWAL, Y.; HILDER, V. A.; WU, R. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTI, in transgenic rice plants confers resistance to two major insect pests. **Molecular breeding**, 2, 167-173, 1996.

YAMADA, M. Lipid transfer protein in plant and microorganism. **Plant & Cell Physiology**, 33, 1-6, 1992.

YAMAGATA, H.; KUNIMATSU, K.; KAMASAKA, H.; KURAMOTO, T.; IWASAKI, T. Rice bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 62, 978-985, 1998.

YAMAMOTO, M; HARA, S; IKENAKA, T. Amino acid sequence of two trypsin inhibitor from winged bean seeds (*Psophocarpus tetragonolobus* (L) DC). **Journal of Biochemistry**, 94, 849-863, 1983.

YOZA, K-I.; NAKAMURA, S.; YAGUCHI, M.; HARAGUCHI, H. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a cysteine proteinase inhibitor, cystatin, from Job's tears (*Coix lacryma-jobi* L. var. Ma-yen Stapf). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 66 (10), 2287-2291, 2002.

YUNES, A. N. A.; ANDRADE, M. T.; SALES, M. P.; MORAES, R. A.; FERNANDES, K. V. S.; GOMES, M. V.; XAVIER-FILHO, J. Legume seeds vicilins (7s storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus* (F)). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 76 (1), 111-116, 1998.

ZENG, F.; ZHU, Y.; COHEN, A. Molecular cloning and partial characterization of a trypsin like protein in salivary glands of *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 32, 455-464, 2002.

ZENKE, K. J.; MULLER-FAHRNOW, A.; JANY, M. -D.; PAL, G. P.; SAENGER, W. The three-dimensional structure of the bifunctional proteinase K/ α -amylase inhibitor from wheat (PKI3) at 2.5 Å resolution. **FEBS Letter**, 279, 240-242, 1991.

ZHAO, Y.; BOTELLA, M. A.; SUBRAMANIAN, L.; NIU, X.; NIELSEN, S. S.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Two wound-inducible soybean cysteine

proteinase have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. **Plant Physiology**, 111, 1299–1306, 1996.

ZHU, Y. C.; BAKER, J. E. Characterization of midgut trypsin-like enzymes and three trypsinogen cDNA from the lesser grain borer, *Rhyzoperta dominica* (Coleoptera: Bostrichidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, 29, 1053-1063, 1999.

ZIMACHEVA, A. V.; MOSOLOV, V. V. Cysteine proteinase inhibitors from soy seeds. *Biokhimiia*, 60 (1), 118-123, 1995.

ZINKLER, D.; POLZER, M. Identification and characterization of digestive proteinases from the firebrat *Thermobia domestica*. **Comparative Biochemistry and Physiology, part B: Biochemistry & Molecular Biology**, 103, 669-673, 1992.

ZUCCHI, R. A., VENDRAMIM, J. D. BERTI, F. E. Curso de Entomologia Aplicada à Agricultura – **Manual do Curso a Distância**. **ESALQ, Piracicaba**, São Paulo, p 760, 1992.

9 APÊNDICES

9.1 APÊNDICE A - Identification of a Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from *Pithecellobium dumosum* Seeds with Insecticidal Properties and Double Activity

Journal of Agricultural and Food Chemistry 55 (2007) 7342-7349

Identification of a Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from *Pithecellobium dumosum* Seeds with Insecticidal Properties and Double Activity

A. S. OLIVEIRA,^{†,‡} L. MIGLIOLO,[†] R. O. AQUINO,[†] J. K. C. RIBEIRO,[†]
L. L. P. MACEDO,[†] L. B. S. ANDRADE,^{‡,§} M. P. BEMQUERER,^{||} E. A. SANTOS,[†]
S. KIYOTA,[#] AND M. P. SALES^{*,†}

Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande de Norte, Natal, Brazil,
Departamento de Bioquímica Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil,
Departamento de Biologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, Brazil, Departamento de
Bioquímica Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais,
Belo Horizonte, Brazil, and LBPP, Instituto Biológico, São Paulo, Brazil

KEYWORDS: *Pithecellobium dumosum*; plant defense; Kunitz type inhibitor; insect pests

* Corresponding author. Address: Laboratório de Química e Função de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências-UFRN, Natal-RN, Brazil 59072-970. Fax: 558432119208. E-mail: msales@ufrnet.br.

[†] Universidade Federal do Rio Grande de Norte.

[‡] Universidade Federal do Ceará.

[§] Universidade Estadual Vale do Acaraú.

^{||} Universidade Federal de Minas Gerais.

[#] Instituto Biológico.

Identification of a Kunitz-Type Proteinase Inhibitor from *Pithecellobium dumosum* Seeds with Insecticidal Properties and Double Activity

A. S. OLIVEIRA,^{†,‡} L. MIGLIOLO,[†] R. O. AQUINO,[†] J. K. C. RIBEIRO,[†]
L. L. P. MACEDO,[†] L. B. S. ANDRADE,^{‡,§} M. P. BEMQUERER,^{||} E. A. SANTOS,[†]
S. KIYOTA,[#] AND M. P. SALES^{*,†}

Departamento Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande de Norte, Natal, Brazil, Departamento Bioquímica Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brazil, Departamento de Biologia, Universidade Estadual Vale do Acaraú, Sobral, Brazil, Departamento Bioquímica Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, and LBPP, Instituto Biológico, São Paulo, Brazil

A trypsin inhibitor, PdKI, was purified from *Pithecellobium dumosum* seeds by TCA precipitation, trypsin–sepharose chromatography, and reversed-phase-HPLC. PdKI was purified 217.6-fold and recovered 4.7%. SDS-PAGE showed that PdKI is a single polypeptide chain of 18.9 kDa and 19.7 kDa by MALDI-TOF. The inhibition on trypsin was stable in the pH range 2–10 and at a temperature of 50 °C. The K_i values were 3.56×10^{-8} and 7.61×10^{-7} M with competitive and noncompetitive inhibition mechanisms for trypsin and papain, respectively. The N-terminal sequence identified with members of Kunitz-type inhibitors from the Mimosoideae and Caesalpinoideae subfamilies. PdKI was effective against digestive proteinase from *Zabrotes subfasciatus*, *Ceratitidis capitata*, *Plodia interpunctella*, *Alabama argillaceae*, and *Callosobruchus maculatus*, with 69, 66, 44, 38, and 29% inhibition, respectively. Results support that PdKI is a member of the Kunitz inhibitor family and its insecticidal properties indicate a potent insect antifeedant.

KEYWORDS: *Pithecellobium dumosum*; plant defense; Kunitz type inhibitor; insect pests

1. INTRODUCTION

Beginning in 1980, new strategies of insect pest control, such as integrated pest management (IPM) control and the use of transgenic crops, have been proposed and tested to avoid these crop production losses. These strategies have been employed because of worldwide crop loss that was estimated at 70% of production without the use of pesticides (1), and despite of the use of pesticides, preharvest losses had reached 15% of the total crop production (2). During the past decade, the uses of transgenic crops have been rapidly advancing with the discovery of effective plant genes that can be transferred and offer resistance to crop plants against pests and pathogens.

The inhibitors are known for their roles in response to abiotic (3, 4) and biotic stresses, especially in plant defense processes against insect pest attack (5), where they are effective against insect digestive enzymes (6–9). Among the proteinaceous

inhibitors, those belonging to the Kunitz family and Bowman–Birk members in particular are abundant in the Leguminosae, where they are presumed to serve in seed defense against insect predation, as well as simple seed storage (5). The Kunitz trypsin inhibitors in general are small, stable, and abundant proteins (10) that are found in plant storage tissues, such as seeds, tubers, leaves, and fruits (11, 12). Most of these inhibitors bind to cognate enzymes according to a common substrate-like canonical mechanism (6, 13). The use of Kunitz trypsin inhibitors as candidates in control strategies of insects has good potential, because insect digestive proteinases are promising targets in the control of lepidopteran, such as *Heliothis zea* (Boddie) (14), *Spodoptera litura* (Boisd.) (15), *Agrotis ipsilon* (Hufnagel), *Heliothis zea* and *Heliothis virescens* (Fab.), *Choristoneura occidentalis*, *Manduca sexta* (L.) (16); dipteran *Lucilia cuprina* (Wied.) (17); coleopteran such as the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) (18) and others coleopterans (5, 18–21).

Several plants have been screened to isolate and characterize such proteinase inhibitors, among them the species *Pithecellobium dumosum* (Jurema Branca), a member of the family Mimosoideae, which are tropical and subtropical trees and shrubs. In this study, we have reported on the purification, characterization, and amino acid sequence analysis of a related Kunitz inhibitor from Jurema Branca tree seeds. We have also tested its effect

* Corresponding author. Address: Laboratório de Química e Função de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências—UFRN, Natal-RN, Brazil 59072-970. Fax: 558432119208. E-mail: msales@ufrnet.br.

[†] Universidade Federal do Rio Grande de Norte.

[‡] Universidade Federal do Ceará.

[§] Universidade Estadual Vale do Acaraú.

^{||} Universidade Federal de Minas Gerais.

[#] Instituto Biológico.

in vitro toward digestive enzymes from insect pests of different orders, which use as major digestive proteinases the cysteine and serine enzyme classes. The purified protein could help the search for indication of active inhibitors toward insect pests that may provide new potential bioinsecticides to pest control.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents. Trypsin (bovine pancreas), chymotrypsin (bovine pancreas), elastase (porcine pancreas), papain (papaya latex) and bromelain (pineapple stem), *N* α -benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA), *N* α -benzoyl-DL-Arg β -naphthylamide (BANA), trichloroacetic acid (TCA), and protein molecular weight markers were purchased from Fermentas Life Science.

2.2. Isolation and Purification of *P. dumosum* Trypsin Inhibitor (PdKI). *P. dumosum* seeds were obtained from the seed bank from IBAMA (Brazilian Environmental Institute of natural and renewable resources) in Natal-RN, Brazil. The crude protein extract was obtained from 100 g of seeds by continuous stirring with 50 mM sodium tetraborate buffer, pH 7.5 (1:10, w/v), at room temperature for about 3 h. After centrifugation for 30 min at 12000g at 4 °C, the proteins of the supernatant (crude extract) were precipitated by adding 20% TCA solution to a final concentration of 14%. After 30 min centrifugation at 12000g at 4 °C, the supernatant was dialyzed against 50 mM sodium tetraborate buffer, pH 7.5. This sample, with anti-tryptic activity, denoted JB14 (13 mg mL⁻¹) was applied to a trypsin-sepharose affinity column (10 cm \times 1.5 cm) equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. The retained proteins were eluted with 1 mM HCl solution at flow rate of 30 mL/h. The anti-tryptic peak, denoted JBaf, was pooled and submitted to a reverse-phase HPLC column (Vydac C-18), connected to LC-10A Shimadzu HPLC, and equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) solution with a gradient of solvent B (60% acetonitrile/0.1% TFA/H₂O); the chromatography was monitored at 220 nm. The proteins were separated in semipreparative (2.2 \times 25.0 cm, Vydac C-18 TP 1022) column at a flow rate of 9 mL/min with a gradient of 5–35% solution B for 10 min, followed by 35–60%, solution B for 25 min, 60–68% solution B for 5 min, 68–88% solution B for 20 min, 88–95% solution B for 10 min, 95–5% solution B for 2 min, and finally 5% solution B for 1 min. Four anti-tryptic peaks were obtained (JB1, JB2, JB3, and JB4), and JB1 was then again subjected to analytical reverse-phase (0.46 \times 25.0 cm, Vydac C-18 TP 104) column at a flow rate of 1 mL/min with a gradient of 5% solution B by 5 min followed 5–45% solution B for 5 min, 45–62% solution B for 17 min, 62–95% solution B for 2 min, and 5% solution for 1 min. The purified Kunitz-type trypsin inhibitor, PdKI, was subjected to further analysis.

2.3. Protein Concentration. Protein concentrations were determined by the dye-binding method of Bradford (22), with bovine serum albumin as the standard.

2.4. Characterization of the Kunitz Inhibitor from *P. dumosum* Seeds (PdKI). **2.4.1. Trypsin Inhibition Assay.** The inhibition of trypsin was determined by measuring the residual enzymatic activity toward the substrate BAPNA at pH 7.5 as describe by Erlanger et al. (23). Ten microliters of trypsin (0.3 mg/mL in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 20 mM CaCl₂) solution was preincubated for 10 min at 37 °C with 100 μ L of each retained fraction (inhibitor) obtained from trypsin-sepharose affinity column and 390 μ L of 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. The reaction was started with the addition of 250 μ L of 1.25 mM BAPNA solution, prepared in 1% (v/v) DMSO and 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. After 15 min at 37 °C, the reaction was stopped by adding 60 μ L of 30% acetic acid solution. Blanks were prepared in the same conditions as the tests, without addition of substrate, which was added after the addition of 30% acetic acid solution. The enzymatic hydrolysis of the substrate was evaluated by recording the absorbance at 410 nm. The constant of dissociation (K_i) was determined for bovine trypsin enzyme by preincubating the enzyme with increasing concentrations of purified inhibitor (2, 3, 4, and 5 μ g) in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 37 °C, followed by measurement of the residual activity using the synthetic substrate BAPNA (0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 2.0, and 2.5 mM). The velocity of the reaction was expressed as

1/ V (OD₄₄₀ h⁻¹ mL⁻¹), and the K_i value was determined using a double-reciprocal plot of data.

2.4.2. Papain Inhibition Assay. The papain inhibitory assay was determined essentially as described by Zhao et al. (24) using BANA as substrate. Ten microliters of papain (0.1 mg/mL in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0) solution was incubated for 10 min at 37 °C with 20 μ L of an activation solution containing 2 mM EDTA and 3 mM DTT in pH 6.0, 20 μ L of PdKI (1 μ g/ μ L), and 250 μ L of 25 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0. Reaction were started with the of 100 μ L of 1 mM BANA solution, prepared in 1% (v/v) DMSO and 25 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0. After 20 min at 37 °C, the reaction was stopped by adding 250 μ L of 2% HCl in ethanol. Blanks were prepared in same conditions as the tests, without addition of substrate, which was added after the addition of 2% HCl in ethanol. The color product was developed by the addition of 250 μ L of 0.06% *p*-dimethylaminocinnamaldehyde in ethanol and measured by absorbance at 540 nm. The constant of dissociation (K_i) was determined for papain by preincubating the enzyme with increasing concentrations of purified inhibitor (5, 10, 20, 30, and 40 μ g) in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0 at 37 °C, followed by measurement of the residual activity using the synthetic substrate BANA (0.4, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, and 3.0 mM in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5). The velocity rate of this reaction was expressed as 1/ V (O.D.₅₄₀ h⁻¹ mL⁻¹) and the K_i value was determined using a double-reciprocal plot of the data.

2.4.3. Thermal and pH Stability of PdKI. The thermal stability of PdKI (1 μ g/ μ L) was tested by incubation of protein at different temperatures (37, 40, 60, 70, 90, and 100 °C) for 30 min. After the samples were cooled at 4 °C for 10 min, the inhibitory assays against trypsin were performed. The stability in a broad range of pH was also checked. Samples of PdKI (1 μ g/ μ L) were prepared with 100 mM glycine-HCl (pH 2–3), 100 mM sodium phosphate (pH 6–8), and 100 mM glycine-HCl (pH 11–12). After incubation in each buffer for 30 min at 37 °C, the samples was dialyzed against 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, and the inhibitory activity assays against trypsin were performed using BAPNA as substrate. All assays were done in triplicate. The results of each series were expressed as the mean value \pm SD.

2.4.4. Specificity of PdKI toward Serine and Cysteine Proteinases. The ability of PdKI to inhibit other serine (bovine chymotrypsin and porcine elastase) proteinases and bromelain, a cysteine proteinase, was assayed using azocasein as substrate, as described by Xavier-Filho et al. (25).

2.4.5. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (15% SDS-PAGE) was conducted as described by Laemmli (26) at room temperature in the absence or presence of β -mercaptoethanol (0.1 M). For protein detection, gels were stained with 0.1% Coomassie brilliant blue R-250 followed by revelation with silver.

2.5. N-Terminal Sequencing. N-terminal amino acid sequence analysis of PdKI was determined at the Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, Brazil, using an automated protein sequencer from Shimadzu PSSQ-21A.

2.6. Mass Spectrometry. The molecular mass of PdKI was determined at the Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG, Brazil using an Ultraflex II Matrix-assisted laser desorption-time-of-flight (MALDI-TOF/TOF) from Bruker Daltonics, Billerica, MA. The sample was dissolved in a solution containing 5.0 mg of α -ciano-4-hidroxi-cinâmico, 300 μ L of Milli-Q water, 200 μ L of acetonitrile, and 50 μ L of 3% TFA. The solution was then vortex-mixed and 1 μ L was applied onto the sample plate.

2.7. In vitro Effects of PdKI toward Digestive Enzymes from Insect Pests. **2.7.1. Preparation of Insect Gut Proteinases.** *C. maculatus*, *Z. subfasciatus*, and *P. interpunctella* were supplied by the Laboratório de Química e Função de Proteínas from Departamento de Bioquímica, UFRN, Brazil. *A. argillacea* was obtained of the Centro de Pesquisa do Algodão (CNP/EMBRAPA), Campina Grande, Brazil, and *C. capitata* was obtained from the Laboratório de Mosca das Frutas of the Departamento de Biologia Celular e Genética, UFRN, Brazil. Insect colonies were maintained at 28 \pm 2 °C, 60–80% RH, and photoperiod of 12 h. Insect larvae proteinases were obtained after dissection and extraction of the guts. The guts were surgically removed from the animal and placed into an iso-osmotic saline (0.15 M NaCl) solution. Gut tissue

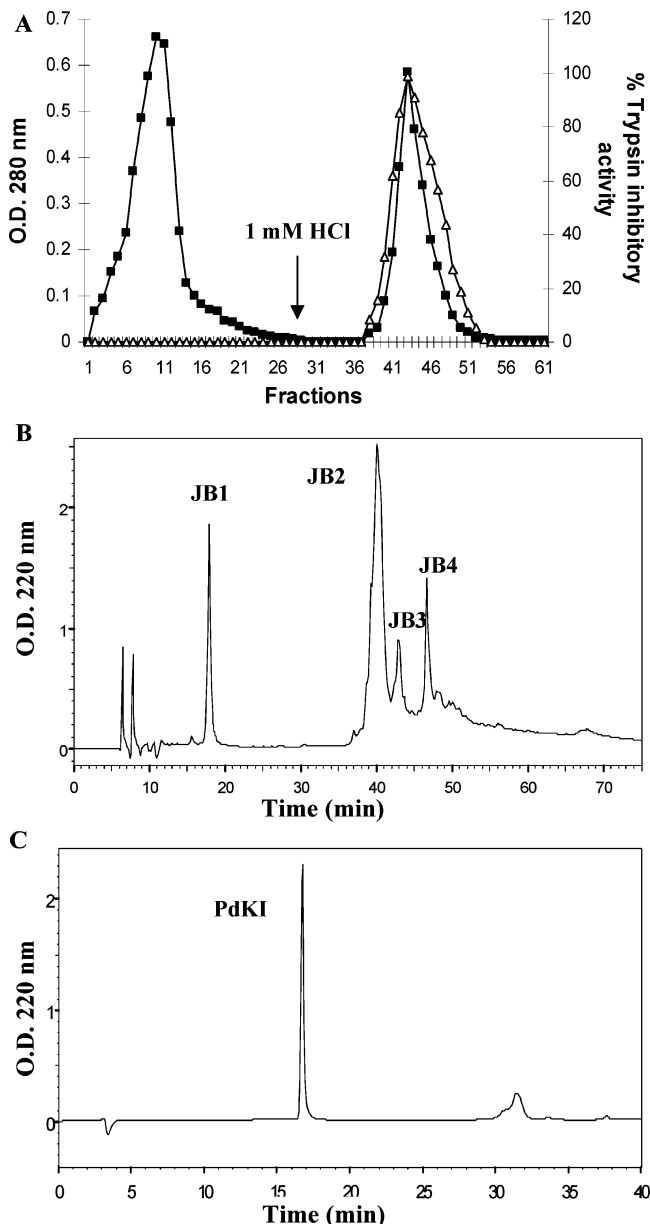


Figure 1. (A) Elution profile of JB14 on a trypsin–sepharose column. Column (10 cm \times 1.5 cm) was equilibrated with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, and the retained proteins were eluted with 1 mM HCl solution. The fractions of 2 mL were obtained and monitored at (■) 280 nm and (Δ) assayed against trypsin. (B) Elution profile of JB14 on HPLC (Vydac C-18) column. The fractions obtained from the trypsin–sepharose column were separated by a semipreparative reverse-phase HPLC column at a flow rate of 9 mL/min. The elution of the JB14 fraction revealed four peaks named JB1, JB2, JB3, and JB4. (C) The JB1 fraction was then subjected to another analytical reverse-phase HPLC column at a flow rate of 1 mL/min, and the single peak obtained was named of PdKI.

was homogenized in a potter at 4 °C for 10 min and centrifuged at 12000g at 4 °C for 10 min, and the supernatants were then recovered and used for *in vitro* assays.

2.7.2. PdKI Inhibitory Assay against Proteinases from Insect Pests. PdKI effects on the proteolytic activity of whole gut extracts were measured by using 1% azocasein as substrate. The assays were run in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, for *C. maculatus*, *Z. subfasciatus*, and *A. argillaceae*, and 50 mM Tris-HCl buffer in pH 8.5 and 9.5 for *C. capitata* and *P. interpunctella*. Aliquots of 290 μ L of the respective buffers were incubated with 50 μ L gut extracts and 20 μ L (1 μ g/ μ L) of PdKI at 37 °C for 15 min. Reactions were started with the addition of 500 μ L of 1% azocasein solution. After 30 min at 37 °C, the reaction

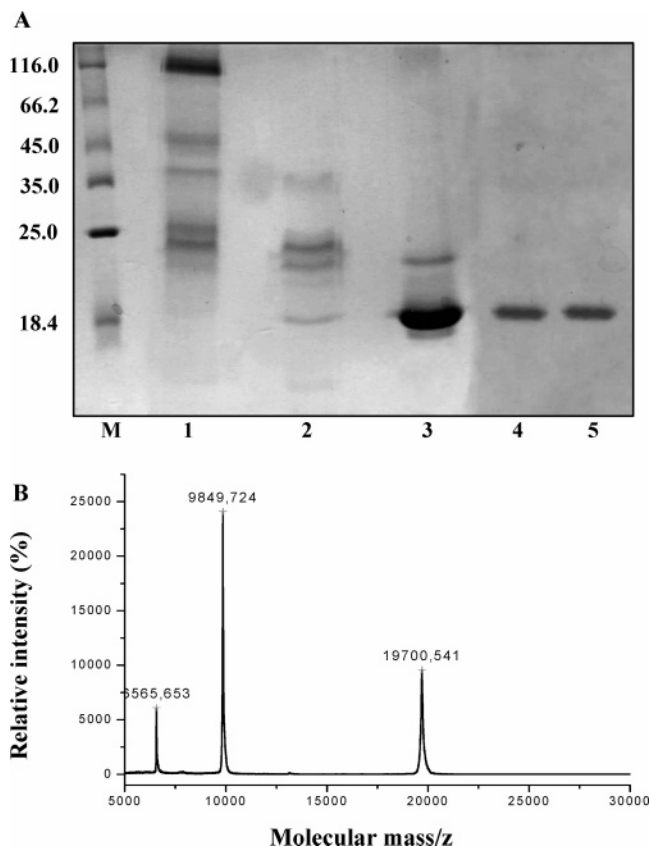


Figure 2. (A) SDS-PAGE (15%) of purified PdKI from *P. dumosum* seeds, stained with Coomassie followed by revelation with silver. (M) Protein molecular weight markers: β -galactosidase (116 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), lactate dehydrogenase (35 kDa), restriction endonuclease *Bsp*981 (25 kDa), β -lactoglobulin (18.4 kDa), and lysozyme (14.4 kDa). (1) Crude extract; (2) fraction treated with TCA (JB14); (3) trypsin–sepharose retained peak (JB14); (4) PdKI; (5) PdKI treated with β -mercaptoethanol. (B) MALDI-TOF/TOF spectrum of PdKI.

was stopped by adding 150 μ L of 20% TCA solution. The samples were centrifuged for 30 min at 12000g at room temperature, and the supernatants alkalized with 2 N NaOH solution. The residual proteolytic activity was measured by absorbance at 440 nm. All assays were done in triplicate. The results of each series were expressed as the mean value \pm SD.

3. RESULTS

3.1. Purification of PdKI. The soluble protein fraction obtained from 14% TCA precipitation showed strong inhibitory activity against trypsin and was applied to a trypsin–sepharose affinity column; the retained peak obtained had high antitryptic activity (Figure 1A). The anti-tryptic peak was then submitted to a reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC), and the elution profile (Figure 1B) showed separation of four protein peaks (named JB1, JB2, JB3, and JB4) with strong inhibitory activity against trypsin. The JB1 protein fraction was rechromatographed by reversed phase HPLC (Figure 1C), and a single peak with anti-tryptic activity (PdKI) was purified. SDS-PAGE (Figure 2A) in the absence and presence of β -mercaptoethanol showed that PdKI consisted of a single polypeptide chain with a molecular mass of 18.9 kDa and by MALDI-TOF analysis with molecular mass of 19.7 kDa (Figure 2B). The three peaks in the MALDI-TOF graphs represent different charged variants of the same protein, with charges of 1+, 2+, and 3+. The methodological procedure resulted in a high purification of 217.6-fold with a 4.7% yield (Table 1).

Table 1. Purification Steps of Kunitz Inhibitor from *P. dumosum*

steps	total inhibitory units (IU)	total protein (mg)	specific activity (UI mg ⁻¹) ^a	purification (fold)	yield (%)
crude extract	118560	1041.20	113.87	1.0	100
JB14	80800	18.00	4488.88	39.4	68
JBAf	8190	1.76	4653.40	40.9	6.9
PdKI	5526	0.223	24780.26	217.6	4.7

^a One trypsin protein inhibitor unit (1 UI) was defined as the inhibitor amount that decreased the absorbance at 410 nm by 0.1 O.D. in the trypsin assay conditions.

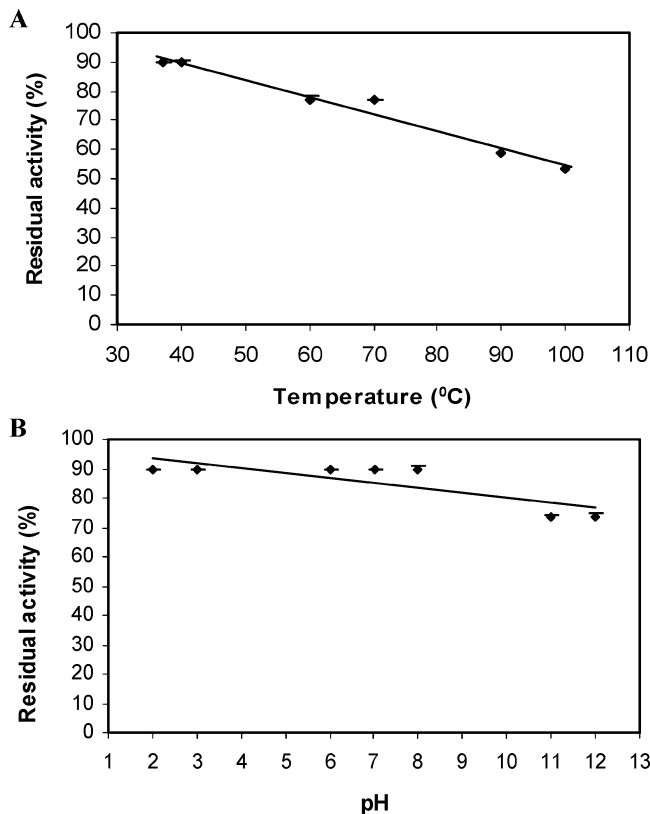


Figure 3. (A) Temperature stability of PdKI. (B) pH stability of PdKI. The residual trypsin inhibitory activity was measured using BAPNA as substrate in 50 mM Tris-HCL buffer, pH 7.5, after incubation for 30 min at 37 °C. Each mean represent three replicates (\pm SE).

3.2. Characterization of PdKI. **3.2.1. Thermal and pH Stabilities.** The study of the temperature effect on PdKI showed that the inhibitory activity was stable at 50 °C, losing only 40% of activity at 100 °C. (**Figure 3A**). Preincubation of the inhibitor in the pH range (2.0–12.0) did not affect trypsin activity (**Figure 3B**).

3.2.2. Specificity of PdKI to Serine and Cysteine Proteinases. PdKI weakly inhibited elastase and chymotrypsin, two serine proteinases of the same class of trypsin that was strongly inhibited (88.69% of inhibition). Cysteine proteinases were also tested, and it was observed that 34.01% of inhibition to papain and inhibition to bromelain was weakly detected (**Table 2**).

3.2.3. Kinetics of PdKI. To determine the inhibition mechanism of PdKI against trypsin and papain, we analyzed the inhibition kinetic data by Lineweaver–Burk plots (panels A and B of **Figure 4**). The analysis showed noncompetitive type kinetic of inhibition to papain and competitive to trypsin. The K_i value of trypsin was 3.56×10^{-8} M and that of papain was 5.1×10^{-7} M.

3.2.4. N-Terminal Amino Acid Sequence Analysis. The alignment of the N-terminal amino acid sequence of the protein PdKI with other proteinase inhibitors showed similarity with N-terminal sequences of the Kunitz inhibitor families (**Figure**

Table 2. Inhibitory Effect of PdKI toward Serine and Cysteine Proteinases

enzymes ^a	inhibition (%) ^b
serine proteinases	
bovine trypsin	88.69 \pm 0.86
porcine elastase	4.03 \pm 0.04
bovine chymotrypsin	5.04 \pm 0.11
cysteine proteinases	
bromelain	1.10 \pm 0.05
papain	34.01 \pm 1.44

^a Assays against elastase, chymotrypsin and bromelain, measured using 1% azocasein as substrate; the inhibitory activity against trypsin and papain was measured using BAPNA and BANA as substrate, respectively. ^b Values are mean \pm standard error, and each mean represents three replicates.

5). The similarity of alignment of the PdKI with Kunitz inhibitors from *Leucaena leucocephala* (LITKI), *Copaifera langsdorffii* (CITKI), and *Psophocarpus tetragonolobus* (PtTKI) were 40, 60, and 40%, respectively.

3.3. In Vitro Effect of PdKI on Digestive Proteinases from Different Orders of Insect Pests. The digestive proteinases from Coleopteran (*Z. subfasciatus*, *C. maculatus*) Lepidopteran (*P. interpunctella*, *A. argillaceae*), and Dipteran (*C. capitata*) pests were tested (**Table 3**). Among the different gut proteinases tested, PdKI showed high in vitro inhibitory effect on *Z. subfasciatus* (68.87%) and *C. capitata* (65.53%). Moderate inhibitory activity was observed for gut proteinases of *P. interpunctella* (44.35%), and *A. argillaceae* (38.36%), and low inhibitory activity was observed against gut proteinase from *C. maculatus* (29.18%).

4. DISCUSSION

Proteinaceous inhibitors have been purified and characterized from a variety of seed plant sources (27–33). The role of these inhibitors as defensive compounds against predators was studied as early as 1947, when Mickel and Standish (34) observed that larvae of certain insects were unable to develop on soybean products. A later report showed that trypsin inhibitors were toxic to *Tribolium confusum* (flour beetle) larvae (35). Following these studies, several research groups have investigated these proteins as candidates for developing new pest control strategies. Various proteinase inhibitors such as trypsin and/or chymotrypsin inhibitors (36, 37), subtilisin inhibitor (38), cathepsin D inhibitor (39, 40), and papain and/or cathepsin L inhibitor (41) have been purified from legume, cereal seeds, and tubercles (30, 40). These proteinaceous inhibitors have molecular masses (20–24 kDa) and primary structures similar to those of β -chain of soybean Kunitz-trypsin inhibitor family (19, 39) and are reunited in a Kunitz-type proteinase inhibitors superfamily. They play a significant role in the defense mechanism of plant against insect and phytopathogen attacks (35, 36, 38, 41).

In this study, a related Kunitz inhibitor from *P. domosum* seeds was purified and characterized and its effects on digestive proteinases from insect pests were examined in vitro. The PdKI

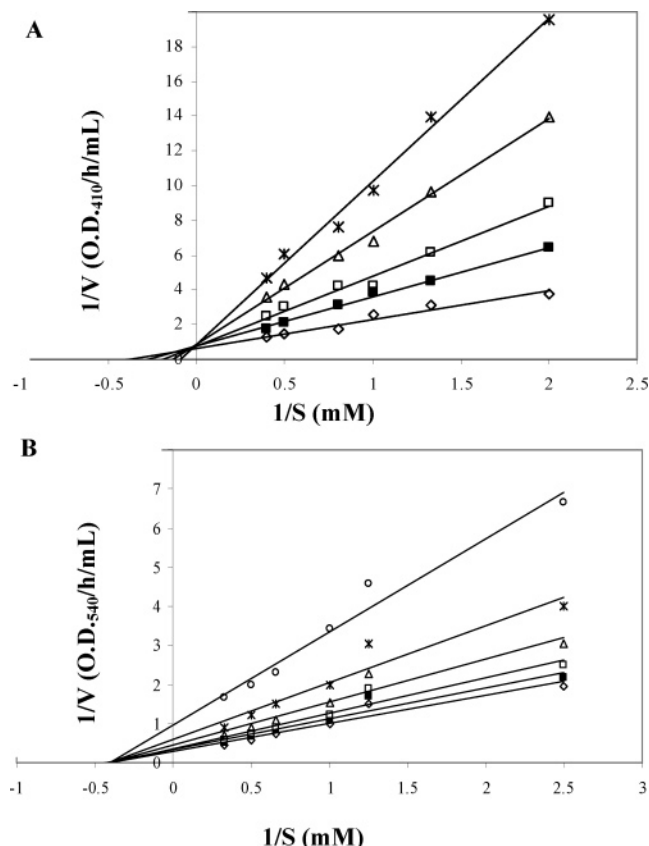


Figure 4. Kinetic analysis of trypsin and papain inhibition by PdKI activity. (A) Inhibition of trypsin activity by PdKI was competitive. Inhibition kinetic data are illustrated in Lineweaver–Burk double-reciprocal plots. PdKI activity was determined using various concentrations of BApNA as substrate. \diamond , No inhibitor in the assay mixture; \blacksquare , 2 μg of PdKI; \square , 3 μg of PdKI; \triangle , 4 μg of PdKI; $*$, 5 μg of PdKI. (B) Inhibition of papain activity by PdKI was noncompetitive. Inhibition kinetic data are illustrated in Lineweaver–Burk double-reciprocal plots. PdKI activity was determined using various concentrations of BANA as substrate. \diamond , No inhibitor in the assay mixture; \blacksquare , 5 μg of PdKI; \square , 10 μg of PdKI; \triangle , 20 μg of PdKI; $*$, 30 μg of PdKI; \circ , 40 μg of PdKI.

purified is a protein with a unique polypeptide chain of molecular mass of 19.7 kDa, in agreement with the molecular mass of other trypsin inhibitors (42–49). Thermal inactivation of PdKI at different temperatures resulted in a progressive loss of trypsin-inhibiting activity at temperatures >40 °C and an $\sim 40\%$ decrease at 100 °C. This property was similar to other trypsin inhibitors (30, 43, 49–52). The inhibitory activity of PdKI was not sensitive to pH in the range 2–12, as reported for ACTI (53), DMTI–II (49), PPTI (47), and PDTI (43). This relative stability of PdKI was possible due to intramolecular disulfide bridges, which are presumably responsible for the functional stability of Kunitz-type inhibitors in the presence of

Table 3. Inhibitory Effect of PdKI toward Gut Insect Proteinases

digestive enzymes ^a	inhibition (%) ^b
coleopteran	
<i>C. maculatus</i>	29.18 \pm 1.10
<i>Z. subfasciatus</i>	68.87 \pm 2.38
lepidopteran	
<i>A. argillaceae</i>	38.36 \pm 1.22
<i>P. interpunctella</i>	44.35 \pm 1.64
dipteran	
<i>C. capitata</i>	65.53 \pm 0.58

^a Assays against insect proteinases were measured using 1% Azocasein as substrate. ^b Values are mean \pm standard error, and each mean represents three replicates.

physical and chemical denaturants such as temperature and pH. PdKI, belonging to the Mimosoideae subfamily, weakly inhibited other serine proteinases, such as elastase and chymotrypsin, and was active against papain, a cysteine proteinase. Until now, only three related Kunitz-type inhibitors, all belonging to the Mimosoideae subfamily, were found to be active against papain-like enzymes, and were strongly active against enzymes from the midgut of bruchid larvae (8, 9, 51), suggesting that Kunitz-type inhibitors from this family are bifunctional inhibitors. The specificity of the Kunitz inhibitors varies among the subfamilies of the Fabaceae family. Some Kunitz-type inhibitors isolated from the most primitive species of the Caesalpinioideae subfamily have only activity for trypsin (42, 43, 46, 48), and others from the Papilionoideae or Faboideae subfamily contain chymotrypsin inhibitors and are known as Bowman–Birk type inhibitors (1, 5, 54), but Kunitz-type inhibitors are also found (33, 51, 52). The K_i for trypsin and papain of PdKI showed patterns similar to those of trypsin–papain Kunitz inhibitors, with higher K_i for trypsin than for papain (9, 51) and competitive to trypsin and noncompetitive to papain. Additional study using molecular modeling and docking experiments with PTPKI, another trypsin–papain Kunitz inhibitor, showed that the bifunctionality was due to the presence of two binding sites for the enzymes and that these sites were overlapping (7). This combination of activity against both serine and cysteine proteinases is highly attractive for the development of transgenic crops expressing these inhibitors.

The amino acid alignment analysis of the N-terminal sequence of PdKI with the Kunitz inhibitors from Mimosoideae *L. leucocephala* (55), Caesalpinioideae *C. langsdorffii*, (56) and Papilionoideae *P. tetragonolobus* (57) seeds showed similarities of 40, 60, and 40%, respectively. The relation between amino acid sequence similarities and enzyme specificities of Kunitz inhibitors could suggest that there is some relationship between this inhibitor family found in Fabaceae seeds and the evolution of these plants, but analysis of the complete amino acid sequence and comparative protein modeling could support this suggestion.

To effectively establish a novel insect control strategy, based on proteinaceous inhibitors, two initial steps are necessary, first

	10	20	% Similarity
LlTKI_m	QVLVDLDGDPLYN-GMSYYIL-		40
CITKI_c	-RLVDTDGKPIENDGAEEYYIL-		60
PtTKI_p	EPLLDSEGEIVRN-GGTYLL-		40
PdKI_m	-GVVLYSVTQVQY-RARYLLG		
	:: . :	* : *	

Figure 5. Partial sequence of the trypsin inhibitor (PdKI) aligned with other Kunitz family inhibitors. *L. leucocephala*, LlTKI, gi: 18202442, NCBI (55). *C. langsdorffii*, CITKI, gi: 49258682, NCBI (56). *P. tetragonolobus*, PtTKI, gi: 124938, NCBI (57).

purification of the inhibitor and second the knowledge of the digestive system of target insects. The digestive system of phytophagous pests is based mainly on serine and cysteine proteinase classes, where serine proteinases are the major enzymes found in Lepidoptera and Diptera orders and acid and cysteine proteinases are predominant in Coleopterans of the Bruchidae family (58–61). To verify the activity of purified PdKI, the digestive proteinases of Coleopteran, Lepdopteran, and Dipteran pests were extracted and assayed against PdKI. Results showed high in vitro inhibitory effect on colepterans *Z. subfasciatus* (68.87%) and dipteran *C. capitata* (65.53%). Moderate inhibitory activity was also observed for gut proteinases of lepidopteran *P. interpunctella* (44.35%) and *A. argillaceae* (38.36%); low inhibitory activity was observed against gut proteinase from coleopteran *C. maculatus* (29.18%). A number of Kunitz-related inhibitors from plants were evaluated in vitro for their potential of decreasing the activity of Lepidopteran/Coleopteran larvae digestive enzymes. SKTI showed a potent in vitro inhibitory activity against *A. grandis* gut proteinases (21). SKTI and CpTI were shown to be active against tomato moth larvae (*L. oleracea*). Serine proteinases (62) acted on *H. armigera*, *H. virescens*, and *L. cuprina*, in which SKTI was the most effective among the inhibitors tested (63–68). ApTI and DMII inhibited 84% (9) and 80% (69) of the digestive trypsin-like enzymes of Coleopteran (Bruchidae) *C. maculatus*. Inhibitors of proteinases have been used successfully for protection of engineered plants. In many cases, transgenic plants containing genes encoding only serine proteinase inhibitors have shown enhanced resistance toward insect pests (16, 62, 68), but this effect is lost when insect pests develop escape mechanisms.

This work shows a trypsin–papain Kunitz inhibitor active in vitro toward insect pests. These results could indicate that transgenic plants expressing the PdKI gene could probably enhance resistance against potential predators that utilize serine proteinase and cysteine proteinases or might be unable to express cysteine proteinases after exposition at proteinase inhibitors.

ABBREVIATIONS USED

ApTI, *Adenanthera pavonina* trypsin inhibitor; ACTI, *Acacia confusa* trypsin inhibitor; CITKI, *Copaifera langsdorffii* trypsin Kunitz inhibitor; CpTI, cowpea trypsin inhibitor; DMII–II, *Dimorphandra mollis* trypsin inhibitor; LITKI, *Leucaena leucocephala* trypsin Kunitz inhibitor; PDTI, *Peltophorum dubium* trypsin inhibitor; PPTI, *Poecilanthus parviflora* trypsin inhibitor; PTPKI, *Prosopis* trypsin–papain Kunitz inhibitor; PtTKI, *Psophocarpus tetragonolobus* trypsin Kunitz inhibitor; SKTI, soybean Kunitz trypsin inhibitor.

LITERATURE CITED

- Lawrence, P. K.; Koundal, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic J. Biotechnol.* **2002**, *5* (1), 93–109.
- Krattiger, A. F. *Insect resistance in crops: A case study of Bacillus thuringiensis (Bt) and its transfer to developing countries*. ISAAA: Ithaca, NY, 1997; Vol. 2, p 42.
- Franco, O. L.; Melo, F. R. Osmoprotectants - A plant strategy in response to osmotic stress. *Russian J. Plant Physiol.* **2000**, *47* (1), 137–144.
- Pernas, M.; Sanchez-Mong, R.; Salcedo, G. Biotic and abiotic stress can induce cystatin expression in chestnut. *FEBS Lett.* **2000**, *467* (2–3), 206–210.
- Richardson, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In *Methods in Plant Biochemistry*; Dey, P. M., Harborne, J. B.; Academic Press: New York, 1991; Vol. 5, pp 259–305.

- Bode, W.; Huber, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1477* (1–2), 241–252.
- Franco, O. L.; de Sa, M. F. G.; Sales, M. P.; Mello, L. V.; Oliveira, A. S.; Rigden, D. J. Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2002**, *49* (3), 335–341.
- Oliveira, A. S.; Pereira, R. A.; Lima, L. M.; Morais, A. H. A.; Melo, F. R.; Franco, O. L.; Bloch, C.; Grossi-de-Sa, M. F.; Sales, M. P. Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the algaroba tree (*Prosopis juliflora* DC). *Pestic. Biochem. Physiol.* **2002**, *72* (2), 122–132.
- Macedo, M. L. R.; De Sa, C. M.; Freire, M. D. M.; Parra, J. R. P. A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, (9), 2533–2540.
- Walker, A. J.; Ford, L.; Majerus, M. E. N.; Geoghegan, I. E.; Birch, N.; Gatehouse, J. A.; Gatehouse, A. M. R. Characterization of the mid-gut digestive proteinase activity of the two-spot ladybird (*Adalia bipunctata* L.) and its sensitivity to proteinase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *28*, (3), 173–180.
- Melo, F. R.; Rigden, D. J.; Franco, O. L.; Mello, L. V.; Ary, M. B.; de Sa, M. F. G.; Bloch, C. Inhibition of trypsin by cowpea thionin: Characterization, molecular modeling, and docking. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2002**, *48* (2), 311–319.
- Xavier-Filho, J. The Biological Roles of Serine and Cysteine Proteinase Inhibitors in Plants. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* **1992**, *4*, (1), 1–6.
- Bode, W.; Huber, R. Natural Protein Proteinase-Inhibitors and Their Interaction with Proteinases. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *204*, (2), 433–451.
- Broadway, R. M.; Duffey, S. S. Plant proteinase inhibitor: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.* **1986**, *32*, 827–833.
- Yeh, K. W.; Lin, M. I.; Tuan, S. J.; Chen, Y. M.; Lin, C. Y.; Kao, S. S. Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*. *Plant Cell Rep.* **1997**, *16* (10), 696–699.
- Johnson, R.; Narvaez, J.; An, G. H.; Ryan, C. Expression of Proteinase Inhibitor-I and Inhibitor-II in Transgenic Tobacco Plants—Effects on Natural Defense against *Manduca Sexta* Larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1989**, *86* (24), 9871–9875.
- Reed, B. J.; Chandler, D. S.; Sandeman, R. M. Aminopeptidases as potential targets for the control of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Int. J. Parasitol.* **1999**, *29* (6), 839–850.
- Franco, O. L.; dos Santo, R. C.; Batista, J. A. N.; Mendes, A. C. M.; de Araujo, M. A. M.; Monnerat, R. G.; Grossi-de-Sa, M. F.; de Freitas, S. M. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. *Phytochemistry* **2003**, *63* (3), 343–349.
- Gatehouse, A. M. R.; Boulter, D. Assessment of the Antimetabolic Effects of Trypsin-Inhibitors from Cowpea (*Vigna-Unguiculata*) and Other Legumes on Development of the Bruchid Beetle *Callosobruchus-Maculatus*. *J. Sci. Food Agric.* **1983**, *34* (4), 345–350.
- Lepel, J. C.; Bonadebottino, M.; Augustin, S.; Pilate, G.; Letan, V. D.; Delplanque, A.; Cornu, D.; Jouanin, L. Toxicity to *Chrysomela-Tremulae* (Coleoptera, Chrysomelidae) of Transgenic Poplars Expressing a Cysteine Proteinase-Inhibitor. *Mol. Breeding* **1995**, *1* (4), 319–328.
- Franco, O. L.; Dias, S. C.; Magalhaes, C. P.; Monteiro, A. C. S.; Bloch, C.; Melo, F. R.; Oliveira-Neto, O. B.; Monnerat, R. G.; Grossi-de-Sa, M. F. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Phytochemistry* **2004**, *65* (1), 81–89.

- (22) Bradford, M. M. Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72* (1–2), 248–254.
- (23) Erlanger, B. F.; Edell, F.; Cooper, A. G. Action of Chymotrypsin on 2 New Chromogenic Substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* **1966**, *115* (1), 206–&.
- (24) Zhao, Y.; Botella, M. A.; Subramanian, L.; Niu, X. M.; Nielsen, S. S.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. *Plant Physiol.* **1996**, *111* (4), 1299–1306.
- (25) Xavierfilho, J.; Campos, F. A. P.; Ary, M. B.; Silva, C. P.; Carvalho, M. M. M.; Macedo, M. L. R.; Lemos, F. J. A.; Grant, G. Poor Correlation between the Levels of Proteinase-Inhibitors Found in Seeds of Different Cultivars of Cowpea (*Vigna-Unguiculata*) and the Resistance Susceptibility to Predation by *Callosobruchus-Maculatus*. *J. Agric. Food Chem.* **1989**, *37* (4), 1139–1143.
- (26) Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680.
- (27) Hilder, V. A.; Barker, R. F.; Samour, R. A.; Gatehouse, A. M. R.; Gatehouse, J. A.; Boulter, D. Protein and Cdna Sequences of Bowman-Birk Protease Inhibitors from the Cowpea (*Vigna-Unguiculata* Walp). *Plant Mol. Biol.* **1989**, *13* (6), 701–710.
- (28) Macedo, M. L. R.; Xavier, J. Purification and Partial Characterization of Trypsin-Inhibitors from Seeds of *Clitoria-Ternatea*. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, *58* (1), 55–58.
- (29) Negreiros, A. N. M.; Carvalho, M. M.; Filho, J. X.; Biancolabra, A.; Shewry, P. R.; Richardson, M. The Complete Amino-Acid-Sequence of the Major Kunitz Trypsin-Inhibitor from the Seeds of *Prosopis-Juliflora*. *Phytochemistry* **1991**, *30* (9), 2829–2833.
- (30) Mello, G. C.; Oliva, M. L. V.; Sumikawa, J. T.; Machado, O. L. T.; Marangoni, S.; Novello, J. C.; Macedo, M. L. R. Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds. *J. Protein Chem.* **2001**, *20* (8), 625–632.
- (31) Odani, S.; Koide, T.; Ono, T. The Complete Amino-Acid-Sequence of Barley Trypsin-Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258* (13), 7998–8003.
- (32) Pearce, G.; Sy, L.; Russell, C.; Ryan, C. A.; Hass, G. M. Isolation and characterization from potato tubers of two polypeptide inhibitors of serine proteinases. *Arch. Biochem. Biophys.* **1982**, *213* (2), 456–62.
- (33) Araujo, C. L.; Bezerra, I. W. L.; Oliveira, A. S.; Moura, F. T.; Macedo, L. L. P.; Gomes, C. E. M.; Barbosa, A. E. A. D.; Macedo, F. P.; Souza, T. M. S.; Franco, O. L.; Bloch-J. C.; Sales, M. P. In vivo bioinsecticidal activity toward *Ceratitidis capitata* (Fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (Cowpea weevil) and in vitro bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (*Tamarindus indica*) seeds. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (11), 4381–4387.
- (34) Mickel, C. E.; Standish, J. Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum*. In *University of Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin*; University of Minnesota: St. Paul, MN, 1947; pp 1–20.
- (35) Walsh, T. A.; Twitchell, W. P. 2 Kunitz-Type Proteinase-Inhibitors from Potato-Tubers. *Plant Physiol.* **1991**, *97*, (1), 15–18.
- (36) Suh, S. G.; Stiekema, W. J.; Hannapel, D. J. Proteinase-Inhibitor Activity and Wound-Inducible Gene-Expression of the 22-Kda Potato-Tuber Proteins. *Planta* **1991**, *184* (4), 423–430.
- (37) Mares, M.; Meloun, B.; Pavlik, M.; Kostka, V.; Baudys, M. Primary Structure of Cathepsin-D Inhibitor from Potatoes and Its Structure Relationship to Soybean Trypsin-Inhibitor Family. *FEBS Lett.* **1989**, *251* (1–2), 94–98.
- (38) Strukelj, B.; Pungercar, J.; Mesko, P.; Barlicmaganja, D.; Gubensek, F.; Kregar, I.; Turk, V. Characterization of Aspartic Proteinase-Inhibitors from Potato at the Gene, Cdna and Protein-Levels. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1992**, *373* (7), 477–482.
- (39) Krizaj, I.; Drobnickosorok, M.; Brzin, J.; Jerala, R.; Turk, V. The Primary Structure of Inhibitor of Cysteine Proteinases from Potato. *FEBS Lett.* **1993**, *333* (1–2), 15–20.
- (40) Valueva, T. A.; Revina, T. A.; Kladnitskaya, G. V.; Mosolov, V. V. Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and Phytophthora-infected potato tubers. *FEBS Lett.* **1998**, *426* (1), 131–134.
- (41) Ishikawa, A.; Ohta, S.; Matsuoka, K.; Hattori, T.; Nakamura, K. A Family of Potato Genes That Encode Kunitz-Type Proteinase-Inhibitors - Structural Comparisons and Differential Expression. *Plant Cell Physiol.* **1994**, *35* (2), 303–312.
- (42) Di Ciero, L.; Oliva, M. L. V.; Torquato, R.; Kohler, P.; Weder, J. K. P.; Novello, J. C.; Sampaio, C. A. M.; Oliveira, B.; Marangoni, S. The complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from *Bauhinia variegata* var. candida seeds. *J. Protein Chem.* **1998**, *17*, (8), 827–834.
- (43) Macedo, M. L. R.; Freire, M. D. M.; Cabrini, E. C.; Toyama, M. H.; Novello, J. C.; Marangoni, S. A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1621* (2), 170–182.
- (44) Cruz-Silva, I.; Gozzo, A. J.; Nunes, V. A.; Carmona, A. K.; Faljoni-Alario, A.; Oliva, M. L. V.; Sampaio, M. U.; Sampaio, C. A. M.; Araujo, M. S. A proteinase inhibitor from *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) seeds for plasma kallikrein, plasmin and factor XIIa. *Biol. Chem.* **2004**, *385* (11), 1083–1086.
- (45) Liao, H.; Ren, W.; Kang, Z.; Jiang, J. H.; Zhao, X. J.; Du, L. F. A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*. *Biotechnol. Lett.* **2007**, *29* (4), 653–8.
- (46) Pando, L. A.; Di Ciero, L.; Novello, J. C.; Oliveira, B.; Weder, J. K. P.; Marangoni, S. Isolation and characterization of a new trypsin inhibitor from *Crotalaria paulina* seeds. *IUBMB Life* **1999**, *48*, (5), 519–523.
- (47) Garcia, V. A.; Freire, M. G.; Novello, J. C.; Marangoni, S.; Macedo, M. L. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases. *Protein J.* **2004**, *23* (5), 343–50.
- (48) Nakahata, A. M.; Bueno, N. R.; Rocha, H. A. O.; Franco, C. R. C.; Chammas, R.; Nakaie, C. R.; Jasiulionis, M. G.; Nader, H. B.; Santana, L. A.; Sampaio, M. U.; Oliva, M. L. V. Structural and inhibitory properties of a plant proteinase inhibitor containing the RGD motif. *Int. J. Biol. Macromol.* **2006**, *40* (1), 22–29.
- (49) Macedo, M. L. R.; de Matos, D. G. G.; Machado, O. L. T.; Marangoni, S.; Novello, J. C. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochemistry* **2000**, *54* (6), 553–558.
- (50) Souza, E. M.; Teles, R. C.; M., A. S. E.; Freitas, S. M. Effects of denaturing and stabilizing agents on the inhibitory activity and conformational stability of *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor. *J. Protein Chem.* **2000**, *19* (6), 507–13.
- (51) Gomes, C. E. M.; Barbosa, A. E. A. D.; Macedo, L. L. P.; Pitanga, J. C. M.; Moura, F. T.; Oliveira, A. S.; Moura, R. M.; Queiroz, A. F. S.; Macedo, F. P.; Andrade, L. B. S.; Vidal, M. S.; Sales, M. P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitidis capitata* (fruit fly). *Plant Physiol. Biochem.* **2005**, *43* (12), 1095–1102.
- (52) Bhattacharyya, A.; Mazumdar, S.; Leighton, S. M.; Babu, C. R. A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: purification, characterization, and kinetic properties. *Phytochemistry* **2006**, *67* (3), 232–41.
- (53) Lin, J. Y.; Chu, S. C.; Wu, H. C.; Hsieh, Y. S. Trypsin-Inhibitor from the Seeds of *Acacia-Confusa*. *J. Biochem.* **1991**, *110* (6), 879–883.
- (54) Norioka, N.; Hara, S.; Ikenaka, T.; Abe, J. Distribution of the Kunitz and the Bowman-Birk family proteinase inhibitors in leguminous seeds. *Agric. Biol. Chem.* **1988**, *52* (5), 1245–1252.

- (55) Oliva, M. L. V.; Souza-Pinto, J. C.; Batista, I. F. C.; Araujo, M. S.; Silveira, V. F.; Auerswald, E. A.; Mentele, R.; Eckerskorn, C.; Sampaio, M. U.; Sampaio, C. A. M. *Leucaena leucocephala* serine proteinase inhibitor: primary structure and action on blood coagulation, kinin release and rat paw edema. *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1477* (1–2), 64–74.
- (56) Silva, J. A.; Macedo, M. L. R.; Novello, J. C.; Marangoni, S. Biochemical characterization and N-terminal sequences of two new trypsin inhibitors from *Copaifera langsdorffii* seeds. *J. Protein Chem.* **2001**, *20* (1), 1–7.
- (57) Yamamoto, M.; Hara, S.; Ikenaka, T. Amino acid sequences of two trypsin inhibitors from winged bean seeds (*Psophocarpus tetragonolobus* (L)DC.). *J. Biochem. (Tokyo)* **1983**, *94* (3), 849–63.
- (58) Lemos, F. J. A.; Campos, F. A. P.; Silva, C. P.; Xavierfilho, J. Proteinases and Amylases of Larval Midgut of *Zabrotes-Subfasciatus* Reared on Cowpea (*Vigna-Unguiculata*) Seeds. *Entomol. Exp. Appl.* **1990**, *56* (3), 219–227.
- (59) Silva, C. P.; Xavierfilho, J. Comparison between the Levels of Aspartic and Cysteine Proteinases of the Larval Midguts of *Callosobruchus-Maculatus* (F) and *Zabrotes-Subfasciatus* (Boh) (Coleoptera, Bruchidae). *Comp. Biochem. Physiol., Part B: Biochem. Mol. Biol.* **1991**, *99* (3), 529–533.
- (60) Koiwa, H.; Shade, R. E.; Zhu-Salzman, K.; D'Urzo, M. P.; Murdock, L. L.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive cysteine proteinases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *FEBS Lett.* **2000**, *471* (1), 67–70.
- (61) Girard, C.; Le, Metayer, M.; Bonade-Bottino, M.; Pham-Delegue, M. H.; Jouanin, L. High level of resistance to proteinase inhibitors may be conferred by proteolytic cleavage in beetle larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **1998**, *28* (4), 229–237.
- (62) Gatehouse, A. M. R.; Norton, E.; Davison, G. M.; Babbe, S. M.; Newell, C. A.; Gatehouse, J. A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors in vitro and in vivo. *J. Insect Physiol.* **1999**, *45* (6), 545–558.
- (63) Ahamad, Z.; Saleemuddin, M.; Siddi, M. Purification and characterization of three alkaline proteinases from the midgut of the larvae of army worm, *Spodoptera litura*. *Insect Biochem.* **1980**, *10*, 667–673.
- (64) Casu, R. E.; Jarmey, J. M.; Elvin, C. M.; Eisemann, C. H. Isolation of a trypsin-like serine protease gene family from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*. *Insect Mol. Biol.* **1994**, *3* (3), 159–70.
- (65) Ferreira, C.; Capella, A. N.; Sitnik, R.; Terra, W. R. Properties of the Digestive Enzymes and the Permeability of the Peritrophic Membrane of *Spodoptera-Frugiperda* (Lepidoptera) Larvae. *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* **1994**, *107* (4), 631–640.
- (66) Johnston, K. A.; Lee, M. J.; Brough, G.; Hilder, V. A.; Gatehouse, A. M. R.; Gatehouse, J. A. Protease Activities in the Larval Midgut of *Heliothis Virescens* - Evidence for Trypsin and Chymotrypsin-Like Enzymes. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **1995**, *25* (3), 375–383.
- (67) Johnston, K. A.; Lee, M. J.; Gatehouse, J. A.; Anstee, J. H. The Partial-Purification and Characterization of Serine Protease Activity in Midgut of Larval *Helicoverpa-Armigera*. *Insect. Biochem.* **1991**, *21* (4), 389–397.
- (68) De Leo, F.; Bonade-Bottino, M.; Ceci, L. R.; Gallerani, R.; Jouanin, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* **2001**, *31* (6–7), 593–602.
- (69) Macedo, M. L. R.; Mello, G. C.; Freire, M. D. G. M.; Novello, J. C.; Marangoni, S.; de Matos, D. G. G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. *Plant Physiol. Biochem.* **2002**, *40* (10), 891–898.

Received for review April 16, 2007. Revised manuscript received June 16, 2007. Accepted June 20, 2007. We are grateful for the grants and support provided by the following Brazilian Agencies: FINEP, CAPES, CNPq, and FUNDECI-BNB.

JF071107+

9.2 APÊNDICE B - Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds and its *in vitro* effects towards digestive of enzyme insect pests

Plant Physiology and Biochemistry 45 (2007) 858-865

Purification and characterization of a trypsin-papain inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds and its *in vitro* effects towards digestive enzymes from insect pests

Adeliana S. Oliveira ^{a,b}, Ludovico Migliolo ^a, Rodrigo O. Aquino ^a, Jannison K.C. Ribeiro ^a, Leonardo L.P. Macedo ^a, Lucia B.S. Andrade ^{b,c}, Marcelo P. Bemquerer ^d, Elizeu A. Santos ^a, Sumika Kiyota ^e, Maurício P. de Sales ^{a,*}

^a Departamento Bioquímica, Laboratório de Química e Função de Proteínas, Centro de Biociências, Campus UFRN, Av. Salgado Filho s/n, 59072-970 Natal, RN, Brazil

^b Departamento Bioquímica Biologia Molecular, CC, UFC-Fortaleza, CE, Brazil

^c Departamento de Biologia, UVA, Sobral, CE, Brazil

^d Departamento Bioquímica Imunologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

^e LBPP, Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brazil

Keywords: *Pithecellobium dumosum*; Plant defense; Kunitz type inhibitor; Insect pests

Research article

Purification and characterization of a trypsin–papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its *in vitro* effects towards digestive enzymes from insect pests

Adeliana S. Oliveira^{a,b}, Ludovico Migliolo^a, Rodrigo O. Aquino^a, Jannison K.C. Ribeiro^a, Leonardo L.P. Macedo^a, Lucia B.S. Andrade^{b,c}, Marcelo P. Bemquerer^d, Elizeu A. Santos^a, Sumika Kiyota^e, Maurício P. de Sales^{a,*}

^a Departamento Bioquímica, Laboratório de Química e Função de Proteínas, Centro de Biociências, Campus UFRN, Av. Salgado Filho s/n, 59072-970 Natal, RN, Brazil

^b Departamento Bioquímica Biologia Molecular, CC, UFC-Fortaleza, CE, Brazil

^c Departamento de Biologia, UVA, Sobral, CE, Brazil

^d Departamento Bioquímica Imunologia, ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brazil

^e LBPP, Instituto Biológico, São Paulo, SP, Brazil

Received 3 May 2007; accepted 6 August 2007

Available online 11 August 2007

Abstract

A novel trypsin–papain inhibitor, named PdKI-2, was purified from the seeds of *Pithecelobium dumosum* seeds by TCA precipitation, Trypsin–Sephadex chromatography and reversed-phase HPLC. PdKI-2 had an M_r of 18.1 kDa as determined by SDS–PAGE and was composed of a single polypeptide chain. The inhibition on trypsin was stable at pH range 2–10, temperature of 50 °C and had a K_i value of 1.65×10^{-8} M, with a competitive inhibition mechanism. PdKI-2 was also active to papain, a cysteine proteinase, and showed a noncompetitive inhibition mechanism and K_i value of 5.1×10^{-7} M. PdKI-2 was effective against digestive proteinase from bruchids *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus*; Dipteran *Ceratitis capitata*; Lepidopterans *Plodia interpunctella* and *Alabama argillacea*, with 74.5%, 70.0%, 70.3%, 48.7%, and 13.6% inhibition, respectively. Results support that PdKI-2 is a member of Kunitz-inhibitor family and its effect on digestive enzyme larvae from diverse orders indicated this protein as a potent insect antifeedant.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: *Pithecelobium dumosum*; Plant defense; Kunitz type inhibitor; Insect pests

1. Introduction

Proteinaceous inhibitors (PI) are small protein molecules that have the ability to inhibit the action of target proteolytic enzymes. They are found in most organisms, mainly in plants, where they are widely distributed among different families and are particularly abundant (1–10% of the total proteins) in storage organs such seeds and tubers [1,2]. These inhibitors are

important in a variety of ways [2,3], including acting as storage protein [4], as regulators of endogenous proteolytic activity [5], and as participants in mechanisms of programmed plant cell death [6]. In addition, PI are expressed in response to abiotic stress [7] and in plant defense processes against insect attacks [5,8]. These inhibitors are classified as serine, cysteine, aspartic and metalloproteinase inhibitors [1,5]. A large number of those inhibitors are serine proteinase inhibitors and were especially isolated from Solanaceae, Graminaceae, and Leguminosae plant families [1]. Among the families of the serine proteinase inhibitors, the Bowman–Birk and Kunitz-type families are the best characterized. These families

* Corresponding author. Tel.: +55 84 3215 3416; fax: +55 84 3211 9208.

E-mail address: msales@cb.ufrn.br (M.P. de Sales).

differ, in general, from each other in mass, cysteine content, and number of reactive sites. Bowman–Birk-type inhibitors have a molecular mass of 8–10 kDa, high cysteine content and two reactive sites. On the other hand the Kunitz-type inhibitors are proteins of molecular mass of 18–26 kDa, with low cysteine content and a single reactive site [1,5], but recent studies showed that other reactive sites are present in this protein family [9–11]. The use of inhibitors in insect control strategies has good potential, because insect digestive proteinases are promising targets in the control of various insects, including lepidopterans such as *Manduca sexta* [12], *Heliothis zea* [13], *Spodoptera litura* [14], *Lucila cuprina* [15], and also various coleopterans [10,16–18]. Several Kunitz trypsin inhibitors were capable of inhibiting the proteolytic activity of several lepidopterans, such as the black cutworm (*Agrotis ipsilon*), corn earworm (*H. zea*), tobacco budworm (*Heliothis virescens*), western spruce budworm (*Choristoneura occidentalis*) [19] and cotton leafworm (*Alabama argillacea*) [10,16], and coleopterans such as the cotton boll weevil [20] and cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* [10,16,21,22].

This study reports the purification, characterization and *in vitro* effects of a trypsin–papain inhibitor from *P. dumosum* seeds, a leguminosae (Fabaceae) tree from subfamily Mimosoideae, towards larval digestive enzymes from lepidopteran *Alabama argillacea* and *Plodia interpunctella*, coleopteran *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*, and the dipteran *Ceratitis capitata*.

2. Material and methods

2.1. Material

Trypsin, chymotrypsin, elastase, papain and bromelain, *N*α-benzoyl-DL-arginine-*p*-nitroanilide (BAPNA), *N*α-benzoyl-DL-Arg β-naphthylamide (BANA), trichloroacetic acid (TCA), and protein molecular weight markers β-galactosidase (116 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), lactate dehydrogenase (35 kDa), restriction endonuclease *Bsp*981 (25 kDa), β-lactoglobulin (18 kDa) and lysozyme (14 kDa) were purchased from Fermentas Life Science.

2.2. Purification of trypsin inhibitor (PdKI-2)

P. dumosum seeds were obtained from the IBAMA (Brazilian Environmental Institute) seed bank in Natal/RN-Brazil. The crude protein extract was obtained from 100 g seeds by continuous stirring with 50 mM tetraborate sodium, pH 7.5 buffer at room temperature for about 3 h. After centrifugation for 30 min at 12,000 × *g* at 4 °C, the proteins of the supernatant (crude extract) were precipitated by adding 20% TCA solution to a final concentration of 14%. After 30 min centrifugation at 12,000 × *g* at 4 °C, the supernatant was dialyzed against 50 mM tetraborate sodium, pH 7.5 buffer. This sample, with anti-tryptic activity, denoted JB was applied to a Trypsin–Sepharose affinity column (10 cm × 1.5 cm) equilibrated with 50 mM Tris–HCl, pH 7.5 buffer. The retained proteins were eluted with 1 mM HCl solution at flow rate of

30 ml h⁻¹. The anti-tryptic peak was pooled and applied to a reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) column (Vydac C-18), equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) solution at rate of 9 ml min⁻¹. Sample was eluted with a gradient of Solvent B (60% acetonitrile/0.1% TFA/H₂O) and the chromatography was monitored at 220 nm. The proteins were separated in semi-preparative (2.2 × 25.0 cm) column with gradient of 5–35% Solvent B — 10 min; 35–60% Solvent B — 25 min; 60–68% Solvent B — 5 min; 68–88% Solvent B — 20 min; 88–95% Solvent B — 10 min; 95–5% Solvent B — 2 min; and 5% Sol.B—1 min. Four anti-tryptic peaks were obtained (JB1, PdKI-2, JB3 and JB4), and PdKI-2 was then again subjected to analytical reverse-phase (0.46 × 25.0 cm) column at a flow rate of 1 ml/min as follows: 0–5 min, 5% Solvent B; 5–10 min, 55% Solvent B; 10–30 min, 75% Solvent B; 30–32 min, 95% Solvent B; 32–42 min, 95% Solvent B; 42–44 min, 5% Solvent B; 44–45 min, 5% Solvent B. The purified protein, named PdKI-2, was subjected to further analysis.

2.3. Protein concentration

Protein concentrations were determined by the dye-binding method of Bradford [23], with bovine serum albumin as the standard.

2.4. Polyacrylamide gel electrophoresis

Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (15% SDS–PAGE) was conducted as described by Laemmli [24] at room temperature in the absence or presence of β-mercaptoethanol (0.1 M). For protein detection, gels were revealed with silver.

2.5. Characterization of the Kunitz *Pithecelobium dumosum* inhibitor (PdKI-2)

2.5.1. Trypsin inhibition assay

The inhibition of trypsin was determined by measuring the residual enzymatic activity towards the substrate BAPNA at pH 7.5. Ten microliters of trypsin (0.3 mg ml⁻¹ in 50 mM Tris–HCl, pH 7.5 buffer containing 20 mM CaCl₂) solution were pre-incubated for 10 min at 37 °C with 100 μl of inhibitor solution and 390 μl of 50 mM Tris–HCl, pH 7.5. The reaction were started with the addition of 250 μl of 1.25 mM BAPNA solution, prepared in 1% (v/v) DMSO and 50 mM Tris–HCl, pH 7.5 buffer. After 15 min at 37 °C, the reaction was stopped by adding 60 μl of 30% acetic acid solution. The enzymatic hydrolysis of the substrate was evaluated by recording the absorbance at 410 nm. Determination of the *K_i* value of the reaction between the PdKI-2 and trypsin was conducted similarly to those assays described above with increasing concentrations of purified PdKI-2 (2, 3, 4 and 5 μg) in 50 mM Tris–HCl, pH 7.5 buffer, 37 °C, followed by measurement of the residual activity using the synthetic substrate BAPNA (0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 2.0 and 2.5 mM). The velocity rate of the reaction was expressed as 1/*V* (O.D.₄₁₀/h/ml)⁻¹

and the K_i value were determined using a double-reciprocal plot of the data.

2.5.2. Papain inhibition assay

The papain inhibitory assay was determined essentially as described by Zhao et al. [25] using BANA as substrate. Ten microliters of papain (0.1 mg ml^{-1} in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0) solution were incubated for 10 min at 37 °C with 20 μl of an activation solution containing 2 mM EDTA and 3 mM DTT in pH 6.0, 100 μl of inhibitor solution and 170 μl of 25 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0. Reaction were started with the of 100 μl of 1 mM BANA solution, prepared in 1% (v/v) DMSO and 25 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0. After 20 min at 37 °C, the reaction was stopped by adding 250 μl of 2% HCl in ethanol. The color product was developed by the addition of 250 μl of 0.06% *p*-dimethylaminocinnamaldehyde in ethanol and measured by absorbance at 540 nm. Determination of the K_i value of the reaction between the PdKI-2 and papain was conducted similarly to those assays described above with increasing concentrations of purified PdKI-2 (5, 10, 20, 30 and 40 μg) in 25 mM sodium phosphate buffer, pH 6.0, 37 °C, followed by measurement of the residual activity using the synthetic substrate BANA (0.4 mM, 0.8 mM, 1.0 mM, 1.5 mM, 2.0 mM and 3.0 mM). The velocity rate of this reaction was expressed as $1/V$ ($\text{O.D.}_{540}/\text{h/ml}$) $^{-1}$ and the K_i values were determined using a double-reciprocal plot of the data.

2.5.3. Thermal and pH stability of PdKI-2

The thermal stability of PdKI-2 ($1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$) was tested by incubation of protein at different temperatures (37, 40, 60, 70, 90 and 100 °C) for 30 min. After cooling the samples at 4 °C for 10 min, the inhibitory assays against trypsin were performed. The stability in a broad range of pH was also checked. Samples of PdKI-2 ($1 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$) were prepared with 100 mM glycine–HCl (pH 2–3), 100 mM sodium phosphate (pH 6–8) and 100 mM glycine–NaOH (pH 11–12). After incubation in each buffer for 1 h at 37 °C, the samples was dialyzed against 50 mM Tris–HCl, pH 7.5 buffer and the inhibitory activity assays against trypsin were performed using BAPNA as substrate. All assays were done in triplicate. The results of each series were expressed as the mean value \pm S.D.

2.5.4. Specificity of PdKI-2 toward serine and cysteine proteinases

The ability of PdKI-2 to inhibit other serine (bovine chymotrypsin and porcine elastase) proteinases and also bromelain, a cysteine proteinase, was assayed using azocasein as substrate, as described by Xavier-Filho et al. [26].

2.6. In vitro effects of PdKI-2 towards digestive enzymes from insect pests

2.6.1. Preparation of insect gut proteinases

C. maculatus, *Z. subfasciatus* and *P. interpunctella* were supplied by the Laboratório de Química e Função de Proteínas from Departamento de Bioquímica, UFRN, Brazil. *A. argillacea* was obtained from the Centro de Pesquisa do Algodão

(CNPq/EMBRAPA), Campina Grande, Brazil, and *C. capitata* was obtained from the Laboratório de Mosca das Frutas of the Departamento de Biologia Celular e Genética, UFRN, Brazil. Insect larvae proteinases were obtained after dissection and extraction of the guts. The guts were surgically removed from the animal and placed into an iso-osmotic saline (0.15 M NaCl) solution. Gut tissue was stirred and centrifuged at $12,000 \times g$ at 40 °C for 10 min. The supernatants were then recovered and used for *in vitro* assays.

2.6.2. PdKI-2 inhibitory assay against proteinase extracts from insect pests

PdKI-2 effects on the proteolytical activity of whole gut extracts were measured by using 1% azocasein as substrate. The assays were run in 50 mM Tris–HCl, pH 7.5 buffer for *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* and *A. argillacea*, and 50 mM Tris–HCl buffer in pH 8.5, and 9.5 for *C. capitata* and *P. interpunctella*, respectively. Aliquots of 290 μl of respective buffers were incubated with 50 μl gut extracts and 20 μl of PdKI-2 at 37 °C for 15 min. Reactions were started with the addition of 500 μl of 1% azocasein solution. After 30 min at 37 °C, the reaction was stopped by adding 150 μl 20% TCA solution. The samples were centrifuged for 30 min at $12,000 \times g$ at room temperature, and the supernatants were alkalized with 200 μl 2 N NaOH solution. The residual proteolytical activity was measured by absorbance at 440 nm. All assays were done in triplicate. The results of each series were expressed as the mean value \pm S.D.

3. Results

3.1. Purification and characterization of PdKI-2

Crude soluble protein extract obtained from the mature seeds was treated with 20% TCA solution to a final concentration of 14%, centrifuged and dialyzed. The soluble protein fraction obtained showed strong inhibitory activity against trypsin and was applied to a Trypsin–Sephacryl affinity column and the retained peak was assayed against trypsin (Fig. 1A). The anti-trypsinic peak was pooled and applied to a reverse-phase high performance liquid chromatography (HPLC) column (Vydac C-18) followed by the same chromatography (Fig. 1B and C). The purity of the trypsin inhibitor from *P. dumosum* seeds (PdKI-2) was also observed by SDS–PAGE which showed that PdKI-2 had a molecular mass of 18.1 kDa (Fig. 2A). SDS–PAGE in the presence of β -mercaptoethanol reducing agent showed that PdKI-2 consisted of a single polypeptide chain. Overall, the chromatographic procedures on PdKI-2 led to a high purification of 176.4-fold with a 3.6% yield (Table 1).

3.2. Characterization of PdKI-2

3.2.1. Thermal and pH stabilities

The study of the temperature effect on PdKI-2 showed that the inhibitory activity was stable at all the temperatures tested (37–100 °C). Pre-incubation of the inhibitor in the pH range (2.0–12.0) virtually did not affect its trypsin inhibitory activity (Fig. 3A).

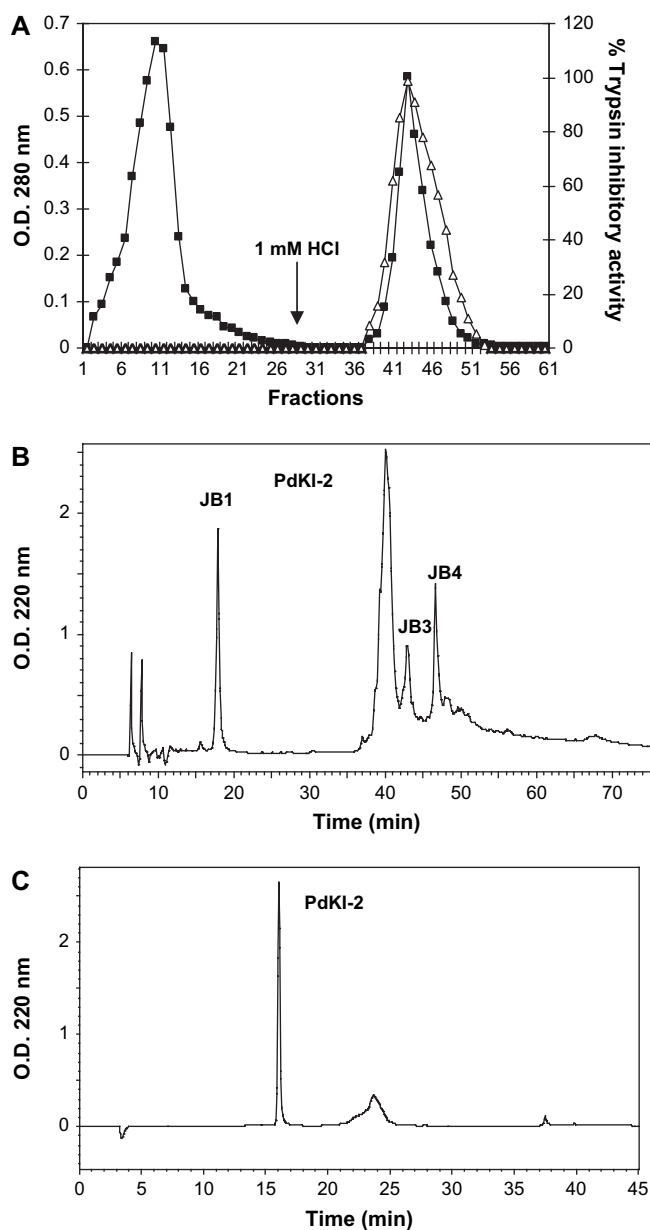


Fig. 1. (A) Elution profile on Trypsin-Sepharose column. The column (10 cm \times 1.5 cm) was equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer and the retained proteins were eluted with 1 mM HCl. Fractions of 2 ml were obtained and monitored at (■) 280 nm and (Δ) assayed against trypsin. (B) Elution profile on HPLC (Vydac C-18) column. The fractions obtained from Trypsin-Sepharose column were separated by semi-preparative reverse-phase HPLC column at a flow rate of 9 ml/min. (C) The purified protein was then again subjected to analytical reverse-phase HPLC column at a flow rate of 1 ml/min. Both were eluted using a gradient of solvent B (60% acetonitrile in 0.1% TFA) in solvent A (0.1% TFA/H₂O), and monitored at 220 nm. PdKI-2 was purified as follows: 0–5 min, 5% solvent B; 5–10 min, 55% solvent B; 10–30 min, 75% solvent B; 30–32 min, 95% solvent B; 32–42 min, 95% solvent B; 42–44 min, 5% solvent B; 44–45 min, 5% solvent, B.

3.2.2. Kinetics of inhibition of PdKI-2

In order to determine the inhibition mechanism of PdKI-2 against trypsin and papain the inhibition kinetic data was analyzed by Lineweaver–Burk double-reciprocal plots (Fig. 4A,B). The analysis showed non-competitive type kinetics of inhibition to papain and competitive to trypsin. The K_i value of PdKI-2

was 1.65×10^{-8} M against trypsin and 5.1×10^{-7} M in case of papain.

3.2.3. Specificity of PdKI-2 to serine and cysteine proteinases

PdKI-2 weakly inhibited elastase and chymotrypsin, two serine proteinases of the same class of trypsin which was strongly inhibited (97% of inhibition). Cysteine proteinases were also tested, and showed 48.82% inhibition to papain and weak inhibition to bromelain (Table 2).

3.3. In vitro effects of PdKI-2 towards digestive insect enzymes

PdKI-2 was effective against digestive proteinase from bruchids *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus*; Dipteran *Ceratitis capitata*; Lepidopterans *Plodia interpunctella* and *Alabama argillacea*, with 74.5%, 70.0%, 70.3%, 48.7%, and 13.6% inhibition, respectively (Table 3).

4. Discussion

Proteinase inhibitors have been purified and characterized from a variety of plant sources [10,11,16,27–29]. The role of these inhibitors as defensive compounds against predators was studied as early as 1947 when Mickel and Standish [30] observed that larvae of certain insects were unable to develop on soybean products. A later report showed that trypsin inhibitors were toxic to *Tribolium confusum* (flour beetle) larvae [31]. Following these studies several research groups have investigated these proteins as candidates for developing new pest control strategies.

The present study describes the purification and characterization of a second trypsin inhibitor from *P. dumosum* seeds, as well as its *in vitro* effects on digestive proteinases from insect pests. The PdKI-2 trypsin inhibitor was purified 176.4-fold with a yield of 3.6%, which was lower than for PdKI, the first trypsin inhibitor from *P. dumosum* [32]. PdKI-2 was also kinetically different of PdKI with smaller dissociation constants obtained against trypsin and papain. The PdKI-2 is a protein of molecular mass of approximately 20 kDa as observed by SDS-PAGE analysis with only one polypeptide chain in the presence of reducing agent, similar to trypsin inhibitors of the Kunitz family, which generally have molecular mass of 18–24 kDa composed by one or two polypeptide chain [22,29,33,34]. The results describing PdKI-2 as a protein composed of single polypeptide chain agree with those described for most Kunitz-type inhibitors of the subfamily Caesalpinioideae such as those purified from *Bauhinia* species [33], *Delonix regia* [35], *Peltophorum dubium* [22], *Caesalpinia echinata* [34], and *Cassia obtusifolia* [36]; subfamily Mimosaideae such as *Dimorphandra mollis* [37,38] and *Ingra laurina* [29], as well as subfamily Papilionoideae as described for *Poecilantha parviflora* [39] and *Crotalaria paulina* [40].

The inhibitory activity of PdKI-2 was not affected in the pH range tested in agreement with the results previously reported for ILTI [29], DMTI-II [41], CbTI [27], PDTI [41] and CpaTI

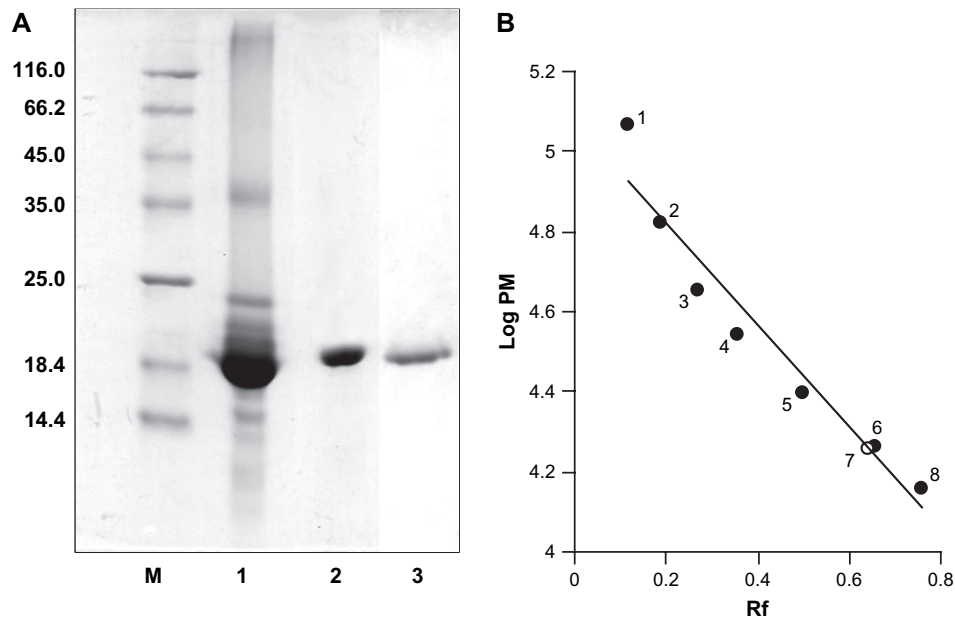


Fig. 2. (A) SDS-PAGE (15%) analyses of purified PdKI-2 from, *P. dumosum* seeds, stained with Coomassie Blue. (M) Protein molecular weight markers: β -galactosidase (116 kDa), bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), lactate dehydrogenase (35 kDa), restriction endonuclease *Bsp*981 (25 kDa), β -lactoglobulin (18.4 kDa), and lysozyme (14.4 kDa); (1) Peak retained in Trypsin-Sepharose; (2) purified PdKI-2 in HPLC; (3) PdKI-2 treated with β -mercaptoethanol. (B) Molecular weight estimation of PdKI-2 by relative mobility (Rf): 1, β -galactosidase (116 kDa); 2, bovine serum albumin (66 kDa); 3, ovalbumin (45 kDa); 4, lactate dehydrogenase (35 kDa); 5, restriction endonuclease *Bsp*981 (25 kDa); 6, PdKI-2; 7, β -lactoglobulin (18.4 kDa); 8, lysozyme (14.4 kDa).

[10]. Additionally, the broad temperature tolerance of PdKI-2 were similar to those reported for several Kunitz-type inhibitors such as ECTI [42], SCPI [43,44], PPTI [39] and AeTI [28]. These results indicate that, in its native state, PdKI-2 had high intrinsic stability due to the presence of intramolecular disulfide bridges that are presumably responsible for the functional stability of Kunitz-type inhibitors in the presence of physical and chemical denaturants such as temperature, pH and reducing agents [22,39,43]. Here, PdKI-2, belonging to the Mimosoideae subfamily, weakly inhibited other serine proteinases, such as elastase and chymotrypsin, and was active against papain, a cysteine proteinase. So far, only three related Kunitz-type inhibitors, all belonging to the Mimosoideae subfamily, were found to be active against papain-like enzymes, and were strongly active against enzymes from the midgut of bruchid larvae [10,11,21], suggesting that Kunitz-type inhibitors from both subfamilies are bifunctional inhibitors. The specificity of the Kunitz inhibitors varies among subfamilies of the Fabaceae family. Some Kunitz-type inhibitors isolated from the most primitive species of the Caesalpinioideae subfamily have activity only for trypsin [22,40] and others from the Papilionoideae or Faboideae subfamily contain

chymotrypsin inhibitors and are known as Bowman-Birk type inhibitors [1,3]. However, Kunitz-type inhibitors are also found [10,16,28].

Previous studies showed that two Kunitz inhibitors from the Mimosoideae subfamily [9,21] and one from the Papilionoideae subfamily [10] had specificities to trypsin, a digestive serine proteinase, and to papain, a digestive cysteine proteinase, both like enzymes found in gut from several phytophagous pests [10,11,16,21,45,46]. The K_i to trypsin and to papain of PdKI-2 showed similar patterns to those trypsin-papain Kunitz inhibitors, with higher K_i to trypsin than to papain [10,21]. Additional study using molecular modeling and docking experiments with PTPKI, another trypsin-papain Kunitz inhibitor, showed that the bifunctionality was due the presence of two binding sites for the enzymes and that these sites were overlapping [9]. This combination of activity against both serine and cysteine proteinases is highly attractive for development of transgenic crops expressing these inhibitors.

To effectively establish a novel insect control strategy based on PIs, two initial steps are necessary: inhibitor purification and knowledge of the digestive system of target insects. The digestive system of phytophagous pests is based mainly

Table 1
Purification steps of Kunitz inhibitor from *P. dumosum*

Steps	Total inhibitory units (IU)	Total protein (mg)	Specific activity (IU mg ⁻¹)	Purification (fold)	Yield (%)
Crude extract	118560	1041.2	113.9	1.0	100
Inhibitor fraction	80800	18.0	4488.9	39.4	68
Trypsin-Sepharose	8190	1.8	4653.4	40.9	6.9
PdKI-2	4321	0.21	20097.6	176.4	3.6

One trypsin protein inhibitor unit (1 IU) was defined as inhibitor amount that decreased the absorbance at 410 nm by 0.1 O.D. in the trypsin assay conditions.

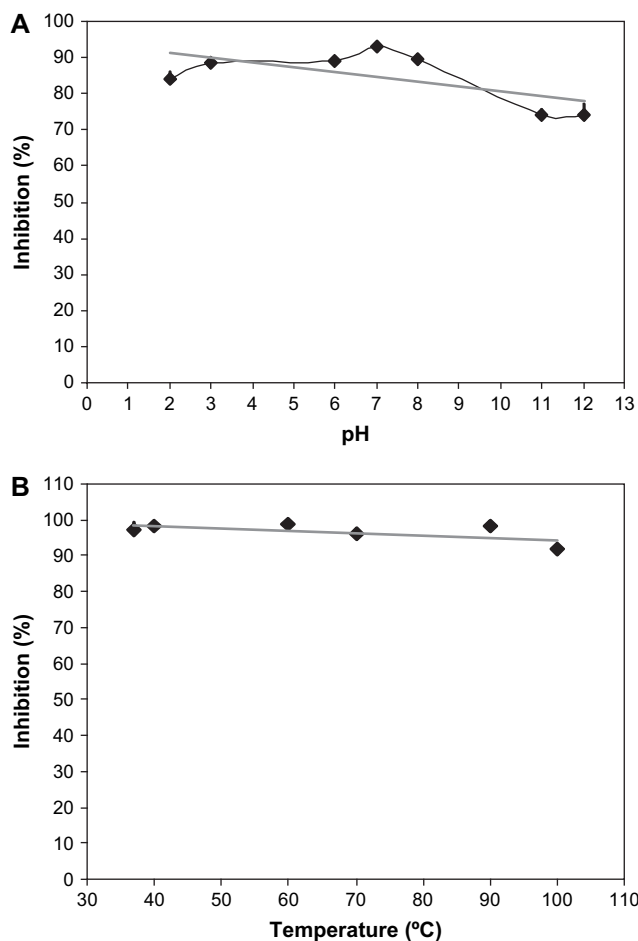


Fig. 3. Stability of PdKI-2 (A) pH stability of PdKI-2 after incubation in the indicated pH for 30 min at 37 °C; (B) temperature stability of PdKI-2 inhibitory activity after incubation for 30 min at the indicated temperature. The residual trypsin inhibitory activity was measured using BApNA as substrate in 50 mM Tris–HCl, pH 7.5. Each mean represents three replicates (\pm S.E.).

on serine and cysteine proteinase classes; serine proteinases are the major enzymes found in Lepidoptera and Diptera orders. Acid and cysteine proteinases are predominant in Coleopterans of the Bruchidae family [47–49], but serine proteinases are also present [50]. In order to verify the activity of purified PdKI-2, the digestive proteinases of Coleopteran, Lepidopteran and Dipteran pests were extracted and assayed using azocasein as substrate. PdKI-2 showed high *in vitro* inhibitory effect on *Z. subfasciatus* (74.54%), *C. maculatus* (70.04%) and *C. capitata* (70.30%). Moderate inhibitory activity was also observed for gut proteinases of *P. interpunctella* (48.67%), and low inhibitory activity against gut proteinase from *A. argillaceae* (13.58%). A number of Kunitz-related inhibitors from plants were evaluated *in vitro* for their potential of decreasing the activity of Lepidopteran/Coleopteran/Dipteran larvae digestive enzymes. The digestive enzymes from larvae of *Z. subfasciatus* and *C. capitata* were inhibited by PdKI, the first Kunitz trypsin inhibitor purified from *P. dumosum* seeds [32]. SKTI (soybean Kunitz trypsin inhibitor) showed a potent *in vitro* inhibitory activity against *A. grandis* gut proteinases [17]. SKTI and CpTI (cowpea trypsin

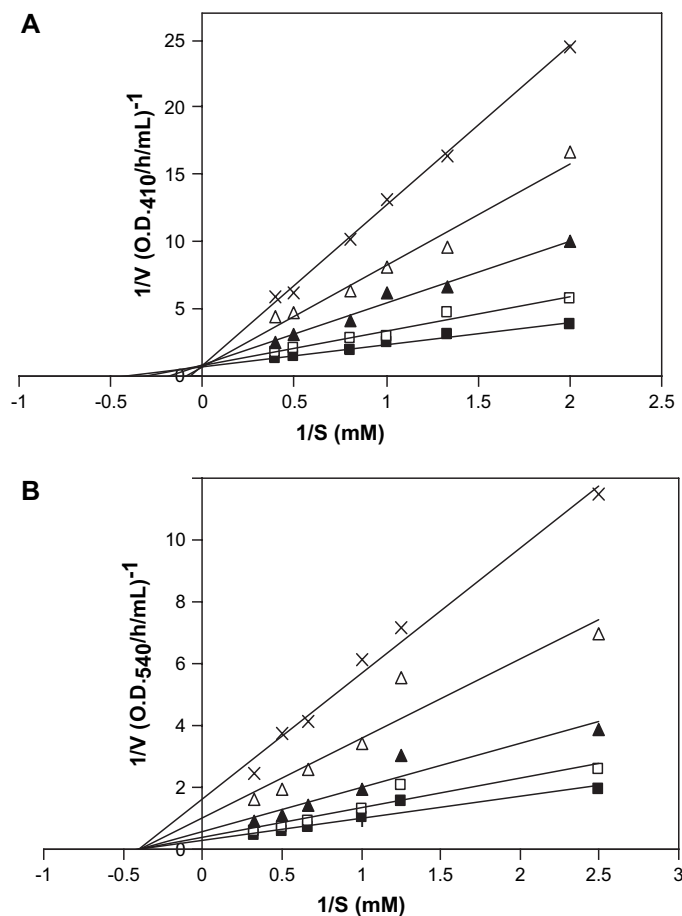


Fig. 4. (A) Inhibition of trypsin activity by PdKI-2 was competitive. Inhibition kinetic data are illustrated in Lineweaver–Burk double-reciprocal plots. PdKI-2 activity was determined using various concentrations of BApNA as substrate. ■, No inhibitor in the assay mixture; □, 2 μ g of PdKI-2; ▲, 3 μ g of PdKI-2; △, 4 μ g of PdKI-2; ×, 5 μ g of PdKI-2. The K_i value is 1.65×10^{-8} M. (B) Inhibition of papain activity by PdKI-2 was noncompetitive. Inhibition kinetic data are illustrated in Lineweaver–Burk double-reciprocal plots. PdKI-2 activity was determined using various concentrations of BANA as substrate. ■, No inhibitor in the assay mixture; □, 10 μ g of PdKI-2; ▲, 20 μ g of PdKI-2; △, 30 μ g of PdKI-2; ×, 40 μ g of PdKI-2. The K_i value is 5.1×10^{-7} M.

inhibitor) were shown to be active against tomato moth larvae (*L. oleracea*). Serine proteinases [8] acted on *H. armigera*, *H. virescens* and *L. cuprina*, in which SKTI was the most effective among the inhibitors tested [51–53]. ApTI (*Adenanthera*

Table 2
Inhibitory activity of PdKI-2 towards serine and cysteine proteinases

Enzymes ^a	Inhibition (%) ^b
Serine proteinases	
Bovine trypsin	97.08 \pm 0.34
Porcine elastase	1.26 \pm 0.8
Bovine chymotrypsin	10.20 \pm 0.51
Cysteine proteinases	
Bromelain	0.61 \pm 0.07
Papain	48.82 \pm 1.43

^a Assays against elastase, chymotrypsin and bromelain were measured using 1% azocasein as substrate, and the inhibitory activity against trypsin and papain was measured using BApNA and BANA as substrate, respectively.

^b Values are mean \pm standard error, and each mean represents three replicates.

Table 3
Inhibitory activity of PdKI-2 towards gut insect proteinases

Digestive enzymes ^a	Inhibition (%) ^b
Coleopteran	
<i>C. maculatus</i>	70.0 ± 1.10
<i>Z. subfasciatus</i>	74.5 ± 0.86
Lepidopteran	
<i>A. argillaceae</i>	13.6 ± 2.14
<i>P. interpunctella</i>	48.7 ± 0.71
Dipteran	
<i>C. capitata</i>	70.3 ± 0.07

^a Assays against insect proteinases were measured using 1% azocasein as substrate.

^b Values are mean ± standard error, and each mean represents three replicates.

pavonina trypsin inhibitor) and DMTI-II (*Dimorphandra molis* trypsin inhibitor) inhibited 84% [21] and 80% [41] of the digestive trypsin-like enzymes of *C. maculatus*, a Coleopteran (Bruchidae). Inhibitors of proteinases have been used successfully for protection of engineered plants. In many cases, transgenic plants containing genes encoding only serine proteinase inhibitors have shown enhanced resistance toward insect pests [8,12,53], but this effect is lost when insect pests develop escape mechanisms.

This work shows a trypsin–papain Kunitz inhibitor active *in vitro* toward insect pests. These results indicate that transgenic plants expressing PdKI-2 gene could probably enhance resistance against potential predators whose serine proteinase activity was inhibited and which might be unable to bypass that inhibition through expression of cysteine proteinases, and vice versa.

Acknowledgments

The authors are grateful for the grants and support provided by the following Brazilian Agencies: FINEP, CAPES, CNPq and FUNDECI-BNB.

References

- [1] M. Richardson, Seed storage proteins: the enzyme inhibitors, *Methods in Plant Biochemistry* 5 (1991) 259–305.
- [2] K.K. Ussuf, N.H. Laxmi, R. Mitra, Proteinase inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants, *Current Science* 80 (2001) 847–853.
- [3] P.K. Lawrence, K.R. Koundal, Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects, *Electronic Journal of Biotechnology* 5 (2002) 93–109.
- [4] J. Xavier-Filho, The biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 4 (1992) 1–6.
- [5] C.A. Ryan, Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens, *Annual Review of Phytopathology* 28 (1991) 425–449.
- [6] M. Solomon, B. Belenghi, M. Delledonne, E. Menachem, A. Levine, The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants, *Plant Cell* 11 (1999) 431–443.
- [7] O.L. Franco, F.R. Melo, Osmoprotectants—A plant strategy in response to osmotic stress, *Russian Journal of Plant Physiology* 47 (2000) 137–144.
- [8] A.M.R. Gatehouse, E. Norton, G.M. Davison, S.M. Babbe, C.A. Newell, J.A. Gatehouse, Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant protease inhibitors *in vitro* and *in vivo*, *Journal of Insect Physiology* 45 (1999) 545–558.
- [9] O.L. Franco, M.F.G. de Sa, M.P. Sales, L.V. Mello, A.S. Oliveira, D.J. Rigden, Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*, *Proteins Structure Function and Genetics* 49 (2002) 335–341.
- [10] C.E.M. Gomes, A.E.A.D. Barbosa, L.L.P. Macedo, J.C.M. Pitanga, F.T. Moura, A.S. Oliveira, R.M. Moura, A.F.S. Queiroz, F.P. Macedo, L.B.S. Andrade, M.S. Vidal, M.P. Sales, Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly), *Plant Physiology and Biochemistry* 43 (2005) 1095–1102.
- [11] A.S. Oliveira, R.A. Pereira, L.M. Lima, A.H.A. Morais, F.R. Melo, O.L. Franco, C. Bloch, M.F. Grossi-de-Sa, M.P. Sales, Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the algaroba tree (*Prosopis juliflora* DC), *Pesticide Biochemistry and Physiology* 72 (2002) 122–132.
- [12] R. Johnson, J. Narvaez, G.H. An, C. Ryan, Expression of proteinase inhibitor-I and inhibitor-II in transgenic tobacco plants—effects on natural defense against *Manduca-Sexta* larvae, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (1989) 9871–9875.
- [13] R.M. Broadway, S.S. Duffey, Plant proteinase inhibitor: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exiqua*, *Journal of Insect Physiology* 32 (1986) 827–833.
- [14] K.W. Yeh, M.I. Lin, S.J. Tuan, Y.M. Chen, C.Y. Lin, S.S. Kao, Sweet potato (*Ipomoea batatas*) trypsin inhibitors expressed in transgenic tobacco plants confer resistance against *Spodoptera litura*, *Plant Cell Reports* 16 (1997) 696–699.
- [15] B.J. Reed, D.S. Chandler, R.M. Sandeman, Aminopeptidases as potential targets for the control of the Australian sheep blowfly, *Lucilia cuprina*, *International Journal for Parasitology* 29 (1999) 839–850.
- [16] C.L. Araujo, I.W.L. Bezerra, A.S. Oliveira, F.T. Moura, L.L.P. Macedo, C.E.M. Gomes, A.E.A.D. Barbosa, F.P. Macedo, T.M.S. Souza, O.L. Franco, J.C. Bloch, M.P. Sales, *In vivo* bioinsecticidal activity toward *Ceratitis capitata* (Fruit fly) and *Callosobruchus maculatus* (Cowpea weevil) and *in vitro* bioinsecticidal activity toward different orders of insect pests of a trypsin inhibitor purified from tamarind tree (*Tamarindus indica*) seeds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005) 4381–4387.
- [17] O.L. Franco, S.C. Dias, C.P. Magalhaes, A.C.S. Monteiro, C. Bloch, F.R. Melo, O.B. Oliveira-Neto, R.G. Monnerat, M.F. Grossi-de-Sa, Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*), *Phytochemistry* 65 (2004) 81–89.
- [18] J.C. Leple, M. Bonadebottino, S. Augustin, G. Pilate, V.D. Letan, A. Delplanque, D. Cornu, L. Jouanin, Toxicity to *Chrysomela tremulae* (Coleoptera, Chrysomelidae) of transgenic poplars expressing a cysteine proteinase-inhibitor, *Molecular Breeding* 1 (1995) 319–328.
- [19] J.P. Purcell, J.T. Greenplate, R.D. Sammons, Examination of midgut luminal proteinase activities in 6 economically important insects, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 22 (1992) 41–47.
- [20] O.L. Franco, R.C. dos Santos, J.A.N. Batista, A.C.M. Mendes, M.A.M. de Araujo, R.G. Monnerat, M.F. Grossi-de-Sa, S.M. de Freitas, Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*, *Phytochemistry* 63 (2003) 343–349.
- [21] M.L.R. Macedo, C.M. De Sa, M.D.M. Freire, J.R.P. Parra, A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina*, L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004) 2533–2540.
- [22] M.L.R. Macedo, M.D.M. Freire, E.C. Cabrini, M.H. Toyama, J.C. Novello, S. Marangoni, A trypsin inhibitor from *Peltophorum dubium* seeds active against pest proteases and its effect on the survival of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), *Biochimica Et Biophysica Acta General Subjects* 1621 (2003) 170–182.

- [23] M.M. Bradford, Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72 (1976) 248–254.
- [24] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [25] Y. Zhao, M.A. Botella, L. Subramanian, X.M. Niu, S.S. Nielsen, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa, Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog, *Plant Physiology* 111 (1996) 1299–1306.
- [26] J. Xavier-Filho, F.A.P. Campos, M.B. Ary, C.P. Silva, M.M.M. Carvalho, M.L.R. Macedo, F.J.A. Lemos, G. Grant, Poor correlation between the levels of proteinase-inhibitors found in seeds of different cultivars of cowpea (*Vigna unguiculata*) and the resistance susceptibility to predation by *Callosobruchus maculatus*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 37 (1989) 1139–1143.
- [27] A. Bhattacharyya, S. Rai, C.R. Babu, A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Caesalpinia bonduc* seeds: Isolation, partial characterization and insecticidal properties, *Plant Physiology and Biochemistry* 45 (2007) 169–177.
- [28] A. Bhattacharyya, S. Mazumdar, S.M. Leighton, C.R. Babu, A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: purification, characterization, and kinetic properties, *Phytochemistry* 67 (2006) 232–241.
- [29] M.L. Macedo, V.A. Garcia, M.G. Freire, M. Richardson, Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd, *Phytochemistry* 68 (2007) 1104–1111.
- [30] C.E. Mickel, J. Standish, Susceptibility of processed soy flour and soy grits in storage to attack by *Tribolium castaneum*, University of Minnesota Agricultural Experimental Station Technical Bulletin (1947) 1–20.
- [31] H. Lipke, G.S. Fraenkel, I.E. Liener, Growth inhibitors—Effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2 (1954) 410–414.
- [32] A.S. Oliveira, L. Miglioli, R.O. Aquino, J.K.C. Ribeiro, L.L.P. Macedo, L.B.S. Andrade, M.P. Bemquerer, E.A. Santos, S. Kiyota, M.P. Sales, Purification and amino acid sequences analysis of one Kunitz-type proteinase inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards insect pests, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007) 7342–7349.
- [33] C. de Oliveira, L.A. Santana, A.K. Carmona, M.H. Cezari, M.U. Sampaio, C.A. Sampaio, M.L. Oliva, Structure of cruzipain/cruzain inhibitors isolated from *Bauhinia bauhinioides* seeds, *Biological Chemistry* 382 (2001) 847–852.
- [34] I. Cruz-Silva, A.J. Gozzo, V.A. Nunes, A.K. Carmona, A. Faljoni-Alario, M.L.V. Oliva, M.U. Sampaio, C.A.M. Sampaio, M.S. Araujo, A proteinase inhibitor from *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) seeds for plasma kallikrein, plasmin and factor XIIa, *Biological Chemistry* 385 (2004) 1083–1086.
- [35] S.C. Pando, M.L.V. Oliva, C.A.M. Sampaio, L. Di Ciero, J.C. Novello, S. Marangoni, Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds, *Phytochemistry* 57 (2001) 625–631.
- [36] H. Liao, W. Ren, Z. Kang, J.H. Jiang, X.J. Zhao, L.F. Du, A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*, *Biotechnology Letters* 29 (2007) 653–658.
- [37] M.L.R. Macedo, D.G.G. de Matos, O.L.T. Machado, S. Marangoni, J.C. Novello, Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties, *Phytochemistry* 54 (2000) 553–558.
- [38] G.C. Mello, M.L.V. Oliva, J.T. Sumikawa, O.L.T. Machado, S. Marangoni, J.C. Novello, M.L.R. Macedo, Purification and characterization of a new trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds, *Journal of Protein Chemistry* 20 (2001) 625–632.
- [39] V.A. Garcia, M.G. Freire, J.C. Novello, S. Marangoni, M.L. Macedo, Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: purification, characterization, and activity against pest proteases, *The Protein Journal* 23 (2004) 343–350.
- [40] L.A. Pando, L. Di Ciero, J.C. Novello, B. Oliveira, J.K.P. Weder, S. Marangoni, Isolation and characterization of a new trypsin inhibitor from *Crotalaria paulina* seeds, *IUBMB Life* 48 (1999) 519–523.
- [41] M.L.R. Macedo, G.C. Mello, M.D.G.M. Freire, J.C. Novello, S. Marangoni, D.G.G. de Matos, Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*, *Plant Physiology and Biochemistry* 40 (2002) 891–898.
- [42] I.F.C. Batista, M.L.V. Oliva, M.S. Araujo, M.U. Sampaio, M. Richardson, H. Fritz, C.A.M. Sampaio, Primary structure of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Enterolobium contortisiliquum* seeds, *Phytochemistry* 41 (1996) 1017–1022.
- [43] E.M.T. Souza, R.C.L. Teles, E.M.A. Siqueira, S.M. Freitas, Effects of denaturing and stabilizing agents on the inhibitory activity and conformational stability of *Schizolobium parahyba* chymotrypsin inhibitor, *Journal of Protein Chemistry* 19 (2000) 507–513.
- [44] R.C.L. Teles, E.M.T. De Souza, L.D. Calderon, S.M. de Freitas, Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds, *Phytochemistry* 65 (2004) 793–799.
- [45] A. Ishikawa, S. Ohta, K. Matsuoka, T. Hattori, K. Nakamura, A family of potato genes that encode Kunitz-type proteinase-inhibitors—structural comparisons and differential expression, *Plant and Cell Physiology* 35 (1994) 303–312.
- [46] B. Strukelj, J. Pungercar, P. Mesko, D. Barlicmaganja, F. Gubensek, I. Kregar, V. Turk, Characterization of aspartic proteinase-inhibitors from potato at the gene, cDNA and protein-levels, *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 373 (1992) 477–482.
- [47] F.J.A. Lemos, F.A.P. Campos, C.P. Silva, J. Xavier-Filho, Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds, *Entomologia Experimentalis Et Applicata* 56 (1990) 219–227.
- [48] C.P. Silva, J. Xavier-Filho, Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh) (Coleoptera, Bruchidae), *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry & Molecular Biology* 99 (1991) 529–533.
- [49] H. Koiwa, R.E. Shade, K. Zhu-Salzman, M.P. D'Urzo, L.L. Murdock, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa, A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin L-like digestive cysteine proteinases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*), *FEBS Letters* 471 (2000) 67–70.
- [50] C.P. Silva, W.R. Terra, R.M. Lima, Differences in midgut serine proteinases from larvae of the bruchid beetles *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus*, *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 47 (2001) 18–28.
- [51] R.E. Casu, J.M. Jarmey, C.M. Elvin, C.H. Eisemann, Isolation of a trypsin-like serine protease gene family from the sheep blowfly *Lucilia cuprina*, *Insect Molecular Biology* 3 (1994) 159–170.
- [52] C. Ferreira, A.N. Capella, R. Sitnik, W.R. Terra, Properties of the digestive enzymes and the permeability of the peritrophic membrane of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Physiology* 107 (1994) 631–640.
- [53] F. De Leo, M. Bonade-Bottino, L.R. Ceci, R. Gallerani, L. Jouanin, Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests, *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31 (2001) 593–602.