

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

AVALIAÇÃO *in vitro* DA FRAÇÃO RICA EM INIBIDORES
DE PROTEASE SERINICAS DE *Maranta arundinacea* L.
CONTRA *Spodoptera frugiperda*

Autor: Guilherme Augusto Abrantes Sousa

Orientador: Ludovico Migliolo

CAMPO GRANDE – Mato Grosso do Sul

Março - 2017

Guilherme Augusto Abrantes Sousa

AVALIAÇÃO *in vitro* DA FRAÇÃO RICA EM INIBIDORES
DE PROTEASE SERINICAS DE *Maranta arundinacea* L.
CONTRA *Spodoptera frugiperda*

**“Dissertação apresentada como parte
das exigências para obtenção do título
de MESTRE EM BIOTECNOLOGIA, no
Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia da Universidade Católica
Dom Bosco – Área de Concentração:
Biotecnologia Aplicada à Agropecuária”**

Orientador: Dr. Ludovico Migliolo

CAMPO GRANDE – Mato Grosso do Sul

Março – 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB, Campo Grande, MS, Brasil)

S729a Sousa, Guilherme Augusto Abrantes

Avaliação *In vitro* da fração rica em inibidores de protease
serínicas de *Maranta arundinacea* L. contra *Spodoptera frugiperda* /
Guilherme Augusto Abrantes Sousa; orientador Ludovico Migliolo;
coorientadora Carina Elisei de Oliveira . -- 2017.

83 f. + anexos

Dissertação (mestrado em biotecnologia) – Universidade Católica
Dom Bosco, Campo Grande, 2017.

Inclui bibliografia

1. Milho – Doenças e pragas 2. *Spodoptera frugiperda* – Controle
3. Pragas agrícolas 4. Biotecnologia I. Migliolo, Ludovico II. Oliveira,
Carina Elisei de III. Título

CDD – 633.159

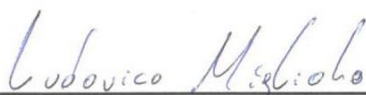
**Avaliação *in vitro* da Fração Rica em Inibidores de Protease Serínicas
de *Maranta arundinacea* L. contra *Spodoptera frugiperda***

Autor: Guilherme Augusto Abrantes Sousa

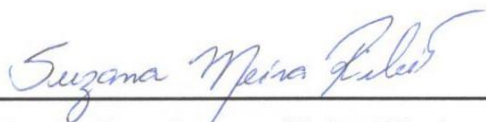
Orientador: Prof. Dr. Ludovico Migliolo

TITULAÇÃO: Mestre em Biotecnologia
Área de concentração: Biotecnologia.

APROVADO em 17 de março de 2017.



Prof. Dr. Ludovico Migliolo - UCDB
(orientador)



Profa. Dra. Suzana Meira Ribeiro - UCDB



Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho - UCB

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, Marizete e Romar
Que mesmo sem entenderem bem o que eu fazia
Estiveram sempre presentes.
Dedico

AGRADECIMENTOS

À UCDB e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de Mestrado;

Aos meus pais, por todo incentivo e apoio na realização desta dissertação;

Ao meu orientador, prof. Dr. Ludovico Migliolo, por todas as oportunidades concedidas, ensinamentos, paciência, respeito, amizade e pelas críticas construtivas que contribuíram para o meu crescimento pessoal, acima de tudo, profissional. Sou muito grato a tudo que me foi proporcionado ao longo desses 2 anos, porque hoje eu olho pra trás, e vejo o quanto aprendi no decorrer dessa caminhada;

À minha co-orientadora, profa. Dra. Carina Elisei, por toda ajuda e ensinamentos ao longo da realização deste trabalho;

À Dra. Simone Maria Neto, por contribuir com material tão importante para a realização desse trabalho;

À toda a equipe do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (S-INOVA), pelo apoio, amizade e convivência;

Ao estudante de iniciação científica, Wellington Coelho, que pelo curto período em que participou dos experimentos no final dessa dissertação, apresentou incrível conhecimento e maestria com os ensaios de bancada realizados;

À estudante de iniciação científica Regina Meneses, pelas conversas, parceria e amizade todas as tardes;

À toda equipe do laboratório S-INOVA Biotech UCDB;

Aos colegas de turma de Ciências Biológicas da turma de 2014 UCDB, que ingressaram comigo no mestrado e passaram pelo mesmo caminho, pela convivência, carinho e pelos momentos de confraternização;

À secretária Silvia Cruz, pela dedicação e ajuda nas questões administrativas/burocráticas;

À banca examinadora, prof. Dr. Márcio de Castro Silva Filho e profa. Dra. Suzana Meira, pelas correções e contribuições teóricas;

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho: Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Guilherme Augusto Abrantes Sousa é natural do município de Sidrolândia, Mato Grosso do Sul, sendo filho caçula de Romar Guedes de Souza e Marizete Aparecida Abrantes de Sousa. Nascido em 27 de Maio de 1992, iniciou os estudos na escola primária aos 4 anos de idade e ingressou no ensino fundamental aos 6 anos. Aos 17 anos de idade completou o ensino médio e ingressou no curso de Ciências Biológicas Bacharelado na instituição de ensino Superior UCDB aos 19 anos. Concluiu o curso em 2014, e, ao decorrer dos 4 anos de graduação em biologia, desenvolveu diversas atividades em seus estágios, cujo qual lhe rendeu, ainda em seu ano de formação (2014) o prêmio de 1º colocado em pesquisa na área de Ciências Agrárias da Universidade Católica Dom Bosco.

SUMÁRIO

	Página
1. Introdução	21
2. Revisão Bibliográfica.....	24
2.1 Aspectos Básicos sobre a Produção Agrícola de Mato Grosso do Sul e a Lagarta <i>Spodoptera frugiperda</i> (J.E. Smith, 1797).....	24
2.2 Enzimas em Invertebrados	26
2.3 Famílias de Enzimas.....	27
2.3.1 Protease Aspártica (PA).....	28
2.3.2 Cisteino Proteases (CP).....	30
2.3.3 Protease Glutâmica (GP)	31
2.3.4 Metallo Proteases (MP)	31
2.3.5 Treonino Proteases (TP).....	33
2.3.6 Serino Proteases (SP)	34
2.4.1 Família de Inibidores Tipo-Kunitz.....	40
2.4.2 Família de Inibidores Bowman-Birk.....	41
2.6 Interação Enzima/Inibidor	44
2.7 Inibidores de Proteases como Linha de Defesa em Plantas.....	44
2.8 Inibidores em Tubérculos, raízes tuberosas e caules subterrâneos	46
3. Objetivos	48
3.1. Objetivo Geral	48
3.2. Objetivos Específicos.....	48
4. Material e Métodos.....	49
4.1. Preparo das amostras e obtenção do Extrato Bruto (EB)	49

4.2. Fracionamento em Sulfato de Amônio, Diálise e Liofilização.....	49
4.3. Determinação da Concentração Protéica por método de Bradford.....	50
4.4. Análise do Perfil Proteico por Eletroforese em SDS-PAGE	50
4.5. Análise do Perfil Proteico por Espectrometria de Massa - MALDI/ToF..	51
4.6. Determinação da Atividade Antitriptica	52
4.6.1. Substrato Azocaseína	52
4.6.2. Substrato BAPNA	52
4.6.3. Determinação da Porcentagem de Inibição enzimática	53
4.6.4. Determinação do IC ₅₀	53
4.7. Ensaio Hemolítico	54
4.8. Cromatografia de Afinidade Trypsin-Sepharose CNBr 4B	54
4.9. Ensaio de Estabilidade Térmica.....	55
4.10. Homogenato do trato digestivo de <i>Spodoptera frugiperda</i>	55
4.10.1. Ensaio de Inibição do Homogenato Intestinal de <i>S. frugiperda</i>	56
5. Resultados	57
6. Discussão	69
7. Conclusões	75
8. Referências.....	76

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 01: À esquerda, parte área de uma planta jovem de *M. arundinacea* apresentando sua folhagem específica, alongada e em formato de lança; À direita, rizomas (caule subterrâneo da planta) descascados e lavados, com sua coloração específica esbranquiçado e seu formato fusiforme..... 22

Figura 02: Danos causados ao limbo foliar do milho por *S. frugiperda*, em seus respectivos instares, onde, em A, há a raspagem apenas de um dos lados da folha; já em B, a largarta, após seu desenvolvimento, passa a consumir todo o limbo foliar. 25

Figura 03: Anatomia das porções intestinais de *S. frugiperda*. Em 1: boca; 2: divertículo; 3: proventrículo; 4: saco gástrico; 5: espaço endo-peritrófico; 6: membrana peritrófica; 7: túbulos de malpighi; 8: íleo; 9: reto e 10: ânus. 27

Figura 04: Representação do sítio catalítico da enzima pepsina (PDB 1IBQ). Ao todo, sete resíduos de aminoácidos estão envolvidos diretamente com o mecanismo de catálise (Asp³²; Thr³³; Gly³⁴; Ser³⁵; Asp²¹⁴; Thr²¹⁵ e Gly²¹⁶), onde os resíduos de ácido aspártico realizam a função de ataque nucleofílico. Em vermelho (oxigênio), em azul (nitrogênio) e branco (carbonos) 29

Figura 05: Estrutura 3D da enzima Papaína (PDB 9PAP) representante da família das cisteíno peptidases, com destaque para o sítio ativo, onde são apresentados os resíduos dos aminoácidos envolvidos com a atividade catalítica da enzima. Em vermelho (oxigênio), em azul (nitrogênio) e branco (carbonos). 30

Figura 06: Sítio catalítico da protease glutâmica Nl α (PDB 1Q31). Os resíduos de Gln²⁴², His⁴⁶ e Asp⁸¹, desempenham a função catalítica e os resíduos Ala¹⁵¹; Tyr²⁴⁰; Ser²⁴¹ auxiliam o processo. 31

- Figura 07:** Estrutura do sítio catalítico de ADAMTS-5 (PDB 3LJT) onde estão localizados os aminoácidos componentes do mecanismo de catálise da enzima (Ile⁴⁴⁶; Arg⁴²⁷, Hist⁴¹⁰; His⁴⁰³, Leu⁴⁰²). Em verde está representado a interação do sítio catalítico com estrutura da molécula denominada “composto 12”, um inibidor do sítio catalítico das metaloproteases. 32
- Figura 08:** Sítio catalítico da enzima Taspase 1 (PDB 2A8I). Ao centro, está localizado o resíduo catalítico da enzima (Thr²³⁴), juntamente ao entorno com os outros resíduos componentes da maquinaria catalítica (Gly⁵¹; Tyr⁵²; Lys⁵⁷; Tyr⁶¹; Phe⁹⁸; Asn¹⁰⁰, Asn¹⁰⁶; Ser²⁵²; Gly²⁵⁴; Leu²⁵⁵ e Gly²⁹²). 33
- Figura 09:** Estrutura 3D da enzima tripsina bovina (PDB 5FXL) com destaque para sítio catalítico (em amarelo), onde estão localizados os aminoácidos que compõe a tríade catalítica dessa enzima (Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ e Asp¹⁰²), local onde ocorre a clivagem do substrato. 36
- Figura 10:** Estrutura tridimensional de um inibidor tipo Kunitz extraído de soja (*Glycine max*, PDB 1AVU). As cadeias representadas em amarelo e cinza indicam as ligações dissulfeto (Cys³⁹ e Cys⁸⁶; Cys¹³⁶ e Cys¹⁴⁵) e as cadeias em verde indicam o sítio (ou *loop*; Arg⁶³ e Ile⁶⁴) reativo do inibidor. 41
- Figura 11:** Estrutura tridimensional do inibidor de proteases serínicas da família Bowman-Birk (*Lens culinaris*, PDB 2AIH). Em cinza está localizado o sítio ativo de ligação para Tripsina (Arg¹⁶), e em preto, o sítio ativo de ligação para Quimotripsina (Tyr⁴²). As ligações dissulfeto estão representadas em amarelo (Cys⁸-Cys⁶¹; Cys⁹-Cys²⁴; Cys¹²-Cys⁵⁷; Cys¹⁴-Cys²²; Cys³¹-Cys³⁸; Cys³⁵-Cys⁵⁰ Cys⁴⁰-Cys⁴⁸. Em azul está representada a estrutura tridimensional do inibidor. 43
- Figura 12:** Esquema dos mecanismos de defesa constituídos e induzidos presentes em plantas. 46
- Figura 13:** Esquema de retirada do intestino de *S. frugiperda* para obtenção das enzimas intestinais através do homogenato. A: lagartas de 5º instar acomodadas em placa de petri e anestesiadas em banho de gelo ($\pm 0,2$ °C); B: excisão lateral do tegumento afim de expor a porção do trato intestinal; C: exposição total do intestino de *S. frugiperda* e D: retirada da porção intestinal e posterior armazenamento em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 \pm 4,0 °C. 56

Figura 14: Análise eletroforética em SDS-PAGE apresentando o perfil proteico total de MM= Marcador Molecular; EB= Extrato Bruto rizoma *M. arundinacea* L. F2: precipitação por sulfato de amônio das amostras extraídas dos rizomas de *M. arundinacea* em tampão Tris-HCl 50mM pH 7.5 na proporção de saturação de 30-60%. 58

Figura 15: Porcentagem de inibição da atividade triptica frente ao EB obtido dos rizomas de *M. arundinacea* L. em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Foram utilizados para o teste os substratos BApNA 1,25 mM (Colunas em preto) e Azocaseína 1% (colunas em cinza). Foi utilizado o inibidor específico da atividade triptica (PMSF) como padrão de inibição, com concentração de enzima constante para ambos os testes (0,15 mg.mL⁻¹). Foram testadas sete concentrações exponencialmente crescentes do EB.

..... 59

Figura 16: Porcentagem da atividade inibitória da enzima tripsina (0,15 mg.mL⁻¹) utilizando os substratos azocaseína 1% (colunas em cinza) e BApNA 1,25 mM (colunas em preto). Foi utilizado o inibidor específico da atividade triptica (PMSF) como padrão de inibição, e seis concentrações diferentes da fração F2, obtida com a utilização de (NH₄)₂SO₄. O EB de *M. arundinacea* L foi diluído à uma concentração 300 µg.mL⁻¹ para trabalho..... 60

Figura 17: Porcentagem da atividade inibitória da enzima tripsina (0,15 mg.mL⁻¹) com adição de seis concentrações de cada uma das frações F1 (colunas em cinza) e F3 (colunas em preto) utilizando o substrato azocaseína (1%). 61

Figura 18: Perfil das massas moleculares da fração F2 por sistema MALD-ToF utilizando matriz Super-DHB. 62

Figura 19: Perfil cromatográfico da F2 extraído dos rizomas de *M. arundinacea*, material retido por cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose 4B. A solução de eluição utilizada foi HCl à uma concentração de 50 mM à uma taxa de fluxo de 50 mL.h⁻¹..... 63

Figura 20: Eletroforese em SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue* (em A) e revelado com nitrato de prata (em B) do extrato dos rizomas de *M. arundinacea* isolados por cromatografia de afinidade em resina Sepharose 4B acoplada com tripsina. Análise das frações retida (FR) e não-retida (FNR)

em comparação com o padrão de massas moleculares (MM) para obtenção da massa equivalente da fração inibidora contida no extrato..... 64

Figura 21: Porcentagem de inibição da enzima tripsina em substrato específico (BApNA) frente a oito concentrações crescentes do inibidor extraído dos rizomas de *M. arundinacea*. 65

Figura 22: Ensaio de variação da termoestabilidade da FR frente a um gradiente de variação de 14 temperaturas utilizadas para o experimento. O gradiente de temperatura variou a cada 5 °C com temperatura de partida de 30 °C e a concentração da amostra utilizada em todos os ensaios foi de 0,7 µg.mL⁻¹ da FR obtida por cromatografia de afinidade. 66

Figura 23: Atividade hemolítica da FR com variação crescente de 7 concentrações utilizadas para o ensaio. Foi utilizado como controle positivo Triton x-100 a uma concentração de 2%, e para o controle negativo a solução PBS. 67

Figura 24: Curva de atividade obtida do homogenato intestinal de *S. frugiperda* com a utilização do substrato específico BApNA. Foram utilizadas 4 concentrações para construção da curva de atividade com absorbância dos produtos formadas através da reação monitorados em espectrofotômetro a 410 nm. 68

Figura 25: Curva de inibição de FR frente as enzimas obtidas do homogenato intestinal de *S. frugiperda*. Foi utilizado para o ensaio uma concentração do homogenato de 0,15 µg.mL⁻¹ com variação 4 concentrações de FR para construção da curva. A atividade relativa da enzima foi mensurada em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 410 nm e a atividade inibitória foi calculada a partir de um padrão de atividade do homogenato intestinal. 69

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 01: Classificação atual das serino proteases. (Fonte: <http://merops.sanger.ac.uk/>) (IUBMB: http://www.enzyme-database.org/class.php?c=3&sc=4&ssc=*&sh=21) 37

Tabela 02: Principais Famílias de Inibidores de Proteases encontradas em Plantas. 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Eletrophoresis;

PDB – Protein Data Bank;

BPTI – Bovine Pancreatc Trypsin Inhibitor;

STI – Soybean Trypsin Inhibitor;

BBI – Bowman-Birk Inhibitor;

BApNA – $N\alpha$ -Benzoil-L-Arginine-4-nitroanilide hydrochloride;

NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*;

PBS – Phosphate Buffer Saline;

APS – Ammonium Persulfate;

E.B. – Extrato Bruto;

E.C. – Enzyme Comission;

PMSF – Phenylmethysulfonyl fluoride;

DNS – Dinitrosalicylic Acid;

TFA – Ácido trifluoroacético;

TCA – Ácido tricloroacético;

Super-DHB – 2, 5-dihydroxybenzoic acid;

BSA – Albumina sérica bovina;

TEMED – N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamino;

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio;

EDPG – Extracellular dermal glycoprotein;

FR – Fração rica em inibidores;

RCL – Reactive Centre Loop;

MLL – The human mixed lineage leukemia;

RESUMO

Mato Grosso do Sul se destaca no cenário nacional por sua produção agrícola, principalmente de milho. Essas altas taxas de produção estão relacionadas ao melhoramento genético de cultivares, correções de solo e ao manejo integrado de pragas. Dentre os principais insetos-praga que atacam a cultura do milho, destaca-se a lagarta *Spodoptera frugiperda*. Os métodos de controle estudados para eliminação desse inseto são diversos, como rotação de culturas, aplicação de inseticidas, expressão heteróloga de toxinas, além dos estudos com inibidores de protease encontrados em plantas. *Maranta arundinacea* L., popularmente conhecida como araruta, é uma planta originária da América do Sul. A araruta tem como principal fonte comercial o amido, que fica armazenado em seus rizomas. Nos órgãos de armazenamento proteínas de defesa, como os inibidores enzimáticos, são importantes na invasão por patógenos. Os inibidores de protease interagem com enzimas formando complexos que bloqueiam a atividade catalítica. De acordo com isto, o objetivo deste trabalho foi isolar e avaliar a fração rica de *M. arundinacea* L. com atividade *in vitro* frente a proteinases serínicas de *Spodoptera frugiperda*. Para a extração de proteínas totais de *M. arundinacea* L, rizomas frescos foram maceradas em processador com a adição de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 na proporção de 1:10 (m:v) e após agitação suave *overnight* a 130 rpm, a amostra foi centrifugada a 10000 rpm durante 10 min a 4 °C, o sobrenadante foi denominado extrato bruto (EB) e precipitado com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (F₀₋₃₀; F₃₀₋₆₀ e F₆₀₋₁₀₀). A quantificação foi realizado pelo método de Bradford. O EB, as frações e a fração rica em inibidores foram analisadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% e corados com *Coomassie Blue*. Além disso, todas as amostras foram avaliadas *in vitro* quanto a atividade inibitória frente a tripsina utilizando como substrato BApNA 1,25 mM. A fração F2 foi monitorada para identificação da massa molecular por SDS-PAGE e espectrometria de massa. As massas moleculares encontradas foram correspondente à 25 e 11 kDa em eletroforese, e de 23722,2 e 11734,6 Da para espectrometria de massa. As frações F1 e F3 não apresentaram valores significativos de atividades inibitórias e foram descartadas. A atividade antitriptica para EB, F2 e FR foram de 100% nas concentrações de 1,5, 0,75 e 0,65 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para BApNA. Para o ensaio de termoestabilidade, a FR apresentou 100% de atividade em todas as variações de temperatura, e taxa de hemólise nos ensaios utilizando eritrócitos menor que 7% para todas as concentrações utilizadas, e IC₅₀ de 0,3 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. A FR apresentou porcentagem de inibição de 100% nos ensaios com o

homogenato intestinal de *S. frugiperda*, na concentração de 0,025 µg.mL⁻¹ testada. De acordo com os resultados obtidos a FR é um interessante produto da araruta com potencial biotecnológico no controle e manejo integrado de pragas inibindo serino proteinase em baixas concentrações.

Palavras-chave: Inibidores, Enzimas, Sítio Catalítico, Mecanismo de Inibição, Controle

ABSTRACT

Mato Grosso do Sul is a great agricultural production in the national scenario, mainly corn. These high production rates are related to genetic improvement of cultivars, soil corrections and integrated pest management. Among the main insect pests that attack the corn crop, we highlight the caterpillar *Spodoptera frugiperda*. The control methods studied for elimination of this insect are diverse, rotation of culture, insecticides, heterologues expression of toxins, in addition proteinase inhibitors found in plants. *Maranta arundinacea* L., popularly known as araruta, is a South America native plant. Araruta has as main commercial source the starch, which is stored in rhizomes. In storage organs defense proteins, such as enzyme inhibitors, are important in invasion by pathogens. Proteinase inhibitors interact with enzymes forming complexes that block catalytic activity. In this context, the objective of this work was to isolate and evaluate the inhibitor rich fraction of *M. arundinacea* L. forward *in vitro* activity against *Spodoptera frugiperda* serine protease. For extraction of total protein from *M. arundinacea* L, the fresh rhizomes were macerated in processor with addition of 50 mM Tris-HCl pH 7.5 buffer 1:10 (m:v) and after soft stirring overnight at 130 rpm the sample was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C, the supernatant was called crude extract (EB) and precipitated with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (F₀₋₃₀; F₃₀₋₆₀ e F₆₀₋₁₀₀). After quantification by Bradford method, the crude extract, the fractions and the fraction rich in inhibitors were monitored by polyacrylamide gel SDS-PAGE 12% and stained with *Coomassie Bright Blue*. Furthermore all samples were analyzed by *in vitro* trypsin inhibitor assay using as substrate BapNA 1,25 mM. The fraction F2 was analyzed by mass spectrometry to identify the molecular mass. For analysis by SDS-PAGE two molecular mass were found with 11 and 25 kDa and ion 23722.2 and 11734.6 Da using Super-DHB as matrix. The results showed that the fractions F1 and F3 no presented significant inhibition values in the experiments and were discarded. In contrast, the antitriptic activity for EB, F2 and FR were of 100% using BApNA, respectively in the concentrations of 1.5 and 0.75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ and 0.65 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ used in the test. For the thermostability assay, the FR presented 100% activity at all temperature variations, and hemolysis rate in the assays using erythrocytes less that 7% for all concentrations used, and IC₅₀ of 0.3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. The FR presented percentage of inhibition of 100% in the tests with the intestinal homogenato of *S. frugiperda*, from the concentration of 0.025 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ tested. in conclusion the results observed demonstrated that the FR is a

interesting product from araruta with biotechnological potential in control and integrated management of pathogens inhibiting serine proteinase in low concentration.

Key-words: Inhibitors, Enzymes, Catalict site, Mechanism of inhibition, Control.

1. INTRODUÇÃO

A araruta (*Maranta arundinacea* L.) é uma planta da família das Marantaceas (Pereira et al. 1999), que tem seu centro de origem no continente sul-americano. É uma planta pertencente à ordem Zingiberales, estando dentro de uma família de plantas que têm sido amplamente utilizadas na medicina tradicional, assim como outras da ordem, como condimentos aromatizantes e agentes de especiarias (*Curcuma* spp. *Zingiber* spp.).

A araruta é encontrada na forma nativa nas florestas tropicais venezuelanas, ocorrendo especificamente em quase toda a região costeira da América do Sul, o que leva a maior parte dos pesquisadores a discutirem que seu ponto de origem esteja estabelecido na América do Sul ou América Central, mas isso ainda não foi determinado (Bentley e Trimen 1880; León, 1987; Peckolt e Peckolt, 1893). A araruta foi exportada posteriormente para outras localidades do mundo, como as Ilhas Barbados, Jamaica e outras regiões do Caribe (Leonel e Cereda, 2002; Monteiro e Peressin, 2002). Trata-se de uma planta herbácea (Figura 01), ereta, com caule articulado de aproximadamente 120 cm de altura, rizomas fusiformes, com casca brilhante e escamosa (Taiz et al. 2004; Monteiro e Peressin, 2002), de ciclo anual e comportamento genético alógamo (Martins, 2005).



Figura 01: À esquerda, parte área de uma planta jovem de *M. arundinacea* apresentando sua folhagem específica, alongada e em formato de lança; À direita, rizomas (caule subterrâneo da planta) descascados e lavados, com sua coloração específica esbranquiçado e seu formato fusiforme. Fonte: <http://www.tipdisease.com/2015/05/arrowroot-maranta-arundinacea-overview.html>.

Os rizomas frescos da araruta (figura 01) são órgãos armazenadores de amido, que pode apresentar, conforme a idade da planta, mais de 20% de amido em massa fresca. (Pereira et al., 1999), além de outras moléculas, como proteínas que possam estar envolvidas no papel de defesa da planta, induzida por feridas causadas por predadores ou patógenos (Hartl et al. 2011; Jorgensen et al. 2006). Muitos estudos têm focado nos pequenos compostos orgânicos bioativos que são produzidos a partir de diversas famílias de plantas (Shehzad et al., 2010). A maior parte das plantas se defendem de ataques causados por insetos ou outros patógenos a partir da diversidade de produção de metabólitos secundários e proteínas como mecanismos de defesa (Rosenthal e Berenbaum, 1992).

Inibidores de proteases têm sido descritos com certa frequência, encontrados principalmente em tecidos de reserva vegetais, principalmente isolados de sementes de leguminosas, como o feijão (*Phaseolus vulgaris* L. Gerstenberg et al. 1980) e a soja (*Glycine max.* Song and Suh, 1998; Kunitz, 1945), de raízes tuberosas como a batata (*Solanum tuberosum* L. Ishikawa et al, 1994; Dunse et al, 2010), assim como em sementes de diversas outras

plantas como a *Brassica napus* L. (colza) (Visentin et al, 1992), *Sinapis alba* L. (mostarda-branca), *Tamarindus indica* L. (Pandey e Jamal, 2014) e mais recentemente de *Artocarpus heterophyllus* Lam. (Lyu et al, 2015). A função dos inibidores de proteases está associado ao papel fisiológico no qual abrange a regulação de proteases endógenas na dormência de sementes, a mobilização de proteínas de reserva (Mossolov e Valueva, 2005) e proteção contra enzimas proteolíticas principalmente de insetos, mas também já foram caracterizadas contra enzimas de bactérias e fungos (Haq et al, 2004; Mossolov e Valueva et al., 2005)

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos Básicos sobre a Produção Agrícola de Mato Grosso do Sul e a Lagarta *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797)

O estado de Mato Grosso do Sul possui como principais fontes de cultivo as culturas da soja, milho, cana de açúcar, algodão, trigo e feijão. Essa área de plantio de grãos na região chegou a quase 4 milhões de hectares na safra de 2015, com produção média de aproximadamente 16 milhões de toneladas de grãos para a área plantada (Conab, 2015). Com o aumento gradativo no número de áreas de cultivo e aumento na eficiência da produção de grãos por área, as grandes monoculturas também necessitam de manejo adequado em relação as perdas de produção eventualmente ocasionada por insetos. Essas culturas sofrem com frequentes ataques de insetos pragas, nos quais atingem e danificam diversos tecidos nas plantas, principalmente o limbo foliar, e ocasionam perdas recorrentes à intensidade do ataque. Dentre todos os principais cultivos realizados no estado, vale a pena destacar os principais insetos-praga que atacam cada uma dessas grandes culturas, como no caso da soja, os mais recorrentes são a lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatilis*), o percevejo-marrom (*Euschistus heros*), o percevejo-verde (*Nezara viridula*), o percevejo-pequeno (*Piezodorus guildinii*), a lagarta do cartucho do milho (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera: Noctuidae) e os percevejos castanhos *Scaptocoris castanea* e *Atarsocoris brachiariae*. No milho as principais pragas são a lagarta do cartucho do milho (*S. frugiperda*), larvas-da-vaquinha (*Diabrotica speciosa*), o percevejo-barriga-verde (*Dichelops melacanthus*) e os percevejos-castanhos. Para o trigo a lagarta do cartucho (*S. frugiperda*) e o pulgão-verde-dos-cereais (*Schizaphis graminum*) e as larvas-davaquinha (*D. speciosa*). Na aveia, destacam-se o pulgão *Metopolophium dirhodum* e a lagarta do cartucho (Cruz, 1997).

A lagarta do cartucho é uma das principais pragas que ocasionam perda econômica em diversos cultivos (alfafa, algodão, amendoim, arroz, aveia, batata, batata-doce, cana-de-açúcar, hortaliças, trigo e soja), por apresentar hábito polífago, está presente em diversas monoculturas, mas é a principal praga da cultura do milho no Brasil (Nagoshi et al., 2007). Os danos ocasionados por *S. frugiperda* na cultura do milho pode reduzir a produção entre 34 e 52%. (Cruz, 1995; Valicente, 2015). As larvas mais novas consomem tecidos de folha de um lado, deixando a epiderme oposta intacta (Figura 02A). Depois de segundo ou terceiro instar, as larvas começam a fazer buracos nas folhas, se alimentando em seguida do cartucho das plantas de milho, produzindo uma característica fileira de perfurações nas folhas (Figura 02B). A densidade de larvas no cartucho é reduzida devido ao comportamento canibal deste inseto (Hruska; Gould, 1997).



Figura 02: Danos causados ao limbo foliar do milho por *S. frugiperda*, em seus respectivos instares, onde, em A, há a raspagem apenas de um dos lados da folha; já em B, a lagarta, após seu desenvolvimento, passa a consumir todo o limbo foliar. Fonte: <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/1905001/lagarta-do-cartucho>.

As lagartas recém-eclodidas são esbranquiçadas, possuem cabeça mais larga do que o corpo e apresentam mais pêlos que as mais velhas. No primeiro ínstar as lagartas medem 1,9 mm de comprimento, com cápsula cefálica medindo 0,3 mm de largura. Já as larvas de último ínstar têm o corpo cilíndrico, de coloração marrom-acinzentada no dorso, esverdeada na parte ventral e subventral, que também apresenta manchas de coloração marrom-avermelhada. O corpo mede cerca de 50 mm de comprimento e a largura da

cápsula cefálica varia de 2,7 a 2,78 mm. A duração da fase larval é de 12 a 30 dias (Cruz, 1995).

2.2 Enzimas em Invertebrados

O canal alimentar estomodeoproctodeo representa uma área de contato entre insetos e o meio ambiente (Figura 03). Essa região tem sido o foco de grande parte das pesquisas para se controlar o ataque de pragas (Chapman, 1998; Levy et al 2004), principalmente a região do mesêntero, onde as células epiteliais estão envolvidas nos processos de absorção e secreção de enzimas (células colunares), homeostase iônica (células caliciformes), função endócrina (células endócrinas) e na renovação do epitélio (células regenerativas), absorção de produtos da digestão (Chiang et al 1986). Um tecido localizado nessa região realiza a função de mecanismo de defesa. A membrana peritrófica, tem papel fundamental na biologia do intestino médio, por estar posicionada entre o conteúdo alimentar e o revestimento epitelial, desempenhando a função de proteger o epitélio de danos mecânicos, exercendo ainda função de barreira contra toxinas e substâncias químicas prejudiciais ao inseto (Lehane 1997).

As enzimas digestivas de insetos apresentam papel fundamental no processo de quebra do alimento em partículas menores, que possam ser absorvidas pelo intestino. Entre essas enzimas destacam-se as amilases, celulasas, hemicelulasas e proteinases (Silva; Lemos; da Silva, 2013). Em seus últimos ínstares, as lagartas de *S. frugiperda* apresentam um maior consumo do limbo foliar. O intestino dos insetos é compartimentado em intestino anterior, médio e posterior. Em lepidópteros, o intestino anterior é composto por boca, esôfago e papo, sendo a parte responsável pela digestão inicial dos alimentos. A maior parte da digestão, entretanto, acontece no intestino médio, o qual é dividido em ventrículo, estômago e túbulos de Malpighi (Terra; Ferreira, 2009). A digestão é finalizada no intestino posterior, composto pelo íleo, cólon e reto, onde ocorre a absorção de água e íons, terminando no ânus. Com exceção das enzimas envolvidas na digestão inicial, todas as demais estão imobilizadas na superfície intestinal (Terra; Ferreira, 2009). Em geral, os insetos utilizam uma classe de enzimas ou uma combinação de peptidases serínicas, cisteínicas ou aspárticas para a digestão do alimento (Koiwa; Bressan; Hasegawa, 1997).

Em lepidópteros, as serino proteases são responsáveis por 95% da atividade digestiva total (Srinivasan; Giri; Gupta, 2006, Macedo et al, 2011). Isso ocorre porque essas enzimas são mais ativas em pH alcalino (de 9 a 11), que é justamente a condição encontrada no sistema digestório de insetos da ordem lepidoptera (Jamal et al., 2013). Dentro da sub-classe de serino proteases, são encontradas as proteinases tripsinas e quimotripsinas, que tem ampla participação no processo digestivo, sendo bem distribuídas entre os insetos. Embora as propriedades das tripsinas de insetos e vertebrados sejam similares, há algumas particularidades. Por exemplo, as tripsinas de insetos são mais sensíveis à presença de inibidores de proteases e não são ativadas ou estabilizadas por íons de cálcio (Terra; Ferreira, 1994).

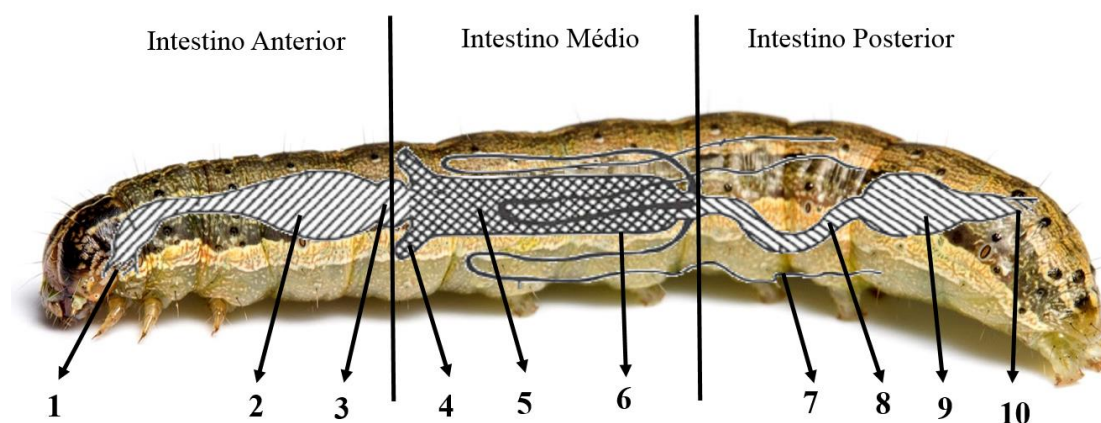


Figura 03: Anatomia das porções intestinais de *S. frugiperda*. Em 1: boca; 2: divertículo; 3: proventrículo; 4: seco gástrico; 5: espaço endo-peritrófico; 6: membrana peritrófica; 7: túbulos de malpighi; 8: íleo; 9: reto e 10: ânus.

2.3 Famílias de Enzimas

Segundo a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, do inglês “*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*”), as enzimas estão organizadas em seis classes (EC, *enzyme code*), organizadas de acordo com a comparação de centros reativos, mecanismos de ação e estrutura tridimensional: 1 Oxidoredutases; 2 Transferases; 3 Hidrolases; 4 Lases; 5 Isomerases e 6 Ligases (IUBMB, 1992). O termo “protease” ou “peptidase” podem ser utilizados como sinônimos afim de descrever o mesmo grupo de proteínas com atividade hidrolítica de ligações peptídicas. As peptidases abrangem os dois grandes grupos nos quais se

dividem as enzimas: as endopeptidases (ou chamadas de proteinases), as quais clivam ligações peptídicas em locais específicos no interior de seus substratos; e as exopeptidases, as quais removem aminoácidos sequencialmente do N- ou C-terminal (Barrett e Rawlings, 2004).

As proteases são agrupadas com base em sua estrutura terciária, local de origem e principalmente com o aminoácido chave presente no sítio catalítico da enzima: serina (Ser), treonina (Thr), cisteína (Cys), aspartato (Asp), glutamato (Glu) e metaloproteases (MP). As proteases das famílias serino, cisteíno e treonino atuam como nucleófilas, atacando diretamente o carbono da carbonila, enquanto as famílias aspartato, glutâmico e metalo proteases ativam uma molécula de água que atua juntamente com o sítio catalítico, como nucleófilo (Lecaille et al., 2002).

Parte das enzimas não dependem de um grupamento prostético para serem ativas, apenas que apresentem certas condições (como pH e temperatura adequadas) para desenvolverem sua função. Outra parte de enzimas que dependem, além da composição de aminoácidos, “cofatores” de ativação, que podem ser moléculas simples, como íons inorgânicos como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} , como é na maioria dos casos, ou dependerem de moléculas mais elaboradas, denominadas coenzimas, as quais se ligam covalentemente ao seu sítio respectivo na enzima. O complexo formado entre enzima mais coenzima e/ou cofatores passa a determiná-la como holoenzima (Coopeland et al. 2000; Lehninger, 2010).

Com o advento da tecnologia, as análises de estrutura tridimensional das proteínas por cristalografia e a determinação de suas sequências de aminoácidos, se torna possível agrupar as enzimas em famílias, de acordo com as características físico-químicas (Neurath, 1990). Atualmente, existem bancos de dados especializados em agrupar e armazenar informações de proteases e inibidores de proteases em respectivas famílias, que possuam similaridade de sítios catalíticos e/ou sequências homólogas.

2.3.1 Protease Aspártica (PA)

Essa família se encontra distribuída por um amplo espectro de organismos, com localização específica em cada organismo, já sendo relatado estudos de isolamento e caracterização dessa família de proteases desde

plantas à vertebrados, fungos, parasitos, retrovírus e bactérias (Hill e Phylip, 1997; James et al., 1998). As enzimas que estão incluídas nessa família geralmente estão localizadas dentro de lisossomos como por exemplo, as catepsinas D e E (lisossomos), pepsina, renina, gastricsina, (em sangue humano) retropepsina (em vírus). É uma família de enzimas que possui a melhor taxa de atividade em pH ácido, variando de 2 a 5, dependendo a enzima a ser abordada. O que é característico dessa família é presença de dois resíduos de ácido aspártico no centro catalítico da enzima, (sendo que o primeiro resíduo pode variar de Asp³² ou Asp³⁵ e o segundo resíduo de Asp²¹⁴ a Asp²¹⁵ (Kashparov et al., 1998). Compõe também o sítio catalítico da enzima, além do ácido aspártico, é a presença de uma glicina, havendo variação do último aminoácido que compõe a tríade, podendo ser esse uma ou mais treoninas e uma serina (Rawlings e Barret, 1995). Um bom exemplo de sítio catalítico dessa família está presente no mecanimo de catálise da aspergillopepsina (Figura 04). O sítio reativo dessa protease aspártica é/são atacadas por uma molécula de água nucleofílica, ativando os dois resíduos de ácido aspártico (Asp³² e Asp²¹⁴). De modo geral, o resíduo de Ser³⁵ auxilia na manutenção da maquinaria catalítica formando uma ligação de hidrogênio com o resíduo de Asp³². O átomo de Asp²¹⁴ é coordenado por um íon de Zn²⁺ a formar uma ligação de hidrogênio com o resíduo de Thr²¹⁵ e a amida do resíduo de Gly²¹⁶ (Cho et al., 2001).

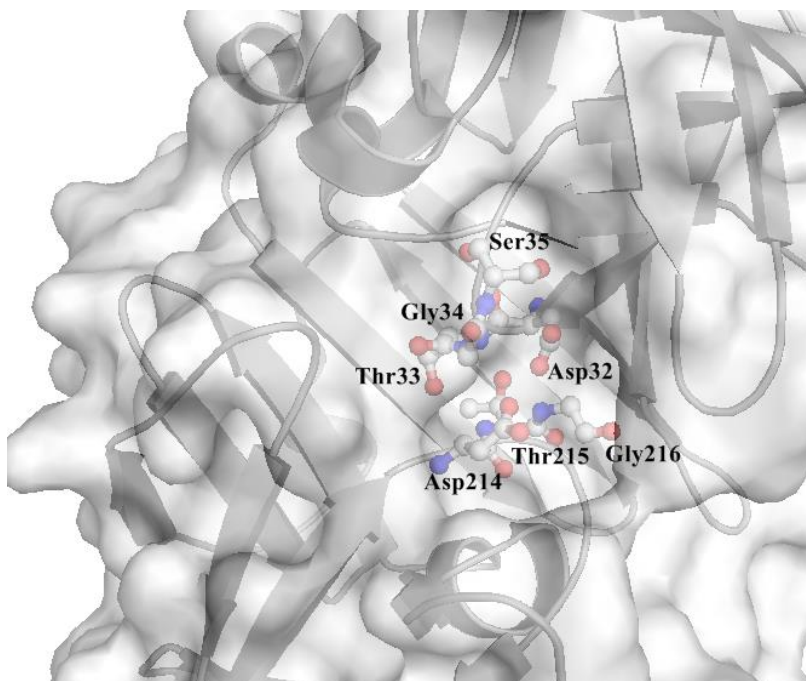


Figura 04: Representação do sítio catalítico da enzima pepsina (PDB 1IBQ). Ao todo, sete resíduos de aminoácidos estão envolvidos diretamente com o mecanismo de catálise (Asp³²; Thr³³; Gly³⁴; Ser³⁵; Asp²¹⁴; Thr²¹⁵ e Gly²¹⁶), onde os resíduos de ácido aspártico realizam a função de ataque nucleofílico. Em vermelho (oxigênio), em azul (nitrogênio) e branco (carbonos).

2.3.2 Cisteino Proteases (CP)

As cisteino proteases contêm, compondo a tríade do sítio catalítico, Cys²⁵-His¹⁵⁹-Asn¹⁷⁵ (para Papaína). A primeira enzima isolada e caracterizada dessa família, e talvez a mais famosa, é a papaína, extraída de *Carica papaya* por Balls e colaboradores, em 1937 (Figura 05). O resíduo de histidina (His¹⁵⁹), presente no centro ativo, atua como doador de prótons aumentando a nucleofilicidade do resíduo de cisteína. O resíduo de cisteína (Cys²⁵) nucleofílico ataca o carbono reativo da ligação peptídica, produzindo o primeiro intermediário de tioéster tetraédrico na reação com a liberação de um fragmento amino terminal do substrato (Kamphuis et al. 1984; Coulombe et al. 1996). A papaína possui 212 resíduos de aminoácidos de massa molecular de 23,35 kDa, e cliva, preferencialmente, ligações peptídicas envolvendo aminoácidos básicos e também, possui atividade esterásica.

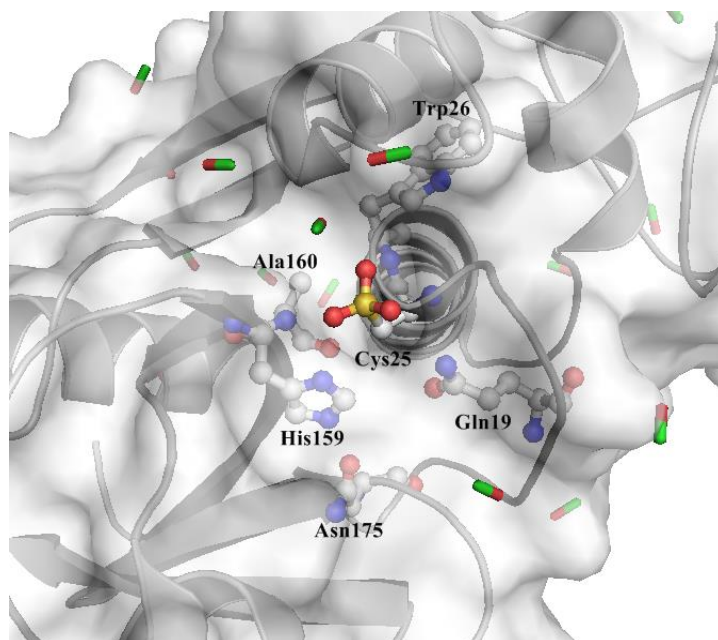


Figura 05: Estrutura 3D da enzima Papaína (PDB 9PAP) representante da família das cisteino peptidases, com destaque para o sítio ativo, onde são apresentados os resíduos dos aminoácidos envolvidos com a atividade catalítica da enzima. Em vermelho (oxigênio), em azul (nitrogênio) e branco (carbonos).

2.3.3 Protease Glutâmica (GP)

Uma das enzimas mais bem estudadas e talvez primeiro membro da família das proteases glutâmicas é a Scytilidocarboxil-peptidase B (SCP-B), extraída do fungo *Scytilidium lignicolum*. Essa família proteases foi estabelecida em 2004, sendo que, os primeiros estudos partiram da premissa que essas proteases possuíam uma díade catalítica em seu sítio, mas hoje, já são confirmados que resíduos que compõe o sitio ativo, são o ácido glutâmico (Glu¹³⁶) e/ou glutamina (Gln⁵³) (no caso das eqolisinas), o que caracteriza as proteases dessa família (Fujinaga et al., 2004). A maior parte dos eventos de clivagem que acontecem pelo vírus da gravura do tabaco (TVE, do inglês: *Tobacco etch virus*) acontecem por causa da *nuclear inclusion α* protease (NIα) (Figura 06). Essa enzima possui como resíduos catalíticos Gln²⁴², His⁴⁶ e Asp⁸¹, assim como outros aminoácidos atuantes no sítio catalítico (Ala¹⁵¹; Tyr²⁴⁰; Ser²⁴¹) (Nunn et al., 2005). O número de ligações dissulfeto intramolecular é variável nas proteases glutâmicas.

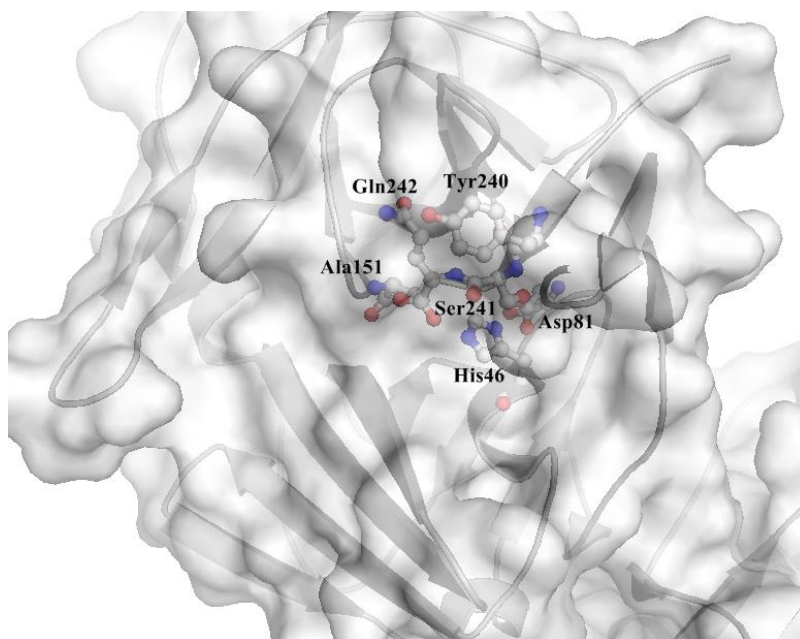


Figura 06: Sítio catalítico da protease glutâmica NIα (PDB 1Q31). Os resíduos de Gln²⁴², His⁴⁶ e Asp⁸¹, desempenham a função catalítica e os resíduos Ala¹⁵¹; Tyr²⁴⁰; Ser²⁴¹ auxiliam o processo.

2.3.4 Metallo Proteases (MP)

As metaloproteases são outro grupo de enzimas distribuídas em um amplo grupo de organismos. As metaloproteases são geralmente caracterizadas possuindo um íon de zinco catalítico no sítio ativo dessa enzima

(Matrisian, 1990). Os aminoácidos que compõem o sítio catalítico podem variar entre histidina, ácido glutâmico, ácido aspártico, lisina ou arginina, sendo geralmente a histidina e o ácido glutâmico os aminoácidos que compõem o sítio, onde o íon de zinco se liga a histidina e o ácido glutâmico quem promove o ataque nucleofílico (Rawlings e Barret, 1995). Atualmente, existem mais de 50 famílias de metaloproteases, e em cada família, a posição dos aminoácidos que compõem o sítio catalítico varia. A agrecanase-2 (Figura 07) também denominada como ADAMTS-5 (desintegrina e metaloprotease com motivo 5 de trombospondina) apresenta atividade catalítica sobre o agrecano (um dos componentes da matriz extracelular da cartilagem, também composta por colágeno, onde, a degradação de um desses componentes resulta na doença progressiva da osteoartrite e dor crônica). Essa enzima contém no sítio ativo, uma molécula de zinco (resíduos 264 e 476) e duas ligações de cálcio (Mosyak et al, 2008). Essa enzima em questão apresenta perda significativa da atividade do sítio catalítico na presença da molécula denominada como “Composto 12” (Cys-1(1S)2(R)--hydroxy-2,3-dihydro-1H-inden-1-yl), um inibidor competitivo específico para metaloproteases (Tortorella et al., 2009).

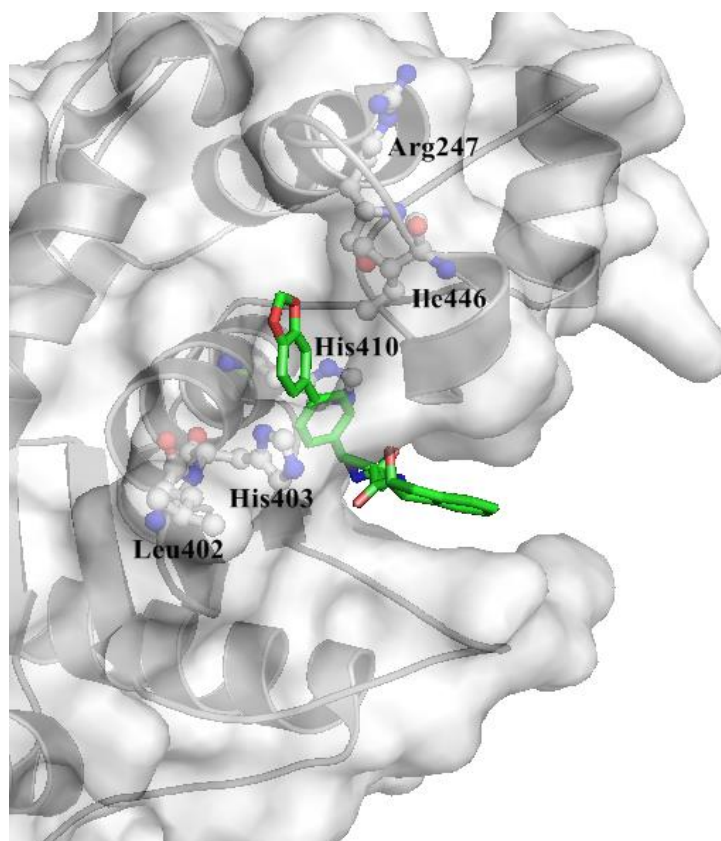


Figura 07: Estrutura do sítio catalítico de ADAMTS-5 (PDB 3LJT) onde estão localizados os aminoácidos componentes do mecanismo de catálise da enzima (Ile⁴⁴⁶; Arg⁴²⁷, Hist⁴¹⁰; His⁴⁰³, Leu⁴⁰²). Em verde está representado a interação do sítio catalítico com estrutura da molécula denominada “composto 12”, um inibidor do sítio catalítico das metaloproteases.

2.3.5 Treonino Proteases (TP)

As proteases contidas nessa família apresentam formas inativas quando estão presentes dentro dos proteossomos, já nas proteínas maduras, o resíduo catalítico é a treonina (Thr). A constituição estrutural das enzimas da família das treonino proteases é muito semelhante a outras hidrolases, sendo que, nessa família, o aminoácido catalítico pode ser substituído por um resíduo de serina sem perda significativa de atividade (Lowe et al. 1995). As treonino proteases desenvolvem diversas funções importantes no organismo, como é o caso da Taspase 1 (Figura 08) (Khan et al. 2005). Essa enzima contém um resíduo de treonina como nucleófilo no sítio ativo, e cliva após um resíduo de aspartato, (Hsieh et al., 2003a). A proenzima possui cerca de 420 resíduos de aminoácidos, e posteriormente sofre um processamento autoproteolítico nas regiões Asp²³³ e Thr²³⁴, originando as subunidades α (N-terminal 28 kDa) e β (C-terminal 22 kDa). O resíduo catalítico é Thr²³⁴ (Hsieh et al., 2003a). A Taspase 1 é responsável por clivar uma proteína envolvida no processo denominado como “Leucemia de linhagem mista humana” (MLL, do inglês: human mixed lineage leukemia). Essa proteína associada ao processo de leucemia possui 3969 resíduos de aminoácidos e 500 kDa de massa, atua mantendo a expressão dos genes “Hox” apropriados (Yu et al., 1998). Essa proteína pode ser clivada em dois sítios (local 1: resíduo 2666, sequência Asp Gly-Ala-Asp-Asp) (local 2: resíduo 2718, Asp Gly-Val-Asp-Asp) criando um fragmento N-terminal de 320 kDa e um fragmento C-terminal de 180 kDa (Hsieh et al., 2003b; Yokoyama et al., 2002).

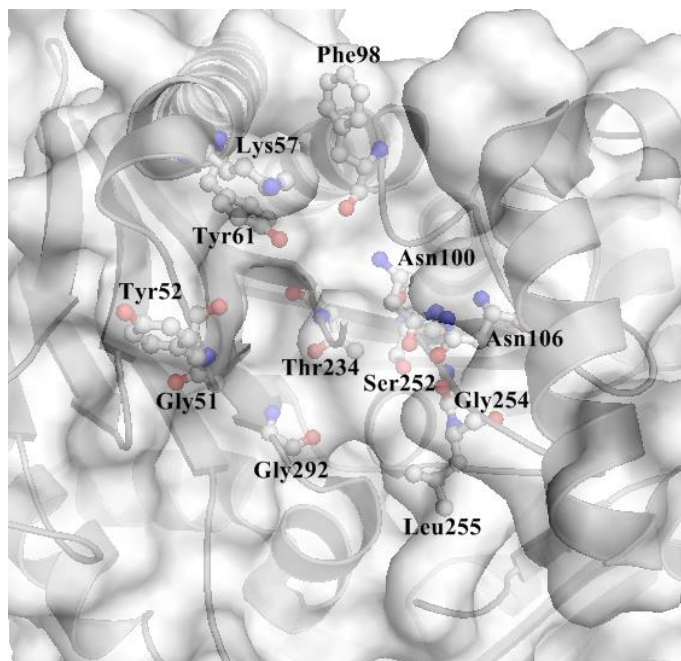


Figura 08: Sítio catalítico da enzima Taspase 1 (PDB 2A8I). Ao centro, está localizado o resíduo catalítico da enzima (Thr²³⁴), juntamente ao entorno com os outros resíduos componentes da maquinaria catalítica (Gly⁵¹; Tyr⁵²; Lys⁵⁷; Tyr⁶¹; Phe⁹⁸; Asn¹⁰⁰; Asn¹⁰⁶; Ser²⁵²; Gly²⁵⁴; Leu²⁵⁵ e Gly²⁹²).

2.3.6 Serino Proteases (SP)

Essa grande família de enzimas é dividida em três classes: A classe da quimotripsina, ao qual inclui a maior parte das enzimas encontradas nos mamíferos que são tripsina, quimotripsina, elastase, calicreína, trombina, entre outras. A segunda classe compreende as enzimas da família subtilisina, ao qual incluem as enzimas encontradas em bactérias (Headstrom, 2002) e a terceira classe compreende as serino carboxipeptidases II. As serino proteases são assim chamadas por utilizar um único resíduo de serina ativada no sítio ativo (Copeland, 2000).

As serino proteases exibem diferentes especificidades por substrato o que está relacionado com as substituições de aminoácidos nos vários subsítios das enzimas, os quais são nomeados de acordo com a nomenclatura Schechter e Berger em 1967. Nesse sistema é considerado que os resíduos de aminoácidos do substrato polipeptídico se ligam em subsítios da enzima ativa. Por convenção, esses subsítios na protease são chamados S (subsítios) e os resíduos de aminoácidos do substrato são chamados P (para peptídeo). Os resíduos de aminoácidos do lado N-terminal da ligação peptídica do substrato que é hidrolisada pela protease são numerados P_n, P_(n-1), ..., P₃, P₂, P₁ e os

resíduos do lado C-terminal são numerados P1', P2', P3', ..., P(n-1)', Pn'. Os resíduos P1-P1' formam uma ligação chamada "scissile" ou ligação peptídica do substrato que é clivada pela protease na hidrólise. Os subsítios na protease que complementam os resíduos do substrato ligado são numerados Sn, S(n-1), ..., S3, S2, S1, S1', S2', S3', ..., S(n-1)', Sn'. Algumas enzimas têm um sítio de interação estendido com o substrato enquanto outras interagem restritamente com resíduo na posição P1 do substrato (Hedstrom, 2002).

As serino proteases tem um mecanismo comum de catálise que requer uma tríade de aminoácidos nos sítios ativos da enzima. Os resíduos que formam a tríade, essenciais no processo catalítico são: His⁵⁷, Asp¹⁰² e Ser¹⁹⁵. A serina residual atua como nucleófilo primário para o ataque da ligação peptídica. A cadeia lateral da Ser¹⁹⁵ forma uma ponte de hidrogênio com o anel imidazólico da His⁵⁷. O grupamento amina deste anel, por sua vez, forma ponte de hidrogênio com o grupo carboxilato do Asp¹⁰². Este arranjo estrutural leva à alta reatividade da Ser¹⁹⁵. A histidina serve para posicionar a cadeia lateral da serina e para polarizar a sua hidroxila. Ao fazer isto, age como catalisador ácido/base geral, porque a hidroxila polarizada da serina fica pronta para desprotonação. O aspartato ajuda a orientar a histidina e tornar a histidina um melhor aceptor de prótons, por efeitos eletrostáticos (Figura 09) (Copeland, 2000).

Entre as serino-proteases, as tripsinas, quimotripsinas e elastases são a maior parte das enzimas responsáveis pela digestão inicial de proteínas no intestino de animais superiores (Garcia-Olmedo et al., 1987). A distinção entre essas três proteases serínicas é feita com base na sua especificidade. As tripsinas clivam a região C-terminal em sítios contendo lisina e arginina, que são aminoácidos básicos, enquanto as quimotripsinas apresentam atividade catalítica pela região C-terminal em resíduos de fenilalanina, tirosina e leucina (hidrofóbicos) e as elastases clivam em sítios contendo aminoácidos neutros (alanina e glicina) (Ryan, 1990).

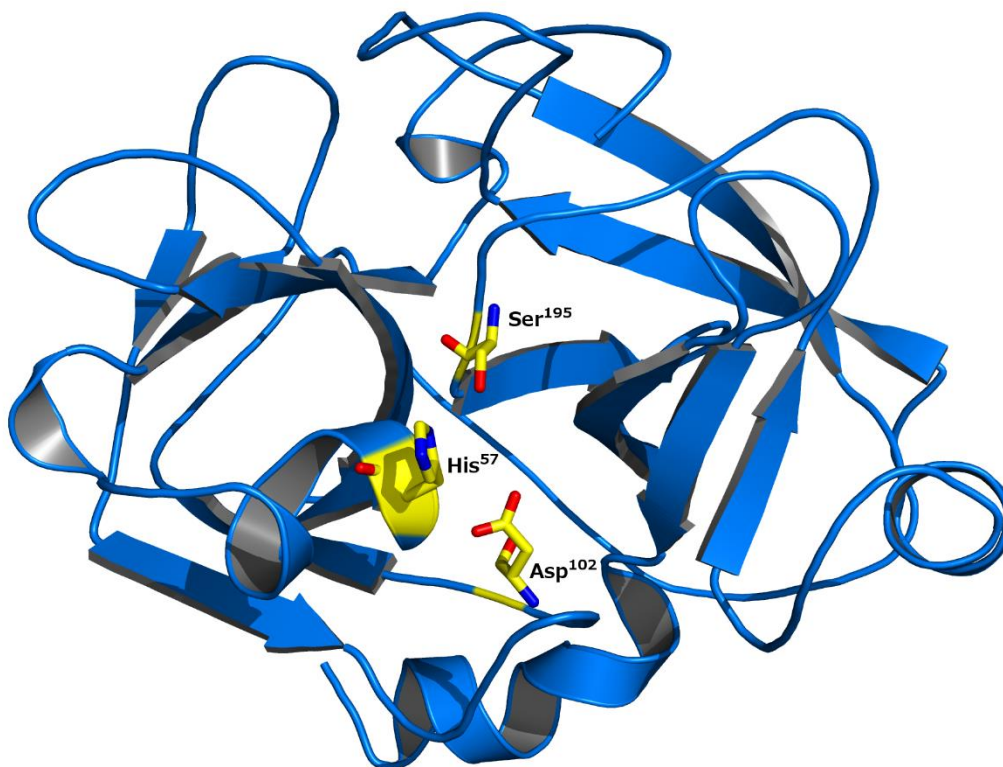


Figura 09: Estrutura 3D da enzima tripsina bovina (PDB 5FXL) com destaque para sítio catalítico (em amarelo), onde estão localizados os aminoácidos que compõe a tríade catalítica dessa enzima (Ser¹⁹⁵, His⁵⁷ e Asp¹⁰²), local onde ocorre a clivagem do substrato.

As serino proteases estão inseridas dentro da classe das hidrolases, subclasse das peptidases e agrupadas de acordo com a homologia em suas sequências de aminoácidos. A tabela a seguir apresenta todas as proteínas da família das serino proteases que apresentam sua estrutura tridimensional e sequenciamento da cadeia de aminoácidos resolvidos e depositadas no Protein Data Bank (PDB).

Tabela 01: Classificação atual das serino proteases. (Fonte: <http://merops.sanger.ac.uk/>) (IUBMB: http://www.enzyme-database.org/class.php?c=3&sc=4&ssc=*&sh=21).

Família	Subfamília	Enzima	Organismo	PDB ID
S1	S1A	Quimotripsina A	<i>Bos taurus</i>	2CHA
	S1B	Glutamil endopeptidase I	<i>Staphylococcus aureus</i>	2O8L
	S1C	DegP peptidase	<i>Escherichia coli</i>	*
	S1D	Lisil endopeptidase	<i>Achromobacter lyticus</i>	1ARB
	S1E	Streptogrisina A	<i>Streptomyces griseus</i>	5SGA
	S1F	Peptidase serínica Astrovirus	Mamastrovirus 1	2W5E
S3		Togavirinase	Sindbis virus	1KXF
S6		Peptidase serínica específica IgA1	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	*
S7		Flavivirinase	Yellow fever virus	1YKS
S8	S8A	Subtilisina Carlsberg	<i>Bacillus licheniformis</i>	1BFU
	S8B	Kexina	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1R64
	S9A	Proil oligopeptidase	<i>Sus scrofa</i>	1H2Y
	S9B	Dipeptidil-peptidase IV	<i>Homo sapiens</i>	1NU6
	S9C	Acilaminoacil-peptidase	<i>Homo sapiens</i>	*
	S9D	Glutamil endopeptidase C	<i>Arabidopsis thaliana</i>	*
S10		Carboxipeptidase Y	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1WPX
S11		D-Ala-D-Ala carboxipeptidase A	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	*
S12		D-Ala-D-Ala carboxipeptidase B	<i>Streptomyces lividans</i>	1ESI
S13		D-Ala-D-Ala peptidase C	<i>Escherichia coli</i>	1IOW
S14		Peptidase Clp	<i>Escherichia coli</i>	1TYF
S15		Xaa-Pro dipeptidil-peptidase	<i>Lactococcus lactis</i>	1LNS
S16		Lon-A peptidase	<i>Escherichia coli</i>	2ANE
S21		Citomegalovirus assemblinase	Human herpesvirus 5	3N4P
S24		Repressor LexA	<i>Escherichia coli</i>	3JSP
S26	S26A	Peptidase sinal I	<i>Escherichia coli</i>	3S04
	S26B	Signalese 21 kDa componente	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4EQV
	S26C	TraF peptidase	<i>Escherichia coli</i>	1B12
S28		Carboxipeptidase lisosomal Pro-Xaa	<i>Homo sapiens</i>	3N2Z
S29		Hepacivirinase	hepatitis C virus	*
S30		Potivirus P1 peptidase	Plum pox virus	*
S31		Pestivirus NS3 peptidase poliproteína	Bovine viral diarrhea vírus 1	*
S32		Peptidase serínica equino arteritis vírus	Equine arteritis virus	1MBM
S33		Proil aminopeptidase	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	*

S37		OS-10 peptidase	<i>Streptomyces lividans</i>	1CEF
S39	S39A	Sobemovirus peptidase	Cocksfoot mottle virus	1NG0
	S39B	Luteovirus peptidase	Potato leaf roll luteovirus	*
S41	S41A	Peptidase-1 processadora C-terminal	<i>Escherichia coli</i>	1B12
	S41B	Peptidase núcleo Tricorn	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	1K32
S45		Penicillina G precursor de acilase	<i>Escherichia coli</i>	1GK9
S46		Dipeptidil-peptidase 7	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4XZY
S48		Peptidase putativa HetR	<i>Anabaena variabilis</i>	4YRV
S49	S49A	Peptidase signal peptideo A	<i>Escherichia coli</i>	3BF0
	S49B	Proteína C	Bacteriophage lambda	*
	S49C	Archaea peptidase signal de peptídeo 1	<i>Pyrococcus horikoshii</i>	*
S50		Peptidase-Vp4 infeccioso birnavirus de necrose pancreática	Infectious pancreatic necrosis virus	2PNL
S51		Dipeptidase E	<i>Escherichia coli</i>	1ONX
S53		Sedolisina	<i>Pseudomonas sp. 101</i>	1NLU
S54		Rombóide-1	<i>Drosophila melanogaster</i>	*
S55		SpolVB peptidase	<i>Bacillus subtilis</i>	4C2E
S59		Nucleoporina 145	<i>Homo sapiens</i>	*
S60		Lactoferrina	<i>Homo sapiens</i>	1FCK
S62		Peptidase Influenza A PA	Influenza A virus	*
S64		Ssy5 peptidase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	*
S65		Peptidase cisteínica ligante picornaina	Breda virus	*
S66		LD-carboxipeptidase mureína tetrapeptidase	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	*
S68		Proteína auto processamento PIDD unidade 1	<i>Homo sapiens</i>	*
S69		Telina vírus 1 VP4 peptidase	Telina vírus 1	3P06
S71		MUC1 mucina de auto-clivagem	<i>Homo sapiens</i>	*
S72		Distroglicana	<i>Homo sapiens</i>	*
S73		gpO peptidase	Enterobacteria phage P2	*
S74		<i>Escherichia coli</i> fago K1F endosialidase CIMCD proteína de auto-clivagem	Enterobacteria phage K1F	*
S75		Peptidase serínica Brema branca vírus	White bream virus	*
S77		Peptidase prohead gp21	Enterobacteria phage T4	*
S78		peptidase prohead	Enterophage HK97	3QPR
S79		CARD8 proteína de auto-clivagem	<i>Homo sapiens</i>	*
S80		peptidase prohead gp175	<i>Pseudomonas</i> phage phiKZ	*
S81		Destabilase	<i>Hirudo medicinalis</i>	*

*não encontrado ou estrutura não desenhada até o momento.

Nesse âmbito, as enzimas proteolíticas executam uma grande variedade de funções fisiológicas complexas. Alguns exemplos de sua importância estão em conduzir as funções metabólicas e regulatórias essenciais, o que pode ser confirmado pela sua ocorrência em todas as formas de organismos vivos. Assim, podem exercer papel-chave em processos como o catabolismo de proteínas, a coagulação sanguínea, o crescimento e a migração celulares, a formação de tecidos, a morfogênese em desenvolvimento, inflamações e crescimento de tumores, a ativação de zimogênios, a liberação de hormônios e de peptídeos farmacologicamente ativos de proteínas precursoras e, também, o transporte de proteínas através das membranas. Os processos fisiológicos que mais requerem a participação de proteases são renovação de proteínas, esporulação e germinação de esporos, modificação enzimática, nutrição e regulação da expressão gênica (Rao et al., 1998).

Assim como todos os seres vivos, os insetos também apresentam em seu sistema digestório, várias classes de enzimas, mais abundantemente encontradas no intestino médio do trato digestivo desses animais. Por muito tempo foi aceito que, assim como vertebrados, os insetos continham apenas serino proteases, como tripsina e quimotripsina, e proteases aspárticas, como a pepsina (McFarlane, 1985). Os insetos são os principais causadores de perdas econômicas, principalmente as grandes culturas, por apresentarem hábito herbívoro em pelo menos uma fase de suas vidas (Edwards; Wratten, 1981). Na base dessa relação, as plantas utilizam estratégias para resistir ou livrarem-se de insetos herbívoros (Gatehouse, 2002). As plantas possuem uma forma de defesa contra o ataque de insetos e/ou outros patógenos por meio da produção constitutiva ou induzida de moléculas capazes de minimizar o dano causado por um predador. Um desses mecanismos de defesa envolve a produção de inibidores de proteases, os quais podem ser encontrados constitutivamente e, ainda, ser induzidos em resposta ao ataque de um patógeno ou de herbívoros (Hicks et al., 1997; Valueva e Mosolov, 2005).

2.4 Inibidores de Proteases

Por outro lado, existem as proteínas ou peptídeos capazes de formar complexos com enzimas proteolíticas, levando à redução e/ou inibição da ação

proteolítica por hidrólise de ligações peptídicas do substrato (Fan; Wu, 2005). Dependendo da complementariedade do sítio reativo do inibidor ao sítio ativo da enzima, ocorre a formação de um complexo estável, resultando na inibição reversível e/ou irreversível da atividade proteolítica (Joshi et al., 2013). Em plantas, os inibidores são relativamente abundantes em tecidos de reserva de plantas, sendo encontrados principalmente em tubérculos e sementes (Ussuf et al., 2001, Oliveira et al., 2007). Em plantas, os inibidores são encontrados em diversos tecidos, podendo representar de 5 à 15% das proteínas solúveis totais, presentes principalmente nas sementes das leguminosas, onde predominam em altas concentrações (Bhattacharyya et al., 2006). Os inibidores de proteinases em plantas (PPIs) desempenham um papel fundamental através da interação com suas proteinases homólogas formando complexos que modulam a atividade da enzima, e consequentemente, sua função (Richardson, 1977).

2.4.1 Família de Inibidores Tipo-Kunitz

Os inibidores da família Tipo-Kunitz compreendem a maior família de inibidores de proteases, onde, atualmente, se distribui em diversas famílias de plantas, onde foram isolados e caracterizados. O primeiro inibidor proveniente de plantas a ser purificado, cristalizado e caracterizado foi o inibidor de tripsina isolado de soja (*Glycine max*; *Soybean Trypsin Inhibitor* – STI-Kunitz) por Kunitz, em 1945. Outro inibidor de serino proteases já havia sido descoberto, em 1936, também por Kunitz e Nortrop, o BPTI-Kunitz (*Bovine Pancreatic Trypsin Inhibitor*) oriundo do extrato de tecido pancreático, sendo a primeira descrição de isolamento de um inibidor de proteases, dando assim, início aos trabalhos nesse campo.

Os inibidores STI-Kunitz são geralmente caracterizados pela massa molecular e quantidade de ligações dissulfeto de sua estrutura. Os inibidores de serino proteases dessa família possuem em torno de 160 - 200 resíduos de aminoácidos, com massa molecular com aproximadamente 18-21 kDa, sendo encontrado nesse total, quatro resíduos de cisteína, formando duas ligações dissulfeto, e, geralmente, um sítio reativo, onde ocorrem as ligações com as enzimas (Mossolov, 1993).

Os inibidores da família Kunitz são geralmente isolados e estudados em leguminosas, principalmente as que pertencem à família Fabaceae (Oliveira et al., 2007; Gomes et al., 2005). Esses inibidores podem ser constituídos por uma ou duas cadeias polipeptídicas e uma dobra estrutural comum composta por três folhas β formadas por doze folhas betas antiparalelas com uma longa interconecção com os laços apresentando um ou dos sítios reativos para serino-proteinases (Habib; Fazili, 2007; Sattar et al. 2004).

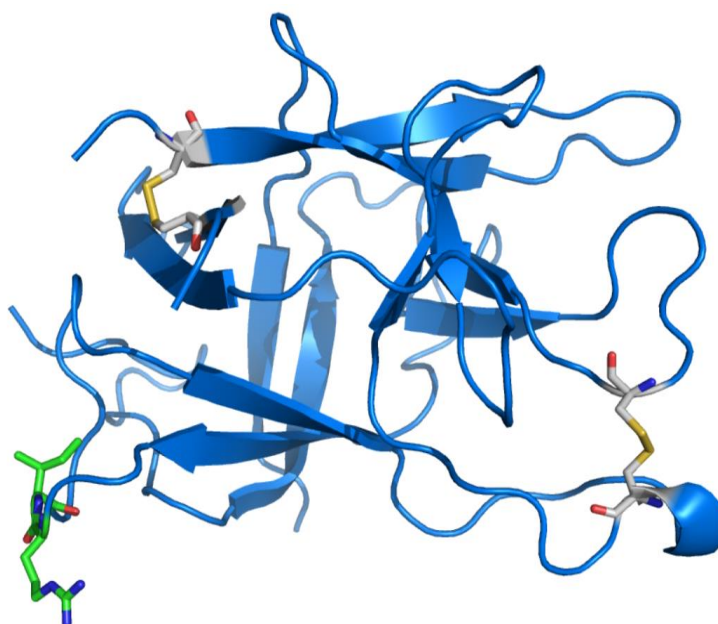


Figura 10: Estrutura tridimensional de um inibidor tipo Kunitz extraído de soja (*Glycine max*, PDB 1AVU). As cadeias representadas em amarelo e cinza indicam as ligações dissulfeto (Cys³⁹ e Cys⁸⁶; Cys¹³⁶ e Cys¹⁴⁵) e as cadeias em verde indicam o sítio (ou *loop*; Arg⁶³ e Ile⁶⁴) reativo do inibidor.

2.4.2 Família de Inibidores Bowman-Birk

Os inibidores desta família são caracterizados pela sua baixa massa molecular (7 – 9 kDa) e presença de dois sítios reativos (sistema *double-head*) o que lhe confere a característica de poder interagir com duas serino proteases ao mesmo tempo (tripsina e quimotripsina, geralmente caracterizados). Os inibidores da família BBI foram descritos primeiro por Bowman, em 1946, purificados de sementes de soja (*Glycine max*) e caracterizado em detalhes posteriormente por Birk, em 1963. Os inibidores BBI são compostos por dois

domínios homólogos, onde, o domínio N-terminal do inibidor contém o local de ligação com tripsina, e o domínio C-terminal é responsável pela ligação com quimotripsina (Ikenaka et al. 1986).

Estudos de ressonância magnética nuclear (RMN) e cristalografia por raio-X demonstraram que os sítios reativos dos inibidores BBI são localizados nas extremidades opostas da molécula (Ikenaka e Norioka, 1986). Os resíduos P1 que apresentam correspondência aos sítios S1 da tripsina são arginina (Arg) ou lisina (Lys), responsáveis por reconhecerem o sítio ativo e se ligarem a ele, além de conterem outros aminoácidos compondo esse domínio inibitório (Cys¹⁴, Thr¹⁵, Leu¹³, Cys¹² Thr¹¹, Val²⁵, Cys²⁴, Arg²³, Cys²⁴ Thr²¹ e Cys²² respetivamente). Os resíduos hidrofóbicos leucina (Leu), fenilalanina (Phe), triptofano (Trp) ou tirosina (Tyr) são os resíduos adjacentes ao reconhecimento e ligação ao sítio da quimotripsina, com composição do domínio inibitório composto por Ala⁴¹, Cys⁴⁰, Val³⁹, Cys³⁸, Lys³⁷, Gln⁴⁷, Cys⁴⁸, Gln⁴⁹, Cys⁵⁰, Tyr⁵¹ (Ragg et al., 2006; Clemente et al., 2011), enquanto alanina (Ala) é o resíduo seletivo para o sítio ativo da elastase (Bode e Huber, 2000).

Os inibidores da família Bowman-Birk contêm altos níveis de resíduos de cisteína envolvidos em uma rede conservada de ligações dissulfeto (Figura 11). Análises em espectroscopia de dicroísmo circular e estudos de fluorescência revelaram que os resíduos de cisteína, envolvidos em sete ligações dissulfeto proporcionam aos inibidores dessa família extrema estabilidade à altas temperaturas assim como mantém sua estrutura perante a proteólise (Ramassarma et al., 1995; Singh e Rao, 2002).

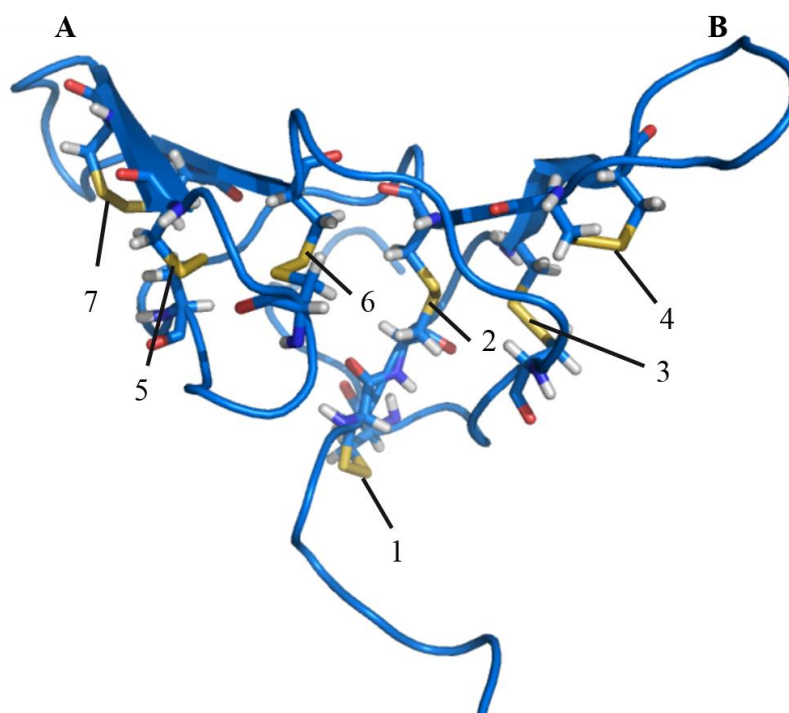


Figura 11: Estrutura tridimensional do inibidor de proteases serínicas da família Bowman-Birk (*Lens culinaris*, PDB 2AIH). Em B está localizado o sítio ativo de ligação para Tripsina (Arg¹⁶), e em A, o sítio ativo de ligação para Quimotripsina (Tyr⁴²). As ligações dissulfeto estão representadas em amarelo (1: Cys⁸-Cys⁶¹; 2: Cys⁹-Cys²⁴; 3: Cys¹²-Cys⁵⁷; 4: Cys¹⁴-Cys²²; 5: Cys³¹-Cys³⁸; 6: Cys³⁵-Cys⁵⁰ e 7: Cys⁴⁰-Cys⁴⁸). Em azul está representada a estrutura tridimensional do inibidor.

Tabela 02: Principais Famílias de Inibidores de Proteases encontradas em Plantas.

Família	Massa (kDa)	Resíduos Cys	Protease-Alvo	Referência
STI Kunitz	21~22	4	Serino Proteases	Kunitz, 1945
Bowman-Birk	8~9	14	Serino Proteases	Bowman, 1946; Birk, 1963
Batata I e II	I – 8 II – 20~24	I – 1 II – 4	Serino Proteases; Proteinases Aspárticas e Cisteínicas	Ishikawa et al, 1994
Abóbora (Squash)	3~4	6	Serino Proteases	Wieczorek et al, 1985

Mostarda	7	8	Serino Proteases	Menegatti et al, 1992
Serpinas	39~43	ND	Serino Proteases	Laskowski e Kato, 1980
Cereais I e II (Barley)	I – 8 II – 16	10	Serino Proteases; α -amilase	Odani et al, 1986

ND – Não Definido;

2.6 Interação Enzima/Inibidor

Uma vez que os inibidores de proteases competem estritamente com os substratos pelos sítios reativos, estes ocupam o local de clivagem, não significando que permanecem intactos durante o processo de inibição. A maioria dos inibidores de proteases são clivados pelas proteases, só que a uma taxa de clivagem muito menor quando comparado com a taxa de clivagem dos substratos. Essa taxa de clivagem dos inibidores é de cerca de 10^7 à 10^9 vezes mais lentamente do que a de um substrato, os fragmentos resultantes são mantidos unidos pelas ligações dissulfeto e por uma rede interna de ligações de hidrogênio que se mantém estável mesmo após a clivagem do inibidor (Finkenstadt e Laskowski, 1965; Radisky e Koshland, 2002).

2.7 Inibidores de Proteases como Linha de Defesa em Plantas

As plantas produzem de uma série de metabólitos secundários, como defensinas, lectinas, tioninas, proteínas relacionadas à patogênese, inibidores de proteases serínicas, entre outros, constituem o arsenal defensivo das plantas (Buchanan et al., 2002).

Dentre toda a gama de moléculas que fazem parte do sistema de proteção das plantas contra o ataque de patógenos e herbivoria, talvez os componentes mais importantes de todos os mecanismos de proteção sejam proteicos. Esses mecanismos incluem enzimas (como por exemplo, quitinases, glucanases e amilases), além de inibidores e outras proteínas/peptídeos com atividade antimicrobiana (Fritg et al., 1998; Garcia-Olmedo et al., 1998). Dentre os principais mecanismos de defesa estão os compostos metabólicos e proteínas, que são produzidos de acordo com a necessidade da planta. Um desses mecanismos de defesa envolve a produção de inibidores de proteases,

os quais podem ser encontrados constitutivamente e, ainda, ser induzidos em resposta à um ataque (Figura 12) (Valueva e Mosolov, 2004). A ação dos inibidores nesses casos está intimamente ligada às suas propriedades anti-nutricionais. Em um dos mecanismos propostos, eles atuariam reduzindo a digestão das proteínas da dieta dos insetos pela inibição direta das enzimas digestivas desses predadores, que morreriam por inanição. Um exemplo é um estudo realizado por Cheng e Xue, em 2003, eles mostraram que a ingestão de inibidores causa uma significativa elevação dos níveis de tripsina no estômago dos insetos e, por isso, propuseram que o verdadeiro modo de ação dos inibidores seria causar a hiperprodução de tripsina, o que levaria o inseto à morte por danos causados ao aparelho digestivo numa espécie de autodigestão.

Os insetos utilizam as plantas como fonte de absorção de nutrientes, e, para isso, necessitam de enzimas presentes no seu trato intestinal para realizar a quebra do alimento e assim adquirir os aminoácidos de que precisam para seu desenvolvimento. As larvas de lepidópteros apresentam principalmente enzimas da família das proteases serínicas, enquanto os coleópteros apresentam enzimas da família das proteases cisteínicas (Schuler et al., 1998; Hilder e Boulter, 1999) e aspárticas (Gatehouse et al., 1993; Lemos et al., 1990). O mecanismo de ação dos inibidores de serino-proteases no trato intestinal de insetos ainda não foi completamente elucidado, em parte devido ao fato observado de que a inibição direta das enzimas não parece o único fator decisivo para controle desses insetos. Um outro fator que pode estar envolvido é a hipersecreção de enzimas digestivas no trato intestinal, isso devido a inibição das enzimas, o que produziria uma diminuição dos aminoácidos essenciais (Gatehouse et al., 1993).

A concentração de inibidores de proteases (IPs) em folhas são geralmente baixos, entretanto uma vez que, a planta atacada por insetos ou agentes patogênicos, pode desencadear ativamente altos níveis de produção de IPs direcionado ao combate do estresse presente (Bhardwaj et al., 2014). Os IPs são encontrados em todas as formas de vida, no entanto, são mais estudados em famílias de plantas como Fabaceae, Poaceae e Solanaceae, sendo detectadas em órgãos vegetativos, reprodutivos e de reserva (Macedo et al., 2009)

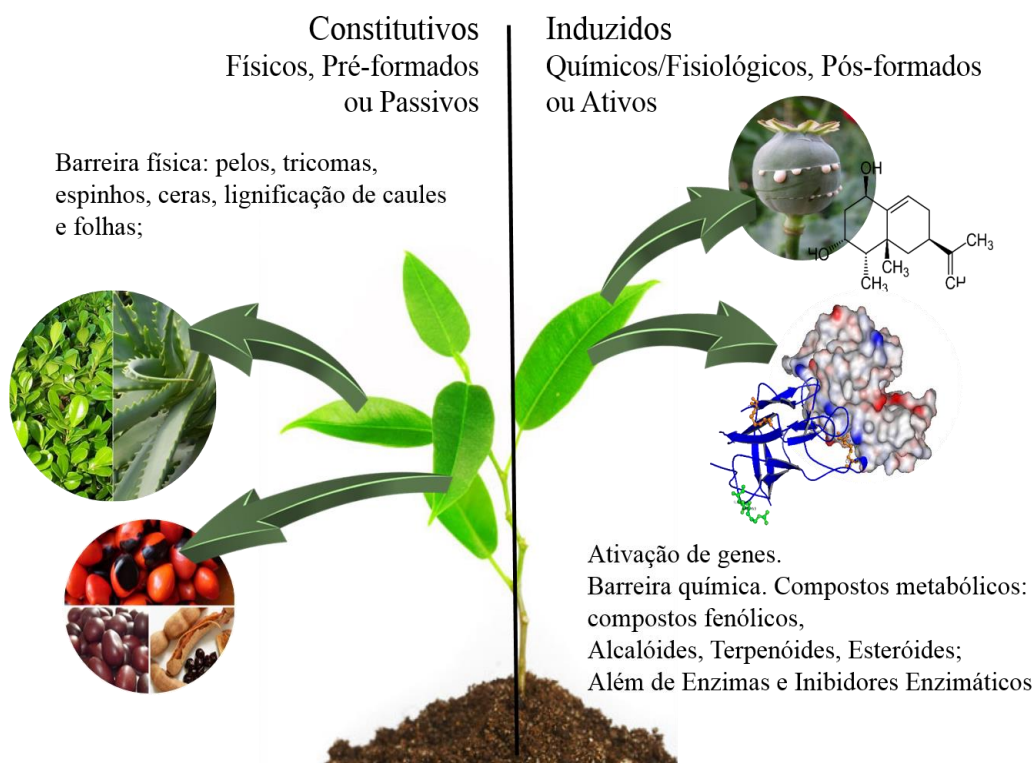


Figura 12: Esquema dos mecanismos de defesa constituídos e induzidos presentes em plantas.

2.8 Inibidores em Tubérculos, raízes tuberosas e caules subterrâneos

Os inibidores de protease geralmente são encontrados em tecidos de reserva, como no das plantas, principalmente em tubérculos e sementes, podendo representar de 5 – 15% das proteínas totais desses tecidos de reserva (Mossolov e Valueva, 2005). Vários fatores antinutricionais estão presentes em tubérculos. Os principais tubérculos cultivados em países de clima tropical são a mandioca (*Manihot esculenta*), o nhamê (*Dioscorea esculenta*), batatas (*Solanum tuberosum*; *Ipomea batatas*) e algumas representantes da família Araceae (*Amorphophalus campanulatus*; *Colocasia esculenta*; *Xanthosoma sagittifolium*). Esses tubérculos provêm uma importante fonte de energia, principalmente de carboidratos, mas esses tecidos de reserva possuem ainda compostos, entre eles os inibidores de proteases, que reduzem o valor nutritivo desses alimentos “*in natura*” limitando sua utilização como alimento, prejudicando a digestão do amido e demais proteínas (Prathibha et al. 1995).

Em babata, são encontradas várias famílias de inibidores de proteases, as quais já foram estudados nesse tubérculo e os inibidores encontrados foram

agrupados dentro das respectivas famílias. As famílias de inibidores de proteases encontradas em batata são os inibidores tipo Kunitz, inibidores Bowman-Birk e os inibidores Batata I e II (Heibges et al. 2003).

Em cenoura, há descrição na literatura, de inibidores encontrados por meio de um homogenato de células de cultura de cenoura, que apresentaram atividade de inibição contra a enzima tripsina (valores de atividade inibitória de aproximadamente 60 %) e que, em análises realizadas através de eletroforese em condições redutoras, foi possível detectar uma banda de massa aproximada de 12,800 Da (Carlberg et al., 1987). Há também nesse tubérculo a presença de inibidores glicoproteicos extracelulares dérmicos (EDPG) cuja atividade específica é a inibição da enzima xiloglucanase, especificamente a inibição de enzimas endo- β -1,4-glucanase. Os inibidores EDPG são proteínas de média massa molecular, possuindo cerca de 48 – 50 kDa (Shang et al., 2005).

O açafrão (*Curcuma longa* L) possui uso como agente aromatizante no preparo de alimentos. Principalmente produzido na Índia e Malásia, sua aplicação vai além da comercialização como iguaria (Goel et al., 2008). A curcumina é um composto extraído dos rizomas de *C. longa* e que possui propriedades antifúngicas e anti-inflamatórias (Apisariyakul et al., 1995; Lantz et al., 2005), mas que recentemente tem sido comprovada atividades antitumorais, antibacterianas, anti-HIV, nematicida e propriedades antioxidantes (Selvam et al., 1995; Araújo e Leon, 2001; Jayaprakasha et al., 2005). Há na literatura descrito para os rizomas de *C. longa*, trabalhos de caracterização de inibidores da família fitocistatinas, com massa aproximada de 23 kDa, (Seon-Neng et al., 2014) nos quais atuam sobre o sítio catalítico de cisteíno proteases.

Nos representantes da família *Brassicaceae* (nabo, rabanete e colza) são relatados estudos de inibição de enzimas da classe das serino-proteases, mas esses estudos se baseiam na utilização das sementes produzidas pelas plantas dessas famílias para extração dos inibidores, e não há até o momento, algum estudo que descreva a utilização do tubérculo de *Brassica rapa* L. (nabo) e rabanete (*Raphanus sativus*) como fonte de inibidores de protease (Broadway, 1995).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- Avaliar a fração rica de inibidores de presente no rizoma de *Maranta arundinacea* L. com atividade antitriptica *in vitro* frente a peptidases de *S. frugiperda*.

3.2. Objetivos Específicos

- Extrair em tampão aquoso (Tris-HCl) os inibidores presentes em *M. arundinacea*.
- Determinar *in vitro* a presença de inibidores de proteases serínicas no extrato dos rizomas de *M. arundinacea* L.
- Analisar o perfil de massas moleculares do EB e da fração rica em inibidores (FR) de *M. arundinacea* por SDS-PAGE e Mass spec;
- Purificar por meio de técnicas cromatográficas a fração inibidora;
- Caracterizar estabilidade térmica para os inibidores presentes nos rizomas de *M. arundinacea* L.;
- Avaliar a taxa de citotoxicidade da FR por porcentagem de hemólise;
- Caracterizar a taxa de atividade proteolítica do homogenato intestinal de *S. frugiperda* frente ao substrato BApNA;
- Determinar a concentração de inibição mínima da fração rica de *M. arundinacea* que inibe 100% da atividade proteolítica do homogenato intestinal de *S. frugiperda*;
- Determinar a concentração de inibidores que inibem 50% da ação enzimática (IC₅₀), tanto para enzima comercial (tripsina pancreática bovina) quanto para homogenato intestinal de *S. frugiperda*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Preparo das amostras e obtenção do Extrato Bruto (EB)

Os rizomas frescos de *M. arundinacea* L. foram coletados no município de Sidrolândia, MS, e exsicata depositada no herbário da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Os rizomas, com pouco mais de dois anos de cultivo, foram higienizados em água corrente com posteriores lavagens em água deionizada e submetidas à extração proteica ainda frescos por meio de trituração em mini-processador em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5, na proporção de 1:10 (p:v). As amostras foram realocadas em um erlenmeyer e homogeneizadas em mesa agitadora à 135 rpm em temperatura ambiente *overnight*. O EB foi filtrado em funil de vidro com algodão para remoção das fibras e demais partículas maiores do solvente. O extrato filtrado foi dividido em alíquotas de 35 mL em tubos de polietileno e centrifugadas à 10000 rpm por 30 min à 4 °C. O sobrenadante foi armazenado em frascos de vidro âmbar e conservados em freezer à -20 °C até posteriores análises.

4.2. Fracionamento em Sulfato de Amônio, Diálise e Liofilização

Os extratos proteicos totais de *M. arundinacea* foram precipitados em Sulfato de Amônio segundo metodologia descrita por Burgess (2009) nas faixas de saturação inicial-final de 0-30 (F1); 30-60 (F2) e 60-100% (F3) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Após a adição do sal, as amostras foram homogeneizadas em agitador magnético à 4 °C *overnight*, distribuídas em tubos de polietileno e posteriormente centrifugadas a 10000 rpm por 10 min à 4 °C. O precipitado respectivo de cada fração foi coletado, dialisado em membrana de nitrocelulose (*cutoff* 200~500 Da) com consecutivas trocas de água destilada em um período de 24h à 4 °C até estabilização do pH em 7,5 e concentradas por meio de liofilização. As frações respectivas de cada faixa de saturação foram

denominadas F₁ para faixa de 0-30, F₂ para a faixa de 30-60 e F₃ para a faixa de 60-100% de saturação de (NH₄)₂SO₄.

4.3. Determinação da Concentração Protéica por método de Bradford

O EB obtido do rizoma, os fracionados em (NH₄)₂SO₄ e a fração rica em inibidores (FR) tiveram a concentração proteica determinada pelo método descrito por Bradford (1976), utilizando como método comparativo a curva de soroalbumina bovina, com as respectivas concentrações de curva: 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12 e 1,56 µg.mL⁻¹, em comprimento de onda 595 nm com valor de R² igual ou superior a 0,95.

4.4. Análise do Perfil Proteico por Eletroforese em SDS-PAGE

Os géis de SDS-PAGE 12% foram confeccionados segundo a metodologia proposta por Laemmli, 1970 (Gel de separação 12%: H₂O milli-Q; acrilamida 30%, N,N'-Metileno Bis-bisacrilamida 0,8%; Tampão Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 + SDS 0,4 %; Persulfato de Amônio 10%; TEMED Ultra-Puro). Gel de empilhamento 5%: (H₂O milli-Q; acrilamida 30%, N,N'-Metileno Bis-bisacrilamida 0,8%; Tampão Tris-HCl 1 M pH 6,8 + SDS 0,4 %; Persulfato de Amônio 10%; TEMED Ultra-puro). Para aplicação no gel, as amostras foram diluídas em igual volume de tampão da amostra (Azul de bromofenol 0,2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5%, SDS 2,3%, Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8) recebendo tratamento térmico por 5 min à 100 °C em Banho-seco. O tampão de corrida foi preparado com adição de Glicina 192 mM, Tris 25 mM e SDS 10%, pH 8,3. Os géis foram submetidos a corrente constante de 80 V (20 mA) por aproximadamente 2 horas. Após a eletroforese, os géis foram corados em solução de azul brilhante de Coomassie G-250 (Coomassie Brilliant Blue G-250, Metanol, Ácido acético e água destilada), descorados com sucessivas lavagens em água destilada e posteriormente scaneados.

Padrão de massas moleculares: 205 kDa miosina; 116 kDa β-galactosidase; 97 kDa fosforilase b¹; 80 kDa transferina; 66 kDa BSA; 55 kDa glutamato deidrogenase; 45 kDa ovoalbumina; 30 kDa anidrase carbônico; 21 kDa inibidor de tripsina; 14 kDa lisozima e 6,5 kDa aprotinina.

4.4.1. Revelação por Nitrato de Prata

Para aumentar a resolução visual das bandas proteicas, os géis foram submetidos à revelação em nitrato de prata (Blum; Beier; Gross, 1987). Inicialmente, os géis permaneceram imersos por 2 h à temperatura ambiente em solução fixadora (etanol 40% v:v e ácido acético 10% v:v). Após esse período, os géis foram lavados em solução de etanol 50% (v:v) 3 vezes, com duração de 5 min a cada lavagem. Em seguida, foi adicionada a solução sensibilizadora de tiosulfato de sódio 0,01 N, no qual foi mantida por 1 min em contato com os géis, sob agitação branda. Em sequência, foram realizadas três lavagens dos géis em água ultra-pura, com tempo médio de 20 s por lavagem, sendo posteriormente adicionadas nos géis a solução de nitrato de prata (125 mg de AgNO_3 + 50 μL de formaldeído 37% v:v em volume final de 100 mL de água ultra-pura), e a incubação mantida sob agitação branda por 20 min protegidas do excesso de luz. Decorrido o tempo, os géis foram submetidos a três lavagens de 20 s cada em água ultra-pura e, em seguida, incubadas em solução reveladora dos géis (1,875 g de carbonato de cálcio, 31,75 μL de formaldeído 37% v:v + 1 mL da solução sensibilizadora, completando um volume final de 100 mL) em agitação branda até o aparecimento das bandas proteicas. A reação de revelação foi interrompida pela adição de solução de glicina 0,5% (v:v) e os géis foram incubados novamente em solução fixadora.

4.5. Análise do Perfil Proteico por Espectrometria de Massa - MALDI/ToF

Ionização/Dessorção da matriz assistida por laser – Espectrômetria de massas por tempo de voo foi realizada com as amostras purificadas por cromatografia de afinidade, liofilizadas e resuspendidas em solução de acetonitrila, água ultra-pura e TFA (50% / 50% / 0,1%). As amostras foram misturadas em uma solução saturada de cada uma das respectivas matrizes: matriz constituída ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, ácido sinapínico e Super DHB (proporção de 1:1 v/v), depositadas em placas do tipo *MTP 384 massive* e secas em temperatura ambiente. As massas moleculares da amostra foram determinadas, utilizando um espectrômetro de massa tipo MALDI-ToF Autoflex III Smart-beam (Bruker Daltonics). A calibração foi realizada utilizando insulina como padrões de massa molecular. Os valores experimentais obtidos pelas análises do espectrômetro de massa foram comparados com as bandas observadas na eletroforese por SDS-PAGE.

4.6. Determinação da Atividade Antitriptica

4.6.1. Substrato Azocaseína

O ensaio foi realizado com a adição de alíquotas de 3,0 μL de solução de tripsina bovina ($0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$) eluída em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 com variação de sete concentrações de extrato bruto, juntamente com mais 120 μL de 2,5 mM de HCl e adição de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 completando um volume reacional inicial de 500 μL . A reação foi incubada por 12 min à 37 °C, e, após esse período, a reação foi iniciada com a adição de 200 μL de 1% de azocaseína, permanecendo por mais 20 min em banho-maria à 37 °C. A reação foi interrompida com adição de 300 μL de solução de 20 % de TCA, com posterior adição de azocaseína nos tubos dos testes em branco, e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. Alíquotas de 500 μL foram dispensadas em novos tubos e os produtos resultantes do ensaio foram alcalinizados com a adição de 500 μL de 2 N de NaOH. A absorbância foi monitorada à 440 nm em espectrofotômetro. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A solução de tripsina foi preparada há uma concentração de $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ eluída em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 com soluções de trabalho diluídas há uma concentração de $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$. Todas as soluções permaneceram congeladas a -20 °C até momento do uso. A azocaseína 1% foi preparada pesando 1,0 g do substrato liofilizado com adição de 80 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,5. A solução foi aquecida em micro-ondas até total solubilização do substrato, sem deixar levantar fervura, e, depois de diluída, o volume final da solução foi completado para 100 mL e armazenado à -20 °C até o momento do uso.

4.6.2. Substrato BApNA

Para realização do ensaio antitriptico, utilizando substrato específico BApNA (N α -Benzoil-L-Arginine-4-nitroanilide hydrochloride), alíquotas de 3,0 μL de solução de tripsina bovina a $0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$ eluídas em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 foram adicionadas a sete concentrações diferentes do extrato bruto de *M. arundinacea*, incubadas em banho-maria à 37 °C durante 10 minutos. Decorrido o período, a reação com iniciada com a adição de 250 μL

de solução de BApNA (1,25 mM), com permanência de mais 15 minutos em banho maria à 37 °C. A reação foi então interrompida com a adição de ácido acético 30% (v:v) e os fragmentos solúveis resultantes da hidrólise do substrato foram monitorados em comprimento de onda de 410 nm em espectrofotômetro. Todos os testes foram realizados em triplicata.

O substrato BApNA 1,25 mM foi preparado, pesando 5,43 mg posteriormente diluído em 100 µL de DMSO com adição de 9,9 mL de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 fechando um volume final de solução de 10 mL. O substrato foi dividido em alíquotas de 1,25 mL e armazenado à -20 °C até posteriores experimentos.

4.6.3. Determinação da Porcentagem de Inibição enzimática

As porcentagens de inibição sobre a enzima foram calculadas comparando-se a absorbância das amostras (ensaio contendo extrato + enzima + substrato) com a do controle da enzima (ensaio contendo tampão + enzima + substrato). Os valores correspondentes à absorbância do controle da enzima forneceram o referencial da atividade máxima da enzima utilizada para a realização dos experimentos, ou seja, refere-se à capacidade máxima da enzima para a formação dos produtos a partir de seus substratos, tendo sido considerada a atividade da enzima igual a 100%. Dessa forma, as porcentagens de inibição da enzima foram calculadas de acordo com a seguinte equação: % Inibição = $[(C-A) \times 100]/C$, onde: C representa a absorbância do controle da enzima, subtraída do branco do ensaio e A representa a absorbância da amostra subtraída do branco do extrato (extrato vegetal + substrato + tampão).

4.6.4. Determinação do IC₅₀

A concentração dos inibidores de *M. arundinacea* que inibe 50% da atividade da tripsina (IC₅₀) foi determinada pela construção de uma curva de inibição que relaciona a porcentagem de inibição e a concentração dos inibidores. Para a construção da curva, alíquotas com concentrações crescentes do inibidor (0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,50 µM) foram incubadas com alíquotas de 3 µL (0,45 µg) da enzima comercial tripsina. O percentual de inibição da atividade da tripsina para cada concentração do

inibidor foi utilizada na construção de uma curva de titulação e determinação do IC_{50} .

4.7. Ensaio Hemolítico

O sangue utilizado para o experimento foi obtido através de um voluntário colaborador do laboratório. O sangue doado foi armazenado em geladeira, mantido a temperatura de 4 °C até o início do ensaio. O sangue foi centrifugado à 3000 rpm a 20 °C por 10 minutos, sendo o plasma descartado para o teste. O precipitado de eritrócitos foi lavado 3X em igual volume de solução estéril de PBS 0,5%. Após a lavagem, alíquotas de 100 µL de eritrócitos foram distribuídos em placa de 96 poços, em triplicata, com adição de mesmo volume das soluções para determinação de hemólise: PBS 0,5% nos poços do teste para 0% de hemólise, solução de 2% de Triton-X100 nos poços do teste para 100% de hemólise e variação de sete concentrações diferentes do extrato bruto e material purificado para avaliação da porcentagem de citotoxicidade. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.8. Cromatografia de Afinidade Trypsin-Sepharose CNBr 4B

Para purificação dos inibidores de serino proteases de *M. arundinacea*, 10 mg da fração F₂ foram aplicados em uma coluna de afinidade, resina Sepharose 4B ativada com CNBr (4,0 cm x 1,1 cm), acoplada com tripsina, eluída em tampão 0,1 M de NaHCO₃ pH 8,3 contendo 0,5 M de NaCl (50 mg de enzima por grama de resina liofilizada), conforme especificação do fabricante. A resina foi equilibrada em dez volumes de coluna em solução de 0,05 M Tris-HCl pH 7,5 anterior a aplicação da amostra, e eluída em cinco volumes de coluna do mesmo tampão para remoção do material não retido. Para retirada do material retido ao complexo enzima-resina, a coluna foi lavada em solução de 0,005 M de HCl. Alíquotas de 2,5 mL foram coletadas em uma vazão volumétrica de 50 mL·h⁻¹. A mensuração das proteínas presentes em cada um dos materiais (retido e não retido) foi determinado pelas leituras de absorbância à 280 nm em espectrofotômetro. As amostras de maior concentração do material retido foram então reunidas em tubos de poliestireno de 50 ml, concentradas por meio de liofilização, resuspendidas em tampão Tris-HCl 50

mM pH 7,5 e aplicadas nos géis de 12% SDS-PAGE. As frações obtidas foram testadas quanto a atividade inibitória frente a tripsina.

4.9. Ensaio de Estabilidade Térmica

Para investigação da estabilidade térmica, a fração rica em inibidores ($0,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para cada ensaio) foi submetida a uma variação térmica em um gradiente crescente de 5 a 95 °C com aumentos regulares de temperatura de 5 °C a cada 30 min de incubação. Após o ensaio de variação térmica, a amostra permaneceu à temperatura ambiente durante 30 min para verificar se as modificações estruturais sofridas devido a ação da temperatura eram reversíveis. As amostras foram submetidas posteriormente a ensaio enzimático (idem método 4.7.2.) frente a tripsina após o tratamento térmico.

4.10. Homogenato do trato digestivo de *Spodoptera frugiperda*

As larvas entre 5º e 6º instar de *S. frugiperda* foram inicialmente anestesiadas em banho de gelo à $\pm 0,2$ °C e posteriormente dissecadas com auxílio de pinça e bisturi, fixadas sobre placas de polipropileno expandido para remoção total do intestino (Figura 13), no qual, após serem removidos, foram armazenados em solução de Tris-HCl 50 mM pH 7,5 dentro de tubos do tipo falcon em banho de gelo até o momento da obtenção do macerado.

O homogenato intestinal foi preparado por meio de maceração do intestino das lagartas em cadinho com auxílio de pistilo em banho de gelo até total fragmentação do tecido. Em seguida, o homogenato foi centrifugado à 8944 g x por 15 min à 4 °C, o sobrenadante foi coletado, quantificado pelo método de Bradford (1976), distribuído em alíquotas de 1 mL e submetidos à ensaio enzimático (idem método 4.7.2.) para estabelecimento de um padrão de atividade das enzimas presentes no extrato.

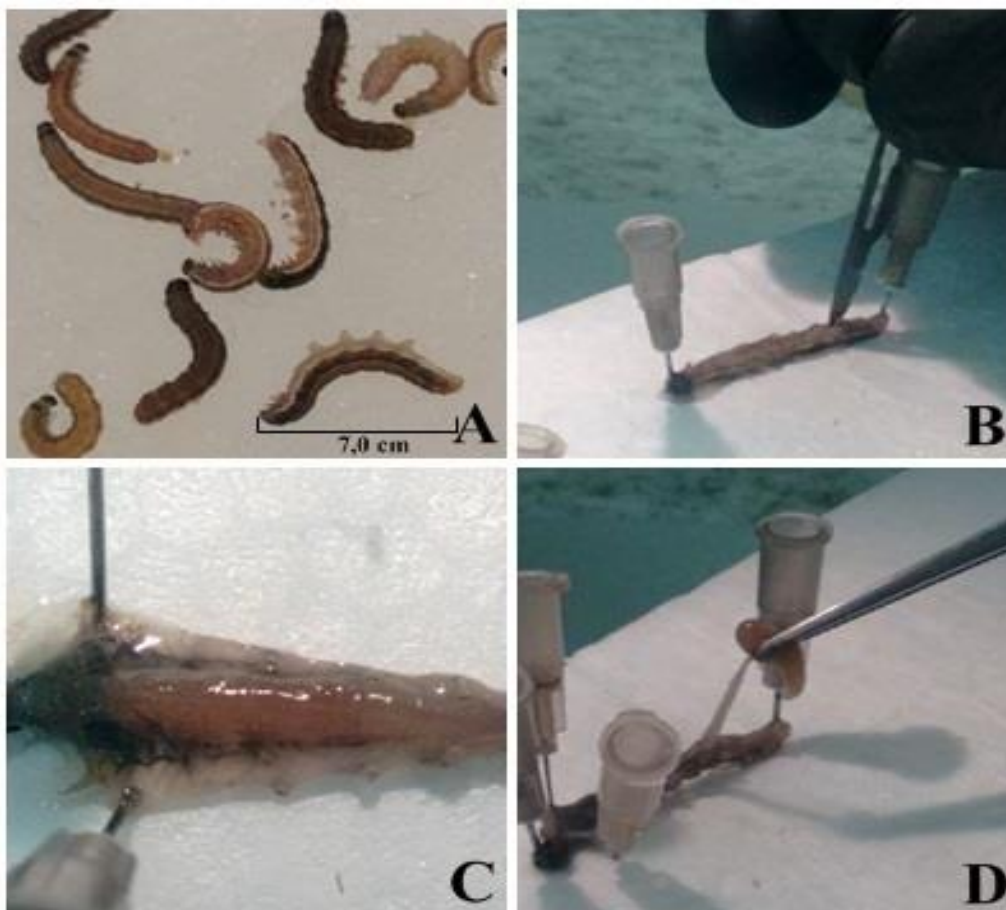


Figura 13: Esquema de retirada do intestino de *S. frugiperda* para obtenção das enzimas intestinais através do homogenato. A: lagartas de 5º instar acomodadas em placa de petri e anestesiadas em banho de gelo ($\pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$); B: excisão lateral do tegumento afim de expor a porção do trato intestinal; C: exposição total do intestino de *S. frugiperda* e D: retirada da porção intestinal e posterior armazenamento em tampão Tris-HCl 50 mM pH $7,5 \pm 4,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.10.1. Ensaio de Inibição do Homogenato Intestinal de *S. frugiperda*

O ensaio foi conduzido após estabelecimento de um padrão de atividade para o homogenato intestinal de *S. frugiperda*. Alíquotas de $1\text{ }\mu\text{L}$ do homogenato ($0,15\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram incubados com dez concentrações crescentes ($0,005$; $0,012$; $0,025$; $0,05$; $0,1$; $0,2$; $0,4$; $0,8$; $2,0$ e $4,0\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) da fração rica de inibidores de *M. arundinacea* obtida em cromatografia de afinidade. As amostras foram incubadas com o homogenato em um volume reacional inicial de $500\text{ }\mu\text{L}$ por 10 min à $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ em banho maria. Decorrido o tempo, a reação foi iniciada com adição de $250\text{ }\mu\text{L}$ de substrato BApNA nos tubos de ensaio das triplicatas. O ensaio permaneceu incubado por 20 min e, decorrido o período, as amostras foram retiradas do banho e as reações foram interrompidas pela adição de $60\text{ }\mu\text{L}$ de solução de ácido acético 30% (v:v) em

todos os tubos do ensaio e então, adicionado substrato nos tubos de provas em branco. Os fragmentos resultantes da hidrólise do substrato pelo homogenato de *S. frugiperda* foi monitorado a comprimento de onda de 410 nm. O padrão de inibição foi calculado em comparação com padrão de atividade enzimática obtido no ensaio realizado somente com o homogenato intestinal.

5. RESULTADOS

Os géis confeccionados a 12% de acrilamida apresentaram um perfil de 6 bandas protéicas provenientes do extrato bruto dos rizomas de *M. arundinacea* (Figura 14). Desse total, duas bandas específicas de massas aproximadas de 10 a 25 kDa, destacando a faixa das proteínas de interesse de acordo com a literatura para os inibidores de proteases serínicas. Na precipitação com sulfato de amônio, a fração F₂ apresentou massas moleculares de aproximadamente 10 a 35 kDa, com a predominância da banda de massa molecular de aproximadamente 25 kDa o que sugere uma maior concentração da possível família de inibidores tipo Kunitz nessa faixa de saturação.

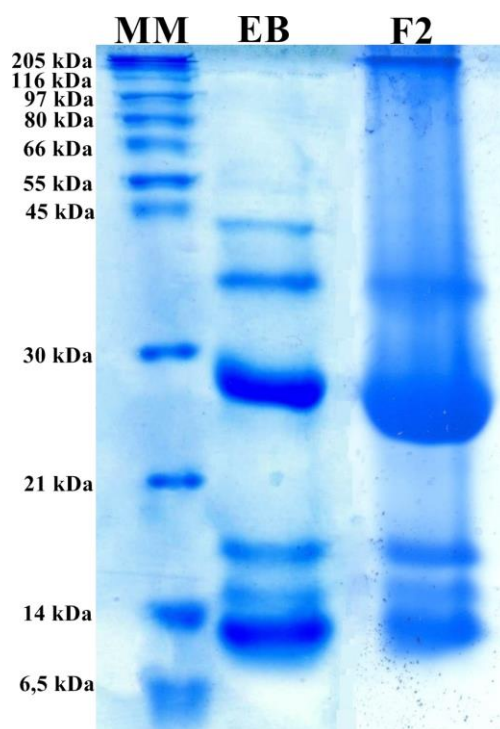


Figura 14: Análise eletroforética em SDS-PAGE apresentando o perfil proteico total de MM= Marcador Molecular; EB= Extrato Bruto rizoma *M. arundinacea* L. F2: precipitação por sulfato de amônio das amostras extraídas dos rizomas de *M. arundinacea* em tampão Tris-HCl 50mM pH 7.5 na proporção de saturação de 30-60%.

Nos ensaios de inibição da atividade da tripsina utilizando o EB dos rizomas de *M. arundinacea*, a partir da concentração de $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de proteínas totais do extrato, foi possível observar 83% de inibição com a utilização de azocaseína, com desvio padrão de $\pm 3,02\%$, e 100% de inibição com a utilização do substrato específico, à uma concentração de $0,60 \mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizada para o teste com BApNA, com desvio padrão de aproximadamente 15% (Figura 15). Isso indica que possivelmente os rizomas de *M. arundinacea* possam conter inibidores de proteases, com atividade sobre enzimas da família das serino-proteases, por se tratar de um tecido de reserva, e, conseqüentemente uma fonte de energia rica em carboidratos, cujos rizomas dessa planta possuem em abundância, talvez esse possa ser um dos modos de defesa da planta contra predação de algum inseto ou patógeno presente nos solos.

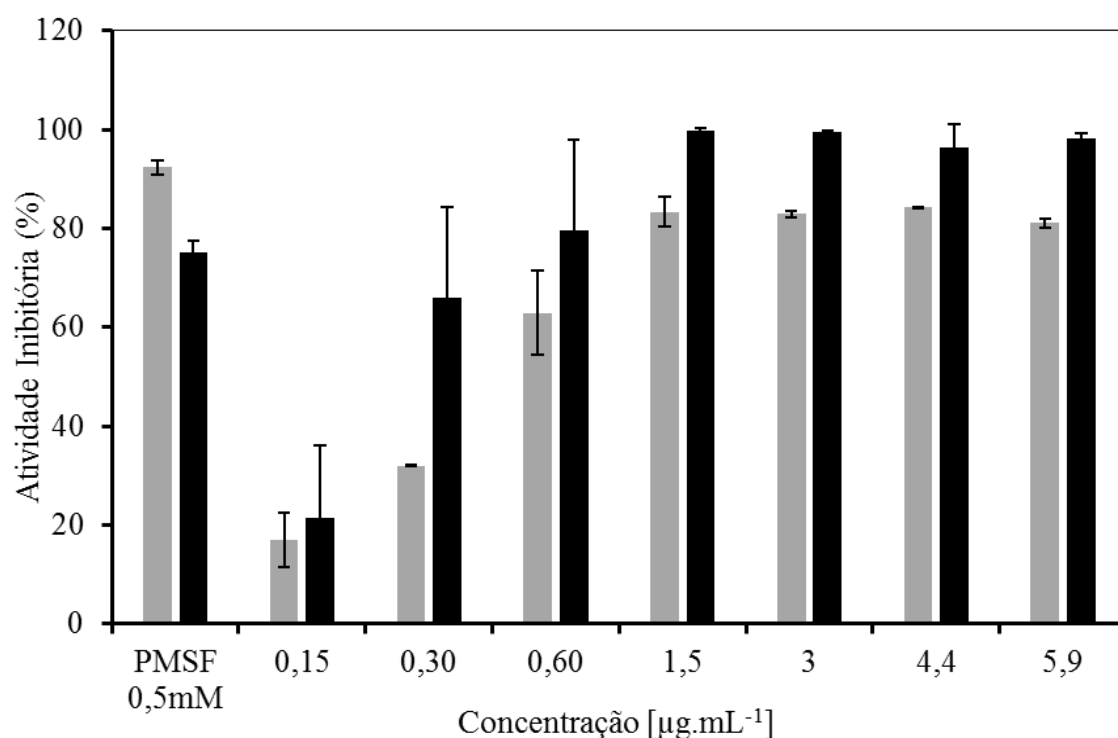


Figura 15: Porcentagem de inibição da atividade triptica frente ao EB obtido dos rizomas de *M. arundinacea* L. em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5. Foram utilizados para o teste os substratos BApNA 1,25 mM (Colunas em preto) e Azocaseína 1% (colunas em cinza). Foi utilizado o inibidor específico da atividade triptica (PMSF) como padrão de inibição, com concentração de enzima constante para ambos os testes (0,15 mg.mL⁻¹). Foram testadas sete concentrações exponencialmente crescentes do EB.

No fracionamento do EB de *M. arundinacea* por sulfato de amônio, na faixa de saturação de F2, foi onde apresentou maior concentração do inibidor de proteases serínicas (Figura 16). Nos ensaios de inibição da tripsina utilizando a F2 com ambos os substratos, a maior porcentagem de inibição foi de 78% a uma quantidade de 1,5 µg utilizado para o teste com substrato azocaseína 1%, com desvio padrão de $\pm 2,0\%$, e inibição total da atividade enzimática para todas as concentrações testadas de inibidor utilizadas para os ensaios com o substrato específico BApNA, com desvio padrão máximo constatado de $\pm 5,0\%$ (Figura 16).

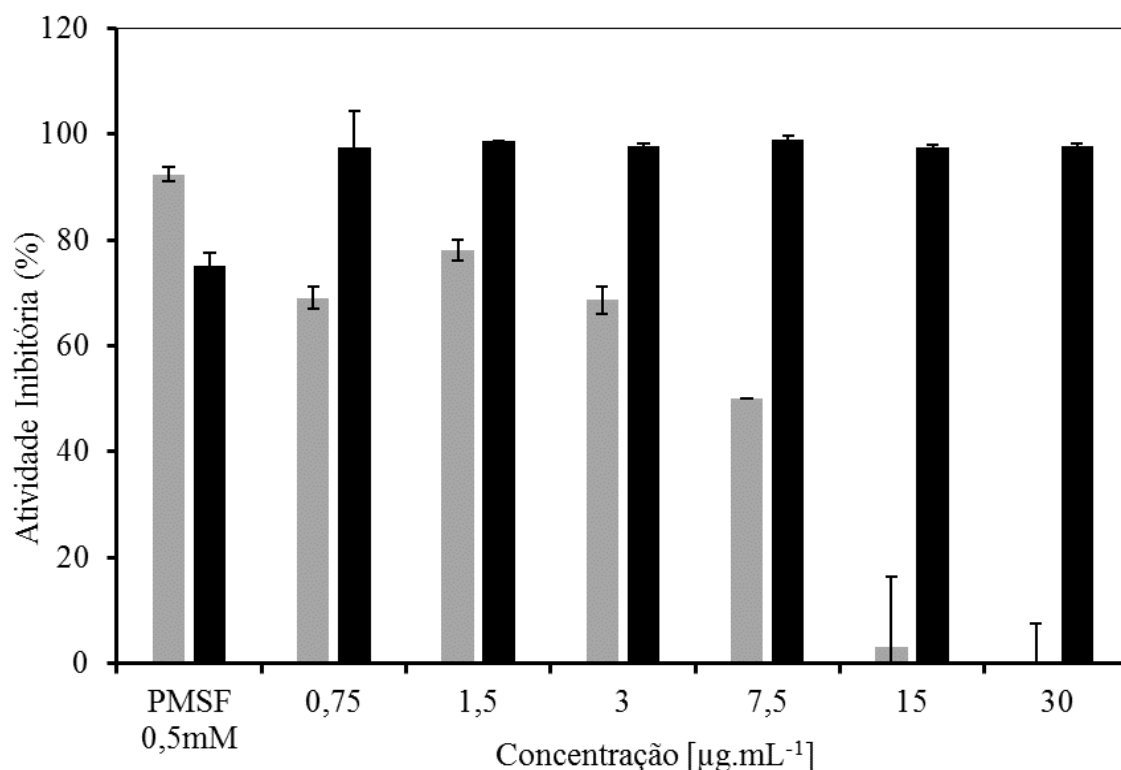


Figura 16: Porcentagem da atividade inibitória da enzima tripsina ($0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$) utilizando os substratos azocaseína 1% (colunas em cinza) e BApNA $1,25 \text{ mM}$ (colunas em preto). Foi utilizado o inibidor específico da atividade triptica (PMSF) como padrão de inibição, e seis concentrações diferentes da fração F2, obtida com a utilização de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. O EB de *M. arundinacea* L foi diluído à uma concentração 300 µg.mL^{-1} para trabalho.

Nos ensaios de inibição com os fracionados F1 e F3 utilizando somente como substrato azocaseína 1%, foram observadas taxas de inibição com menos de 50% de atividade inibitória da tripsina para F1. Para F3, os ensaios apresentaram inibição da atividade triptica muito além do esperado para essa última fração (F3) (Figura 17). A partir da concentração de $0,56 \text{ µg.mL}^{-1}$ utilizados no ensaio, há a inibição de mais de 80% da atividade da enzima, mantendo esse alto padrão de inibição nas concentrações seguintes. Esse resultado pode sugerir a existência de outra família de inibidores de protease presente no extrato, já que essas proteínas foram precipitadas em outra faixa de saturação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o que pode ser um indicativo de características estruturais diferentes das proteínas precipitadas em F2. Essas altas taxas de inibição, relacionadas à pequena massa molecular do inibidor em questão pode caracterizar essa proteína como pertencente à família de inibidores Bowman-Birk. Os ensaios com F3 indicam a presença de outra família de inibidores de

serino-proteases presente no EB feito dos rizomas de *M. arundinacea*, além da família dos inibidores tipo Kunitz na fração F2.

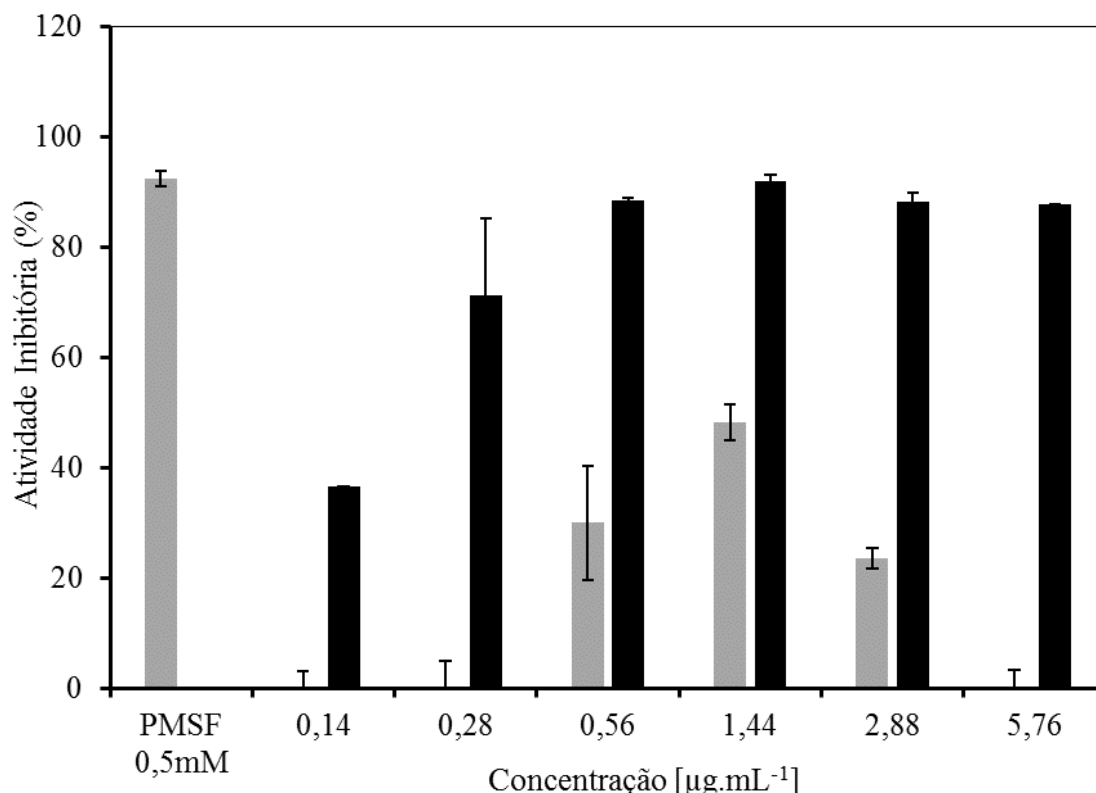


Figura 17: Porcentagem da atividade inibitória da enzima tripsina ($0,15 \text{ mg.mL}^{-1}$) com adição de seis concentrações de cada uma das frações F1 (colunas em cinza) e F3 (colunas em preto) utilizando o substrato azocaseína (1%).

O material fracionado em Sulfato de Amônio e testado quanto a atividade antitriptica, foi submetido a caracterização molecular por espectrometria de massas em matriz Super-DHB utilizando um sistema de ionização a laser MALD-ToF. Os íons gerados através da análise são apresentados conforme a Figura 18. Na imagem, são visualizados cinco íons, cada um com massa respectiva de 11734,6 ; 15,395,8 ; 23722,2; 30734,0 e 42518,4 Da. Dessa totalidade, dois íons se apresentam dentro das massas respectivas para inibidores de serino-proteinases, conforme literatura revisada, cujos quais são os íons de 11734,6 Da, correspondente à massa aproximada de inibidores da família Bowman-Birk, e 23722,2, referente à massa de inibidores da família Kunitz.

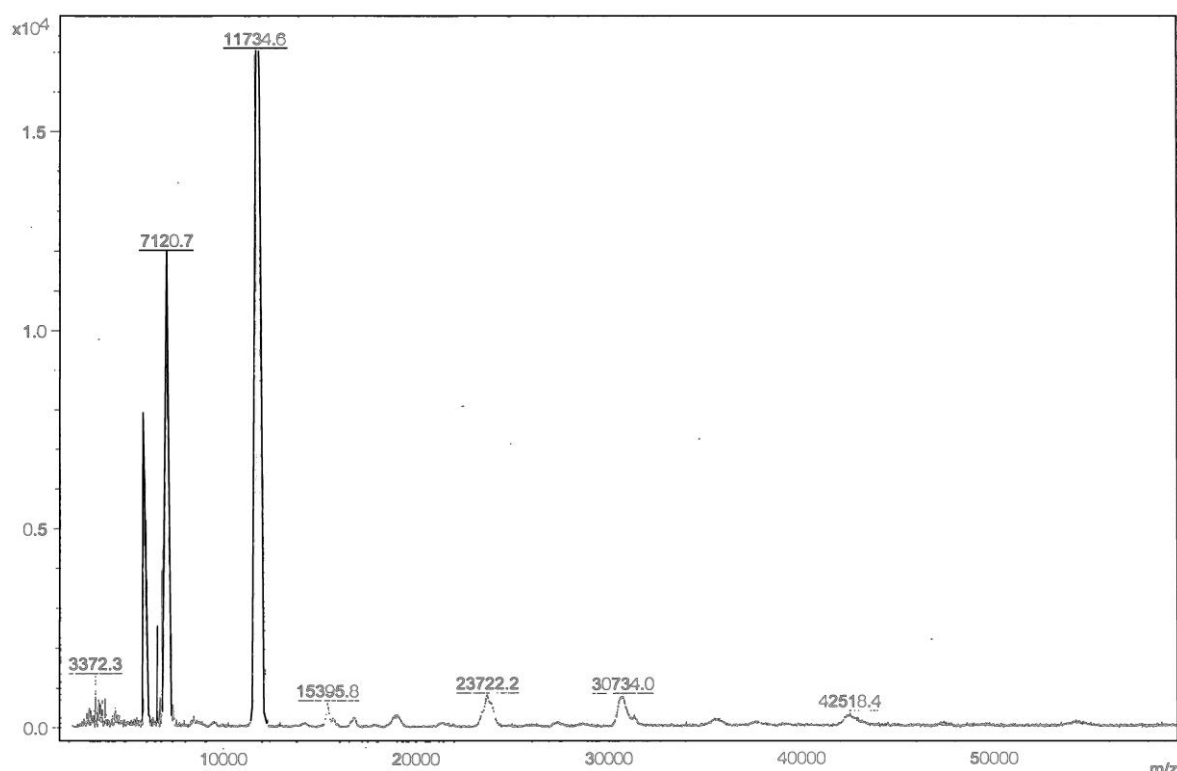


Figura 18: Perfil das massas moleculares da fração F2 por sistema MALD-ToF utilizando matriz Super-DHB.

A cromatografia de afinidade em resina Tripsina-Sepharose possibilitou isolar os inibidores de proteases presentes no extrato proteico dos rizomas de *M. arundinacea*, através da eluição da fração saturada em F2 de Sulfato de amônio, determinada de F2, em resina de afinidade Tripsina-Sepharose 4B. A maior parte das proteínas contidas em F2, passaram diretamente pela coluna através da eluição da resina em tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5.

Em todos os gráficos gerados por meio do processo de isolamento dos inibidores de proteases por cromatografia de afinidade (Figura 19), após a total remoção da fração não-retida ao complexo Tripsina-Sepharose, o tempo médio de remoção da fração retida apresentou início aos 50 minutos e finalização aos 72 min após o início da cromatografia. A solução de desacoplamento da fração retida na matriz, composta por HCl 50 mM apresentou boa eficiência para remoção, as frações retidas resultantes da cromatografias foram agrupadas, liofilizadas, aplicadas nos géis de 12% SDS-PAGE (Figura 20) e testadas quanto a atividade inibitória frente a enzima tripsina (Figura 21).

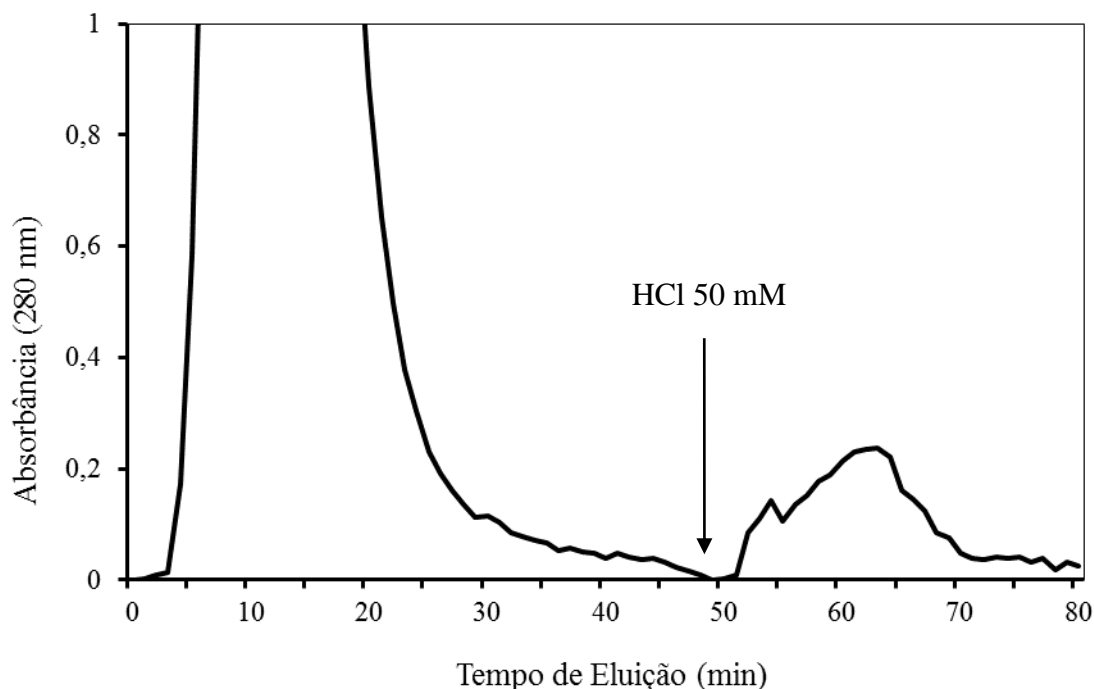


Figura 19: Perfil cromatográfico da F2 extraído dos rizomas de *M. arundinacea*, material retido por cromatografia de afinidade em Tripsina-Sepharose 4B. A solução de eluição utilizada foi HCl à uma concentração de 50 mM à uma taxa de fluxo de 50 mL.h⁻¹.

A fração purificada de inibidores, através de cromatografia de afinidade, foi eluída em igual volume de tampão da amostra 2X, desnaturadas por aquecimento e aplicadas aos géis de SDS-PEGE 12,5%. No gel (Figura 20), é possível visualizar a presença de três bandas proteicas na FR por cromatografia de afinidade. A primeira banda possui massa aparente entre 25 a 28 kDa, a segunda possui massa aparente de 45 kDa e a última possui massa de aproximadamente 55 kDa, conforme indicado através do marcador proteico utilizado.

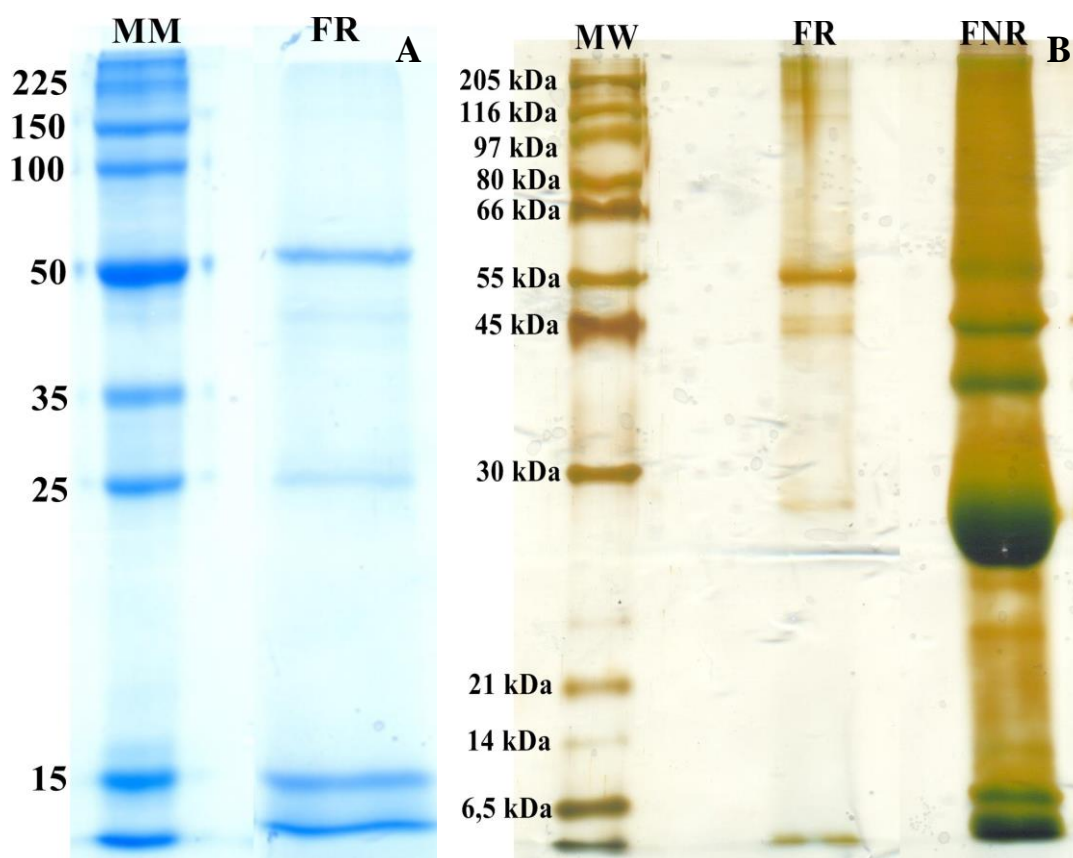


Figura 20: Eletroforese em SDS-PAGE 12% corado com *Coomassie Brilliant Blue* (em A) e revelado com nitrato de prata (em B) do extrato dos rizomas de *M. arundinacea* isolados por cromatografia de afinidade em resina Sepharose 4B acoplada com tripsina. Análise das frações retida (FR) e não-retida (FNR) em comparação com o padrão de massas moleculares (MM) para obtenção da massa equivalente da fração inibidora contida no extrato.

Nos ensaios realizados utilizando o material retido na matriz da resina Tripsina-Sepharose, denominado como fração rica em inibidores de *M. arundinacea* (FR), para elaboração da curva de inibição, foram utilizadas nove variações de concentração crescentes da FR, onde as concentrações de 1,2 e 1,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ testadas para o ensaio resultaram em 100% de inibição da enzima, conforme apresentado pelo gráfico (Figura 21). As concentrações de 0,5 e 0,65 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizadas para elaboração da curva apresentaram taxa de inibição de 79,29% e 85,88% respectivamente. As demais concentrações testadas no ensaio (0,3; 0,15; 0,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram porcentagem de inibição de 36,42; 12,26 e 6,1% respectivamente. A porcentagem de desvio padrão observada no ensaio não ultrapassou os 6%, com valor médio entre as amostras de aproximadamente 2%.

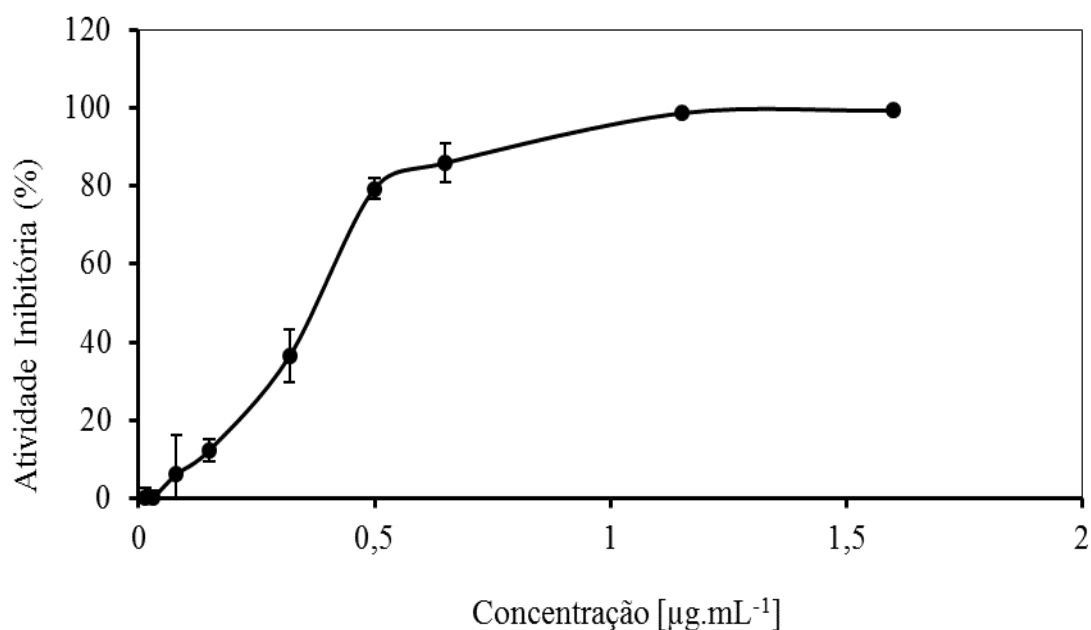


Figura 21: Porcentagem de inibição da enzima tripsina em substrato específico (BAPNA) frente a oito concentrações crescentes da fração rica dos inibidores extraído dos rizomas de *M. arundinacea*.

Para os ensaios de estabilidade térmica do inibidor, foi utilizada uma concentração observada na curva de inibição (Figura 22) onde seria possível obter-se 100% de inibição da atividade da enzima. Então, concentrações de 0,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da FR foram incubadas por 30 minutos em um gradiente crescente de 14 variações de temperatura, partindo de 30 °C até 95 °C, onde, em todos os gradientes de temperatura testados, o inibidor permaneceu estável, com taxa de inibição da atividade da enzima tripsina sempre superior a 90%, com desvio padrão máximo de 3% no ensaio, e com média de aproximadamente 1% de desvio entre as concentrações utilizadas para o ensaio (Figura 22).

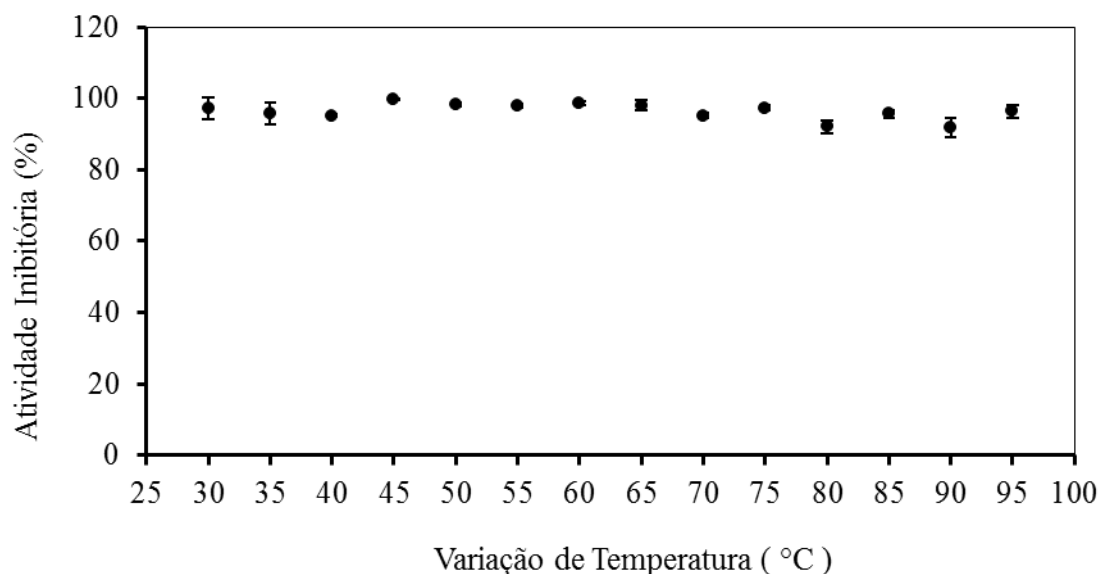


Figura 22: Ensaio de variação da termoestabilidade da FR frente a um gradiente de variação de 14 temperaturas utilizadas para o experimento. O gradiente de temperatura variou a cada 5 °C com temperatura de partida de 30 °C e a concentração da amostra utilizada em todos os ensaios foi de 0,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da FR obtida por cromatografia de afinidade.

A porcentagem de hemólise verificada no ensaio para a FR foi baixa (Figura 23). Nas sete concentrações da FR testadas no ensaio, a que apresentou maior taxa de hemólise das células do meio foi a concentração de 2,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com taxa de hemólise verificada no ensaio de 7,78% e desvio padrão de 1,99%. Essa taxa de percentual hemolítico é quase nulo quando comparado com o controle negativo do ensaio (Solução PBS) que apresentou taxa 7,11% e desvio padrão de 1,18% (Figura 23). Todas as demais concentrações utilizadas no ensaio apresentaram percentual de hemólise dentro de 5 e 6% com desvio padrão máximo de 3% e 1,5% entre as amostras do ensaio. Esse resultado indica que os inibidores presentes na FR de *M. arundinacea* apresentam baixíssimo percentual de citotoxicidade quando em contato direto com células, como no caso do ensaio, os eritrócitos, mas isso não indica que a presença deles no organismo possa causar graves danos ao metabolismo, visto que, se ingerido, esses inibidores atuam diretamente no estômago e intestino, impedindo a clivagem do alimento através da ação das enzimas, e consequente absorção pela parede do intestino.

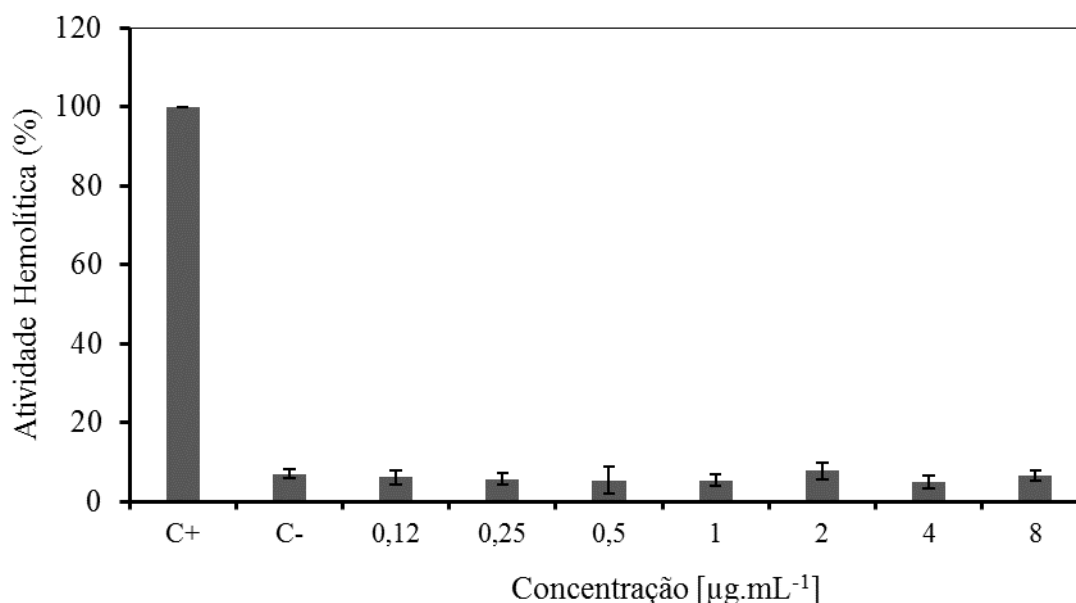


Figura 23: Atividade hemolítica da FR com variação crescente de 7 concentrações utilizadas para o ensaio. Foi utilizado como controle positivo Triton x-100 a uma concentração de 2%, e para o controle negativo a solução PBS.

O homogenato de enzimas extraídas do intestino de *S. frugiperda* apresentou alta atividade catalítica apresentada no gráfico (Figura 24) em conjunto com o substrato específico BApNA. Nas quatro variações de concentração utilizadas para o ensaio, a partir da concentração de $0,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a curva de atividade começa a atingir seu platô de atividade máxima, que é melhor observado nas duas próximas concentrações ($1,7$ e $4,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$), onde as enzimas presentes no homogenato atingem a velocidade máxima da reação em uma quantidade fixa de substrato ($1,25 \text{ mM BApNA}$).

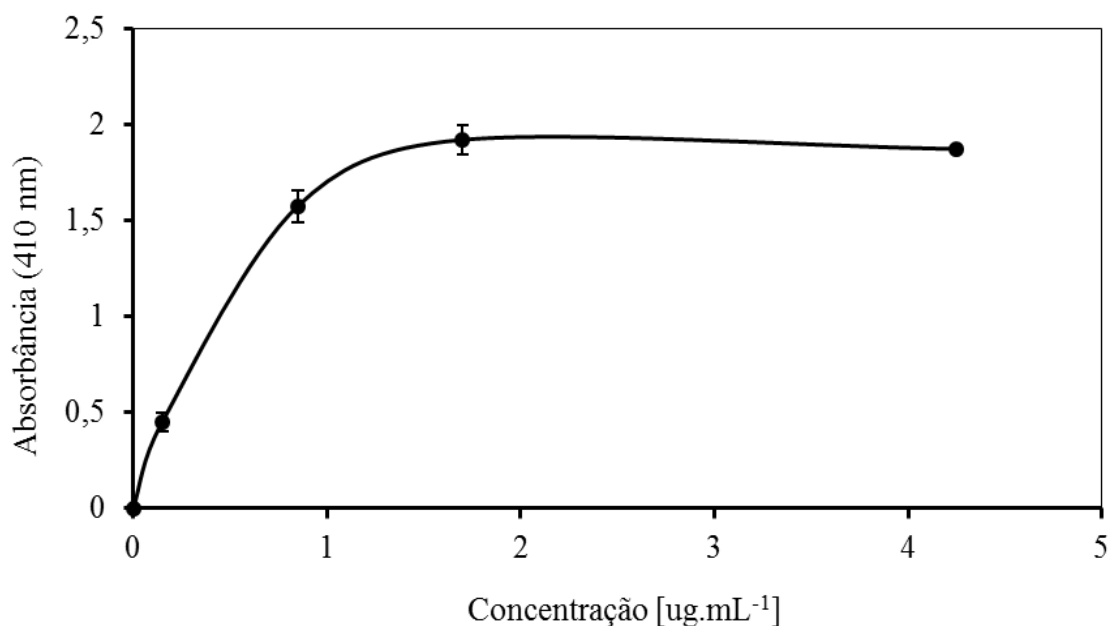


Figura 24: Curva de atividade obtida do homogenato intestinal de *S. frugiperda* com a utilização do substrato específico BApNA. Foram utilizadas 4 concentrações para construção da curva de atividade com absorbância dos produtos formados através da reação monitorados em espectrofotômetro a 410 nm.

Para verificar se os inibidores presentes na FR eram capazes de inibir a ação de proteases intestinais de *S. frugiperda*, foram testadas quatro concentrações da FR em relação à uma concentração fixa do homogenato intestinal ($0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Na concentração inicial de $0,012 \mu\text{g.mL}^{-1}$, houve um percentual de inibição de 43,36% da ação das enzimas, com desvio padrão de 5%. A partir da concentração de 0,025, é possível notar inibição quase total da atividade das enzimas do homogenato, com percentual de inibição de 88%, e desvio padrão menor que 0,5% para o ensaio. Nas concentrações posteriores ($0,05$ e $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) atingiu-se inibição quase total da atividade enzimática, com percentual de 89,95 % para a concentração de $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 93,93% de inibição para a concentração de $0,1 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ambos os ensaios com desvio padrão menor ou igual a 0,8% conforme verificado no gráfico (Figura 25).

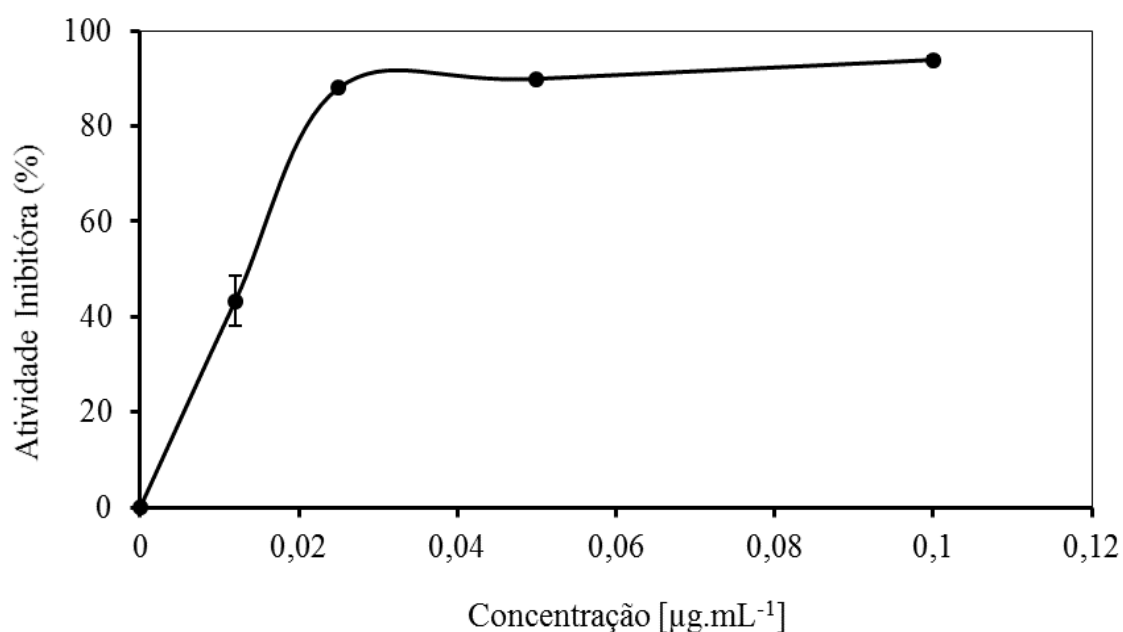


Figura 25: Curva de inibição de FR frente às enzimas obtidas do homogenato intestinal de *S. frugiperda*. Foi utilizado para o ensaio uma concentração do homogenato de $0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com variação 4 concentrações de FR para construção da curva. A atividade relativa da enzima foi mensurada em espectrofotômetro ao comprimento de onda de 410 nm e a atividade inibitória foi calculada a partir de um padrão de atividade do homogenato intestinal.

6. DISCUSSÃO

Diversos autores têm descrito e trabalhado com métodos de purificação de inibidores vegetais por meio do uso da resina Tripsina-Sepharose. O método de purificação utilizado no trabalho (cromatografia de afinidade) utilizando a resina Tripsina-Sepharose se mostrou determinante para obtenção da fração rica (figura 19). Diversos autores descrevem o ótimo rendimento apresentado na purificação de inibidores utilizando a resina Tripsina-Sepharose

em conjunto com outros métodos cromatográficos (Oliveira et al., 2007; Yoshizaki et al., 2007; Gu et al., 2014; Kuhar et al., 2013). Há relatos na literatura da presença de carboidratos ligados covalentemente à estrutura proteica de inibidores proteicos de proteases (EE et al., 2011, Paiva et al., 2003), o que não parece ser o caso do presente estudo, devido às altas taxas de atividade de inibição e estabilidade conformacional da amostra.

Em conjunto com os métodos cromatográficos para purificação, o fracionamento da amostra em sulfato de amônio se apresenta como um excelente método para obtenção de uma fração concentrada em inibidores. Segundo Griffith, (2011), a precipitação com sulfato de amônio é um dos procedimentos preliminares de purificação mais usados e as diferentes frações da amostra obtidas pelo método podem resultar em aumento da especificidade na atividade. Trata-se de um método eficiente de separar proteínas, já que o mesmo apresenta uma elevada solubilidade que comporta soluções salinas com força iônica elevada, sendo um dos métodos mais empregados também pelo baixo custo e baixa toxicidade (Lima et al., 2008).

Conforme observado nos ensaios de estabilidade térmica realizados com a FR de inibidores de *M. arundinacea*, o perfil de atividade inibitória permaneceu constante em todas as faixas de temperatura utilizadas no ensaio (figura 22). Encontra-se na literatura diversos trabalhos que tratam da termoestabilidade dos inibidores proteicos de proteases (Fang; Wong; NG, 2010; Klomklao et al., 2010; Klomklao et al., 2011). Essa alta termoestabilidade pode estar relacionada à um grande número de ligações dissulfeto presentes na estrutura do inibidor (Garcia et al., 2004), o que sugere que o inibidor presente nos rizomas de *M. arundinacea* possa pertencer à família de inibidores Bowman-Birk, visto à sua grande estabilidade térmica (Figura 22) e altas taxas de atividade inibitória (Figuras 15, 16, 17, 21, 25), o que também foi caracterizado por Chevreuil (2014), e Macedo e colaboradores (2007) onde, trabalhando com extratos das sementes da família Fabacea, verificaram grande estabilidade conformacional de suas amostras à uma temperatura de 100 °C, posteriormente submetidas à ensaio enzimático com tripsina, onde os extratos apresentaram 100% de inibição após o ensaio.

Um íon de massa aparente de 11734,6 Da pode ser observado na análise por espectrometria de massas (Figura 18). Essa massa caracteriza

principalmente os inibidores pertencentes à família Bowman-Birk, que possuem como outra característica, uma grande quantidade de resíduos de cisteína conservados, observados através do sequenciamento partindo da região N-terminal, principalmente em sementes da família Fabaceae (Macedo et al., 2007; Chevreuil, 2014), o que confere a essa família enorme estabilidade conformacional. Estão relatados na literatura o isolamento ou purificação de inibidores da família Bowman-Birk em tubérculos, apenas em um trabalho realizado por Zhang e colaboradores (2008), onde eles caracterizam um inibidor Bowman-Birk em *Apios americana* (Batata feijão), com massa determinada por MALDI-ToF-MS de 6,437 Da. Esse inibidor extraído por Zhang e colaboradores apresentou grande similaridade de sequência com outros inibidores Bowman-Birk extraídos de Fabaceae (*Glycine max*, 72%, *Medicago sativa*, 72%, *Medicago scutellata*, 68%, *Pisum sativum*, 72% e *Phaseolus vulgaris*, 68%) e resíduos de cisteína conservados.

Monteiro, 2011, avaliando o padrão de atividade hematológica do inibidor de quimotripsina extraído de *Erythrina velutina* (EvCI) obteve valores de taxa de hemólise próximos ao controle negativo, (absorbância menor que 0,5 nm) em todas as concentrações testadas para o ensaio, partindo de uma concentração inicial de 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O mesmo pode ser observado nos dados obtidos em nosso trabalho, onde, em todas as concentrações testadas no experimento de atividade hemolítica (Figura 23), o percentual de hemólise não ultrapassou 7% de hemólise das células em solução, visto que, o controle negativo feito com solução de PBS 0,5% apresentou taxa de hemólise de aproximadamente 7% no experimento realizado.

O homogenato obtido do intestino de *S. frugiperda* apresentou alta taxas de atividade específica para proteases serínicas, como já descrito, em lepidópteros, essas enzimas são responsáveis por 95% da atividade digestiva total (Srinivasan; Giri; Gupta, 2006). De maneira geral, essa enzima tem massa molecular entre 25 e 30 kDa e pH ótimo alcalino (entre 8 e 9) (Terra; Ferreira, 1994).

Ramos (2016), trabalhando com inibidores obtidos da farinha das folhas de mamona, observou redução na massa de pupas de *S. frugiperda*, com a introdução dos inibidores na dieta das lagartas, partindo de uma concentração de 113,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ até uma concentração extrapolada de 1.818,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A

assimilação de proteínas por meio da alimentação é o método mais simples de aquisição de aminoácidos que são essenciais ao desenvolvimento normal de grande parte dos seres vivos, sendo que alguns aminoácidos essenciais só são produzidos pelas plantas. Nesse caso, a limitação na obtenção de aminoácidos foi crítica no desenvolvimento normal dos insetos devido a formação do complexo enzima-inibidor.

A fração rica de *M. arundinacea* apresentou taxa de inibição de 100% das proteases presentes no macerado intestinal das lagartas de *S. frugiperda* com baixas concentrações testadas (Figura 25). A atuação dos inibidores enzimáticos como proteínas de defesa das plantas consiste na sua capacidade em inibir proteases presentes no intestino dos insetos, levando a uma redução na disponibilidade de aminoácidos e, conseqüentemente, a atrasos no desenvolvimento dos mesmos (Fan; Wu, 2005). Em geral, a eficácia dos inibidores de proteases no controle de insetos é maior quando esses são provenientes de plantas não hospedeiras (Parde; Sharma; Kachole, 2010; Saadati; Bandani; Moslemi, 2011). O resultado da inativação das proteases intestinais tem efeito direto na eficiência digestiva dos insetos, bem como sobre a disponibilidade e a absorção de nutrientes, podendo eventualmente levar à morte por inanição (Macedo et al., 2002).

Os mecanismos de defesa adotados pelos insetos contra os metabólitos secundários produzidos pelas plantas são principalmente dois: o primeiro envolve a superexpressão da proteinase inibida, o que aumenta sua atividade frente ao inibidor; já no segundo, são sintetizadas várias isoenzimas e algumas não serão inibidas. Ambos os mecanismos de defesa causam prejuízo ao inseto pois retiram aminoácidos essenciais ao desenvolvimento para a síntese das enzimas digestivas, causando assim um déficit no crescimento (Brioschi et al., 2007). Os inibidores proteicos de proteases têm recebido grande atenção devido as suas diversas aplicações biotecnológicas na agricultura e na farmacologia (Copeland, 2005; Tripathi; Sarashrabuddhe; Kumar, 2014).

Com um número crescente de inibidores de proteases caracterizados em plantas e sua especificidade por determinada enzima, há a busca da utilização desses inibidores para o desenvolvimento de produtos que possam ser utilizados pelas empresas agroindustriais que apresente baixa ou nenhuma toxicidade frente a células de mamíferos e que tenha uma efetividade no

controle de insetos pragas. Esses produtos podem variar desde a modificação genética de cultivares afim da expressão de um inibidor altamente específico, gerando controle sobre populações de insetos-praga, até a geração de produtos que possam ser aplicados sobre a superfície das plantas, afim de obter controle sobre predadores. O envolvimento de inibidores de proteases nos processos de regulação das atividades proteolíticas durante a germinação (Richardson, 1991), além de outras funções biológicas atribuídas a eles, como a sua atuação como proteínas de reserva, participação nos mecanismos de defesa das plantas ao ataque de insetos ou mamíferos (Schnebeli e Braun, 1986), e o seu papel no controle de proteases envolvidas no processo de esporulação de fungos, impedindo a dispersão, atuando dessa forma como um antifúngico e também como antibacteriano (Mosolov et al, 1976).

Uma das formas de utilização dos inibidores de proteases, está na prática clínica, podendo ser utilizados para aumentar a saciedade de pacientes acima do peso, ou ainda no tratamento de pacientes com algum tipo de lesão estomacal, como no caso de úlceras (Liener, 1979). Estudos recentes demonstraram que essas proteínas possuem atividade inibitória da proliferação de células cancerígenas, interferem no desenvolvimento de bactérias patogênicas a humanos e, também, como agentes leishmanicidas (Savoia; Allice; Tovo, 2005; Rakashanda et al., 2013; Costa et al. 2014; Fereidunian et al. 2014).

Há um interesse em especial, em inibidores de cisteíno-proteases extraídos de plantas. Essa classe de enzimas desempenham um papel vital no processamento de proteínas em várias viroses (Gorbalenyae Snijder, 1996). Algumas classes de inibidores de cisteíno-proteases extraídos de plantas foram capazes de suprimir a replicação de vírus da família picornaviridae (Kondo et al, 1992). Por meio desse conhecimento, surgiu então o interesse em pesquisas de controle de replicação viral, com a utilização de uma espécie viral de importância médica para a saúde humana, como por exemplo o HIV. Atualmente, o conhecimento da interação de inibidores naturais com suas proteases-alvo serve de base para o estudo e uso de inibidores sintéticos que atuem especificamente em proteases virais, que estejam envolvidas em algum processo vital de replicação do vírus. Esses inibidores são desenhados e sintetizados de acordo com a estrutura do sítio reativo da protease, atuando

especificamente sobre este, impedindo dessa forma que o ciclo do vírus se complete (Verli e Barreiro, 2005).

O sucesso desta e de qualquer estratégia que empregue proteínas de defesa no melhoramento de plantas depende da execução de uma série de etapas: purificação e caracterização da proteína de interesse; investigação acerca de sua atividade *in vitro* e *in vivo* contra patógenos, determinação da sequência parcial ou total de aminoácidos da proteína, clonagem de cDNAs e DNAs que codificam-na; estudo da expressão destes genes sob condições normais de desenvolvimento e sob condições de estresse; estudo da expressão transgênica dos genes transferidos para verificar se estes estão produzindo as proteínas correspondentes nas plantas transformadas e verificação do aumento da resistência nas plantas transgênicas em campo (GARCÍA-OLMEDO et al., 1996).

Os inibidores extraídos de *M. arundinacea* apresentaram grande percentual de inibição da atividade de tripsinas, tanto comercial quanto através do homogenato intestinal de *S. frugiperda*. Cada vez mais, o número de inibidores sequenciados e depositados em bancos de dados aumenta, mas pouco se sabe sobre as famílias de inibidores presentes em tubérculos ou, como no caso do estudo, os rizomas. Essas informações sobre inibidores proteicos extraídos de outros gêneros botânicos podem contribuir com um aumento na eficácia de controle de populações de insetos-praga.

7. CONCLUSÕES

Foi possível isolar e caracterizar a atividade do(s) inibidore(s) presente(s) na FR em *M. arundinacea* por meio de métodos cromatográficos simples; Os rizomas de *M. arundinacea* possuem inibidores de protease, com atividade específica para tripsina, caracterizada até o momento;

Foi possível inferir que a FR inibem atividade sobre as enzimas serínicas intestinais de *S. frugiperda*, podendo atuar no futuro como um possível método de controle para superpopulações desse inseto, mas para isso, outros estudos são necessários até que se possa alcançar um resultado realmente conclusivo sobre a utilização de inibidores de *M. arundinacea* no controle de lagartas de *S. frugiperda* e seus possíveis efeitos colaterais.

8. REFERÊNCIAS

and Marcello Duranti

APISARIYAKUL, A; VANITTANAKOM, N; BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 49, n. 3, p. 163–169, 1995.

ARAUJO C. A. C; LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 5, p. 723–728, 2001.

BALLS, A. K; LINEWEAVER, H; THOMPSON, R. R. Isolation and properties of cristalin papain. *Science*, n. 86, p. 379 - 81, 1937.

BARRETT, A. J; RAWLINGS, N. D; WOESSNER, J. F. *Handbook of Proteolytic Enzymes*: 2 ed, vol. 1. Amsterdam: Elsevier/Academic Press, 2004.

BENTLEY, R; TRIMEN, H. *Medicinal plants*. London: J. and A. Churchill. v. 4. p. 228-306, 1880.

BHARDWAJ, U; BHARDWAJ, A; KUMAR, R; LEELAVATHI, S; REDDY, V.S; MAZUMDAR-LEIGHTON, S. Revisiting rubisco as a protein substrate for insect midgut proteases. *Archives of insect biochemistry and physiology*, v. 85, n. 1, p. 13–35, 2014.

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

BIRK, Y; GERTLER, A; KHALEF, S. A pure trypsin inhibitor from soybeans. *Biochem. J*, n. 87, p. 281–284, 1963.

BODE, W., HUBER, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta*, n. 1477, p. 241–252, 2000.

BOWMAN, D. E. Differentiation of soybean anti-tryptic factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*, n. 63, p. 547–550, 1946.

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* v. 72, n. 248, 1976.

BRIOSCHI, D. General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsin and chymotrypsins allows its adaptation to soybean proteinase inhibitor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Kidlington, v. 37, n. 12, p. 1283-1290, 2007.

- BROADWAY, R. M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? J. Insect Physiol, v. 41, p. 107– 116, 1995.
- BUCHANAN, B. B, GRUISSSEN, W; JONES, R. L. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Soc. of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA. 1367p, 2002.
- BURGESS, RICHARD R. Protein Precipitation Techniques: Methods in Enzymology, Elsevier, v. 463, p. 331-342, 2009.
- CAPALDI, S; PERDUCA, M; FAGGION, B; CARRIZO, M. E; TAVA, A; RAGONA, L; MONACO, H. L. Crystal structure of the anticarcinogenic Bowman-Birk inhibitor from snail medic (*Medicago scutellata*) seeds complexed with bovine trypsin. Journal of Structural Biology, n. 158, p. 71-79, 2007.
- CARLBERG, I; JONSSON, L; BERGENSTRAHLE, A; SODERHALL, K. Purification of a trypsin inhibitor secreted by embryogenic carrot cells. Plant Physiol, v. 84, p. 197-290, 1987.
- CHAPMAN; R. F. The insects: structure and function, 4^o ed, Cambridge, Cambridge University Press, 788p, 1998.
- CHENG, Z. Y; XUE, Q. Z. The structure and regulation of plant proteinase inhibitor genes and their strategy in pest control: Yi Chuan Xue Bao, v. 30, p. 790-6, 2003.
- CHEVREUIL, LARISSA RAMOS. Purificação, caracterização química e atividade de proteases e inibidores de proteases durante a germinação e em eventos pré e pós-germinativos de sementes de *Parkia multijuga*. Larissa Ramos Chevreuil. Manaus, 2014. 119 f. Tese (Doutorado) INPA, Manaus, 2013.
- CHIANG, A, S; YEN, D. F; PENG, W. K. Defense reaction of midgut epithelial cells in the rice moth larva (*Corcyra cephalonica*) infected with *Bacillus thuringiensis*. J Invertebr Pathol, n. 47, p. 333-339, 1986.
- CHO, SANG WOO; KIM, NAM-JUNE; CHOI, MYUNG-UN; SHIN, WHANCHUL. Structure of aspergillopepsin I from *Aspergillus phoenicis*: variations of the S1'–S2 subsite in aspartic proteinases. Acta Crystallographica Section D, n. 57, p. 948-956, 2001.
- CLEMENTE, A; SONNANTE, G; DOMONEY, C. Bowman-Birk inhibitors from legumes and human gastrointestinal health. urrent status and perspectives. Curr Protein Pept Sci, n. 12, p. 358-373, 2011.
- Companhia Nacional de Abastecimento – Conab. Acompanhamento da safra brasileira de grãos, v3. n. 9, p. 1-178, Brasília, 2015.
- COPELAND, R. A. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery: a guide for medical chemists and pharmacologists. New Jersey, John Wiley e Sons, 2005.
- COPELAND, ROBERT A. Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis. 2^o ed., Wiley-VCH, 2000.
- COSTA, H. P. S; OLIVEIRA, J. T. A; SOUSA, D. O B; MORAIS, J. K. S; MORENO, F. B; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O; VIEGAS, R. A; VASCONCELOS, I. M. JcTI-I: a novel trypsin inhibitor from *Jatropha curcas*

seed cake with potential for bacterial infection treatment. *Frontiers in microbiology*, v. 5, n. 5, p. 1-12, 2014.

COULOMBE, R; GROCHULSKI, P; SIVARAMAN J; MENARD, R; MORT, J. S; AND CYGLER, M. Structure of human pro cathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J.* v. 15, p. 5492–5503, 1996.

CRUZ, I. A lagarta do cartucho na cultura do milho. Sete lagoas: Embrapa, CNPMS, 45p, (Circular Técnica, 21) 1995.

CRUZ, I. Manejo de pragas na cultura do milho. In: FANCELLI, A.L. & DOURADO NETO, D. Tecnologia da produção de milho. Piracicaba, Publique, p.18-39, 1997.

DUNSE, K. M; STEVENS, J. A; LAY, F. T; GASPAR, Y. M; HEATH, R. L; ANDERSON, M. A. Coexpression of potato type I and ii proteinase inhibitors gives cotton plants protection against ansect damage in the field. *PNAS*, vol. 107, n. 34, p. 15011-15015, 2010.

EDWARDS, P. J; WRATTEN, S. D. Ecologia das interações entre insetos e plantas. São Paulo, EPU, EDUSP, 1981.

EE, K. Y; ZHAO, J; REHMAN, A; AGBOOLA, S. Glycosylation, amino acid analysis and kinetic properties of a major Kunitz-Type trypsin inhibitor from *Acacia victoriae* Benthams seeds. *Food Chemistry*, v. 129, n. 3, p. 1224-1227, 2011.

EGGERS, C. T; WANG, S. X; FLETTERICK, R. J; CRAIK, C. S. The role of ecotin dimerization in protease inhibition. *J Mol Biol.* v. 308, p. 975–991, 2001

Enzio M. Ragg

Enzio M. Ragg

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

FANG, A. F; WONG, J. H; NG, T. B. Thermostable Kunitz trypsin inhibitor with cytokine inducing, antitumor and HIV-1 reverse transcriptase inhibitory activities from Korean large black soybeans. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 109, n. 3, p. 211-217, 2010.

FEREIDUNIAN, A; SADEGHALVAD, M; OMIDI, M. O; MOSTAFAIE, A. Soybean Bowman-Birk Protease Inhibitor (BBI): Identification of the Mechanisms of BBI Suppressive Effect on Growth of Two Adenocarcinoma Cell Lines: AGS and HT29. *Archives of Medical Research*, v. 45, n. 6, p. 455-461, 2014.

FINKENSTADT, W. R; LASKOWSKI, M. JR. Peptide Bond Cleavage on Trypsintrypsin Inhibitor Complex Formation: *J Biol Chem*, v. 240, p. 962-3, 1965.

FRITIG, B; HEITZ, T; LEGRAND, M. Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology*, v. 10, p. 16-22, 1998.

FUJINAGA, M; CHERNEY, M. M; OYAMA, H; ODA, K; JAMES, M. N. G. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 101, p. 3364-3369, 2004.

- GARCIA, V. A; FREIRE, M. G. M; NOVELLO, J. C. MARANGONI, S; MACEDO, M. L. R. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: Purification, characterization, and activity against pest proteases. *The Protein Journal*, New York, v. 23, n. 5, p. 343-350, 2004.
- GARCÍA-OLMEDO, F.; MOLINA, A.; SEGURA, A.; MORENO, M.; CASTAGNARO, A.; TITARENKO, E.; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P.; PIÑERO, M.; DIAZ, I. Engineering plants against pathogens: A general strategy. *Field Crops Res.*, v. 45, p. 79-84. 1996.
- GARCIA-OLMEDO, F; MOLINA, A; ALAMILLO, J. M; RODRIGUEZ-PALENZUELA, P. Plant defense peptides *Biopolymers*, v. 47, p. 479-491, 1998.
- GARCIA-OLMEDO, F; SALCEDO, G; SÁNCHEZ-MONGE, R; ROYO, J; CARBONERO, P. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and α -amylases. In: MIFLIN, B. (Ed.) *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*. Oxford: Oxford University Press, v. 4, p. 275-334, 1987.
- GATEHOUSE, A; SHI, Y; POWEL, K; BROUGH, C; HILDER, V; HAMILTON, W; NEWELL, C; MERRYWEATHER, A; BOULTER, D. Y GATEHOUSE, J. Approaches to insect resistance using transgenic plants. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Serie B*. v. 342, p. 279-286, 1993.
- GATEHOUSE, J. A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. *New Phytologist*, London, v. 156, n. 2, p. 145-169, 2002.
- GERSTENBERG, HOLGER; BELITZ, HANS-DIETER; WEDER, JURGEN K. P. Isolation and Characterization of some Proteinase inhibitors from *Phaseolus vulgaris* var. nanus. *Z. Lebensm. Unters Forsh*, n. 171, p. 28-34, 1980.
- GOEL, A; KUNNUMAKKARA, A. B; AGGARWAL, B. B. Curcumin as "Curecumin": from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*, v. 75, p. 787–809, 2008.
- GOMES, C. E. M; BARBOSA, A. E. A. D; MACEDO, L. L. P; PITANGA, J. C. M; TEIXEIRA, F. M. OLIVEIRA, A. S; MOURA, R. DA M; QUEIROZ, A F. S; MACEDO, F. P; SALES, M. P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (Cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (Fruit fly). *Plnat Physiol. Biochem*, v. 43, p. 1095-1102, 2005.
- GORBALENYA, A. E.; SNIJDER, E. J. Viral cysteine proteinases. *Perspectives in drug discovery and design*, v. 6, n. 1, p. 64-86, 1996.
- GRIFFITH, O. M. Large volume precipitation of proteins with ammonium sulfate using thermo scientific fiberlite carbon fiber rotors. *Thermo Scientific: ANCFGAMSULF 0511 (Technical Note)*, 2011.
- GU, C; SONG, X; ZHAO, L; PAN, S; QIN, G. Purification and Characterization of Bowman-Birk Trypsin Inhibitor from Soybean. *Journal of Food and Nutrition Research*, v. 2, n. 9, p. 546-550, 2014.
- HABIB, H; FAZILI, K. M. Plant proteinase inhibitors: a defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology, Review*, v. 2, n. 3, p. 68-85, 2007.
- HAQ, S.K; ATIF, S. M; KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection, *Arch. Biochem. Biophys*, nº 431, p.145-159, 2004.

HARTL M, GIRI A. P; KAUR H; BALDWIN I. T. The multiple functions of plant serine protease inhibitors: defense against herbivores and beyond. *Plant Signal Behav.* n. 6, p.1009–1011, 2011.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity: *Chem Rev*, v. 102, p. 4501-24, 2002.

HEIBGES A; GLACZINSKI H; BALLVORA A; SALAMINI F; GEBHARDT C. Structural diversity and organization of three gene families for Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Mol Genet Genomics*, v. 269, p. 526–534, 2003.

HICKS, D.; DUNCAN, M. J; JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal of Insect Physiology*, v. 43, n. 10, p. 885-895, Oct. 1997.

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

HILL, J. AND PHYLIP, L. Bacterial aspartic proteinases. *FEBS Lett*, v. 3, n. 409, p. 357–360, 1997.

HRUSKA, A. J.; GOULD, F. Fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) and *Diatraea lineolata* (Lepidoptera: Pyralidae): impact of larval population level and temporal occurrence on maize yield in Nicaragua. *Journal of Economic Entomology*, College Park, v. 90, n. 2, p. 611-622, 1997.

HSIEH, J. J.-D; CHENG, E. H.-Y; KORSMEYER, S. J. Taspase1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper HOX gene expression. *Cell*, n. 115, p. 293–303, 2003a.

HSIEH, J. J.-D; ERNST, P; ERDJUMENT-BROMAGE, H; TEMPST, P; KORSMEYER, S. J. Proteolytic cleavage of MLL generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol. Cell. Biol*, v. 23, p. 186–194, 2003b.

IKENAKA, T; NORIOKA, S. *Proteinase Inhibitors*. Amsterdam: Elsevier, p. 361–374, 1986.

International Union of Biochemistry and Molecular Biology, *Enzyme Nomenclature 1992*, Academic Press, Orlando, Florida, 1992.

ISHIKAWA, A; OHTA, S; MATSUOKA, K; HATTORY, T; NAKAMURA, K. A Family of Potato Genes That Encode Kunitz-Type Proteinase Inhibitors: Structural Comparisons and Differential Expression. *Plant Cell Physiol*, vol. 35, n. 2, p. 303–312, 1994.

JAMAL, F; PANDEY, P. K; SINGH, D; KHAN, M. Y. Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Phytochemistry Review*, New York, v.12, p. 1-34, 2013.

JAMES, M. *Structure and Function of Aspartic Protease: Retroviral and Cellular Enzymes*, Plenum Press, New York, 1–481, 1998.

JAYAPRAKASHA, G. K; RAO, L. J. M; SAKARIAH, K. K. Chemistry and biological activities of *C. longa*. *Trends in Food Science and Technology*, v. 16, n. 12, p. 533–548, 2005.

- JORGENSEN M; BAUW G; WELINDER K. G. Molecular properties and activities of tuber proteins from starch potato cv. Kuras. J Agr Food Chem, v. 54, p. 9389–9397, 2006.
- JOSHI, R. S; MISHRA, M; SURESH, C. G; GUPSTA, V. S.; GIRI, A. P. Complementation of intramolecular interactions for structural-functional stability of plant serine proteinase inhibitors. Biochimica et Biophysica Acta, n. 1830, v. 11, p. 5087- 5094, 2013.
- KAMPHUIS, I. G; KALK, K. H; SWARTE, M. B. A; DRENTH, J. Structure of Papain Refined at 1.65 Å Resolution. J. Mol. Biol, n. 179, p. 233-256, 1984.
- KASHPAROV, I. V; POPOV, M. E; POVOV, E. M. Mechanism of action of aspartic proteases. Plenum Press, Neem York, 1998.
- KHAN, JAVED A; DUNN, BEN M; TONG, LIANG. Crystal Structure of Human Taspase1, a Crucial Protease Regulating the Function of MLL. Structure, v. 13, p. 1443-1452, 2005.
- KHAN, M. S; POONAM, S; AZHAR, A; NASEEM, A; RASHID, Q; KABIR, M. A; JAIRAPURI, M. A. Serpin Inhibitor Mechanism: A Delicate Balance between Native Metastable State and Polymerization. Journal of Amino Acids, v. 2011, 10 p. 2011.
- KLOMKLAO, S; BENJAKUL, S; KISHIMURA, H; CHAIJIN, M. extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiate* (L.) R. Wilczek). Food Chemistry, v. 129, n. 4, p. 1348-1354, 2011.
- KLOMLAO, S; BENJAKUL, S; KISHIMURA, H; OSAKO, K; TANAKA, M. A heat-stable trypsin inhibitor in adzuki bean (*Vigna angularis*): effect of extraction media, purification and biochemical characteristics. International Journal of Food Science and Technology, v. 45, n. 1, p. 163-169, 2010.
- KOIWA, H; BRESSAN, R. A; RASEGAWA, P. M; Regulation of protease inhibitors and plant defense. Trends in Plant Science, Oxford, v.2, n10, p. 379-384, 1997.
- KONDO, H.; IJIRIS, S.; ABE, K.; MAEDA, H.; ARAI, S. Inhibitory effect of oryzacistatins and a truncation mutant on the replication of poliovirus in infected vero cells. Febs Letters, v. 299, n. 1, p. 48-50, 1992.
- KUHAR, K; KENSAL, K; SUBRAHMANYAM, B; KOUNDAL, K. R; MIGLANI, K. A Bowman-Birk protease inhibitor with antifeedant and antifungal activity from *Dolichos biflorus*. Acta Physiologiae Plantarum, v. 35, n. 6, p. 1887-1903, 2013.
- KUNITZ, M. Crystalline Soybean Trypsin Inhibitor. Science, vol. 101, n. 3, p. 668–669, 1945.
- KUNITZ, M; NORTHROP, J. H. Isolation from Beef Pancreas of Crystalline Trypsinogen, Trypsin, a Trypsin Inhibitor, and an Inhibitor-Trypsin Compound: J Gen Physiol, v. 19, p. 991-1007, 1936.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v.227, n. 5259, p. 680-685, 1970.
- LANTZ, R. C; CHEN, G, J; SOLYOM, A. M; JOLAD, S. D; TIMMERMAN, B, N. The effect of turmeric extracts on inflammatory mediator production. Phytomedicine, vol. 12, n. 6-7, p. 445– 452, 2005.

- LASKOWSKI, M; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. Annu. Rev. Biochem, 49, p. 593-626, 1980.
- LECAILLE, F; KALETA, J; BRÖMME, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. Chem Rev, n. 102, p. 4459–88, 2002.
- LEHANE, M. J. Peritrophic matrix structure and function. Ann Rev Entomol, n. 42, p. 525-550, 1997.
- LEHNINGER, A. L; NELSON, D. L. Princípios de Bioquímica, Artmed, São Paulo, 839 p., 2010.
- LEMOES, F. J. A; CAMPOS, F. A. P; SILVA, C. P; XAVIER-FILHO, J. Proteinase and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* reared on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. Entomol. Exp. Appl, v. 56, p. 219-227, 1990.
- LEÓN, J. Botânica de los cultivos tropicales. San Jose: IICA, 1987, 445p.
- LEONEL, MAGALI; CEREDA, MARNEY PASCOLI. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. Ciênc. Tecnol. Alimentos, Campinas, v. 22, n. 1, p. 65-69, 2002.
- LEVY, S. M; FALLEIROS, A. M, F; GREGÓRIO, E. A; ARREBOLA, N. R; TOLEDO, L. A. The larval midgut of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae): light and electron microscopy studies of the epithelial cells. Braz J Biol, n. 64, p. 633-638, 2004.
- LIENER, I, E. The nutritional significance of plant protease inhibitors. Proc Nutr Soc. 38, p. 109–113, 1979.
- LIMA, M. R.; SILVA, V. P. A.; FURTADO, R. F.; ALVES, C. R.; GUEDES, M. I. F.; DUTRA, R. A. F. Purificação de Ricina a partir de saturação com sulfato de amônio. III Congresso de Mamona, Energia e Riciquímica. Salvador BA, 2008.
- LOWE, J; STOCK, D; JAP, B; ZWICKL, P; BAUMEISTER, W; HUBER, R. Cristal Structure of the 20S Proteasome from the Archaeon *T. Acidophilum* at 3.4 Å Resolution. Science, v. 268, 1995.
- LYU, J; LIU, Y; AN, T; LIU, Y; WANG, M; SONG, Y; ZHENG, F; ZHANG, Y; DENG, S. Purification and Characterization of a trypsin inhibitor from the seeds of *Artocarpus heterophyllus* Lam. Acta Biochim Biophys Sin, p. 1-7, 2015.
- MACEDO, M. L. R.; MELLO, G. C.; FREIRE, M. G. M.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; MATOS, D. G. G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. Plant Physiol. Biochem., v. 40, p. 891-898. 2002.
- MACEDO, M. L. R; FREIRE, M. G. M; FRANCO, O. L; MIGLIOLO, L; OLIVEIRA, C. F. R. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. Comparative Biochemistry and Physiology part B, Biochemistry & Molecular Biology, v. 158, n. 2, p.164-172, 2011.
- 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, v. 68, p. 1104–1111. 2007.

MARTINS, P. S. Dinâmica evolutiva em roças de caboclos amazônicos. *Estudos Avançados*, v. 19, n. 53, p. 209-220, 2005.

MATRISIAN, L. M. Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends Genet*, v. 6, p. 121-125, 1990.

McFARLANE, J. E. Nutrition and digestive organs. In: BLUM, M. S. (Ed.). *Fundamentals of Insect Physiology*. New York: Wiley and Sons, 1985.

MENEGATTI, E; TEDESCHI, G; RONCHI, S; BORTOLOTTI, F; ASCENZI, P; THOMAS, R.M; BOLOGNESI, M; AND PALMIERI, S. Purification, inhibitory properties and amino acid sequence of a new serine proteinase inhibitor from white mustard (*Sinapis alba* L.) seed. *FEBS Letters*, vol. 301, n. 1, p. 10-14, 1992.

MONTEIRO, D. A; PERESSIN, V. A. Cultura da araruta. In: CEREDA, M. P. (Coord.). *Agricultura: tuberosas amiláceas Latino Americanas*. São Paulo: Fundação Cargill, v. 2, p. 440-447, 2002.

MONTEIRO, NOBERTO DE KÁSSIO VIEIRA. Avaliação das atividades anti-inflamatória, anti-coagulante e antiproliferativa do inibidor de quimotripsina das sementes de *Erythrina velutina* (EvCI). Noberto de Kássio Vieira Monteiro. – Natal, 2011, 124 f. Dissertação (Mestrado), UFRN, Rio Grande do Norte, 2011.

MOSOLOV, V. V; LOGINOVA, M. D; FEDURKINA, N. V; BENKEN, I. I. The Biological significance of proteinase-inhibitors in plants. *Plant Science Letters*, v. 7, p. 77-80, 1976.

MOSOLOV, V. V; VALUEVA, T. A. Proteinase inhibitors and their function in plants: A review, *Appl. Biochem. Microbiol*, n. 41, p. 227-246, 2005.

MOSOLOV, V. V; VALUEVA, T. A. *Rastitel'nye Belkovye Ingibitory Proteoliticheskikh Fermentov (Plant Protein Inhibitors of Proteolytic Enzymes)*, Moscow: VINITI, 1993.

MOSYAK, L; GEORGIADIS, K; SHANE, T; SVENSON, K; HEBERT, T; MCDONAGH, T; MACKIE, S; OLLAND, S; LIN, L; ZHONG, X; KRIZ, R; REIFENBERG, E. L; COLLINS-RACIE, L. A; CORCORAN, C; FREEMAN, B; ZOLLNER, R; MARVELL, T; VERA, M; SUM, P-E; LAVALLIE, E. R; STAHL, M; SOMERS, W. Crystal structure of the two major aggrecan degrading enzymes, ADAMTS4 and ADAMTS5. *Protein Science*, n. 17, p. 16-21, 2008.

NAGOSHI, R.N.; SILVIE, P.; MEAGHER, L.R.; LOPEZ, J.; MACHADO, V. Identification and Comparison of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) host strains in Brazil, Texas, and Florida. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 100, n. 3, p.394-402, 2007.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J; BOND, J. S. *Proteolytic enzymes – a practical approach*, Oxford: JRL Press, p. 259, 1990.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: *Proteolytic Enzymes: A Practical approach*. Oxford University Press, New York, p. 1-14, 1996.

NUNN, C. M; JEEVES, M; CLIFF, M. J; URQUHART, G. J; GEORGE, R. R; CHAO, L, H; TSCUCHIA, Y; DJORDJEVIC, S. Crystal Structure of Tobacco Etch Virus Protease Shows the Protein C Terminus Bound within the Active Site. *J. Mol. Biol*, v. 350, p. 145-155, 2005.

ODANI, S; KOIDE, T; ONO, T. Wheat gram trypsin inhibitor. Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of the Bowman-Birk type J. Biochem, vol. 100, no. 4, pp. 975–983, 1986.

OLIVEIRA, A. S. Identification of a Kunitz-type Proteinase Inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds with insecticidal properties and double activity. J. Agric. Food Chem, v. 55, p. 7342-7349, 2007.

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

PAIVA, P. M. G; SOUZA, A. F; OLIVA, M. L. V; KENNEDY, J. F; CAVALCANTI, M. S. M; COELHO, L. C. B. B; SAMPAIO, C. A. Isolation of a trypsin inhibitor from *Echinodorus paniculatus* seeds by affinity chromatography on immobilized *Cratylia mollis* isolectins. Bioresource technology, v. 88, n. 1, p. 75-79, 2003.

PANDEY, PRABHASH K; JAMAL, FARRUKH. Bio-potency of a 21 kDa Kunitz-type trypsin inhibitor from *Tamarindus indica* seed on the developmental physiologu of *H. armigera*. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2014.

PARDE, V. D; SHARMA, H. C; KACHOLE, M. S. In vitro inhibition of *Helicoverpa armigera* gut pro-proteinase activation by non-host plant protease inhibitors. Journal of Insect Physiology, London, v. 56, p. 1315-1324, 2010.

PECKOLT, T.; PECKOLT, G. História das plantas medicinais e úteis do Brazil. Rio de Janeiro: Laemmert e C, 1893. (5º fascículo).

PEREIRA, J.; CIACCO, C. F.; VILELA, E. R.; TEIXEIRA, L. de S. Fermented starch in the biscuit manufacturing: alternative sources. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 287-293, 1999.

PRATHIBHA, S; NAMBISAN, B; LEELAMMA, S. Enzyme inhibitors in tuber crops and their thermal stability. Plant Foods for Human Nutrition, v. 48, p. 247-257, 1995.

RADISKY, E. S; KOSHLAND, D. E. JR. A clogged gutter mechanism for protease inhibitors: Proc Natl Acad Sci U S A, v. 99, p. 10316-21, 2002.

RAGG, E. M; GALBUSERA, V; SCARAFONI, A; NEGRI, A; TEDESCHI, G; CONSONNI, A; SESSA, F; DURANTI, M. Inhibitory properties and solution structure of a potente Bowman-Birk protease inhibitor from lentil (*Lens culinaris*, L) seeds. FEBS Journal, v. 273, p. 4024-4039, 2006.

RAKASHANDA, S; QAZI, A. K; MAJEED, R; RAFIQ, ; DAR, I. M; MASOOD, A; HAMID, A; AMIN, S; Antiproliferative activity of *Lavatera cashmeriana* protease inhibitors towards human câncer cells. Asina Pacific Journal of Cancer Prevention, v. 14, n. 6, p. 39-75, 2013.

RAMASARMA, P, R; RAO, A, G; RAO, D. R. Role of disulfide linkages in structure and activity of proteinase inhibitor from horsegram (*Dolichos biflorus*). Biochim Biophys Acta, n. 1248, p. 35-42, 1995.

RAMOS, VINICIUS DE OLIVEIRA. Inibidor de tripsina de *Spodoptera frugiperda*: extração de folhas de mamona, purificação, identificação e atividade biológica. Vinicius de Oliveira Ramos. Lavras : UFLA, 2016. 111 p. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

RAO, M. B.; TANKSALE, M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sep. 1998.

RAWLINGS, N. D; BARRETT A. J. Evolutionary families of metallopeptidases. *Meth Enzymol*, n. 248, p. 183–228, 1995.

RAWLINGS, N. D; BARRETT, A. J. Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism. *Meth Enzymol*, n. 248, p. 105–120, 1995.

RAWLINGS, N. D; BARRETT, A. J; BATEMAN, A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*, v. 38, p. 227-233, 2010.

RICHARDSON, M. Seed Storage Proteins: The enzyme Inhibitors. *Methods in Plant Biochemistry*, v. 5, p. 259-305, 1991.

RICHARDSON, M. The proteinase inhibitors of plants and microorganisms. *Phytochemistry*, 16, 159-169, 1977.

ROSENTHAL G. A; BERENBAUM, M. R. Herbivores: Their interaction with secondary plant metabolites. *Ecological and evolutionary processes*, 2 ed, edition academic press, v. 2, San Diego, 1992.

ROUSSEL, A. MATHIEU, M; DOBBS, A; LUU, B; CAMBILLAU, C; KELLENBERGER, C. Complexation of Two Proteic Insect Inhibitors to the Active Site of Chymotrypsin Suggests Decoupled Roles for Binding and Selectivity. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 42, p. 38893–38898, 2001.

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

SAADATI, F; BANDANI, A. R; MOSLEMI, A. Effect of plant seeds protein extract on the sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton, growth and development and its gut serine protease activity. *African Journal of Biotechnology*, Nairobi, v. 10, n. 55, p. 11502-11510, 2011.

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, p. 755–765, 2004

SAVOIA, D; ALLICE, T; TOVO, P. A. Antileishmanial activity of HIV protease inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 26, n. 1, p. 92-94, 2005.

SCHECHTER, I; BERGER, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain: *Biochem Biophys Res Commun*, v. 27, p. 157-62, 1967.

- SCHNEBELI, H P; BRAUN, N. J. Proteinase inhibitors as drugs. In: Barrett, A .J; Salvesen, G; editors. Proteinase inhibitors. Amsterdam: Elsevier, p. 613-627, 1986.
- SCHULER, T. H; POPPY, G. M; KERRY, B. R; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. Trends Biotechnol, v. 16, p. 168-175, 1998.
- SELVAM, R; SUBRAMANIAN, L; GAYATHRI, R; ANGAYARKANNI, N. The anti-oxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*). Journal of Ethnopharmacology, v. 47, n. 2, p. 59–67, 1995.
- SEON-NEG, C; NORLIZA, A. B; MAZIAH, M; CHAI-LING, H; NOOR, A. S. Molecular cloning and characterization of novel phytocystatin gene from turmeric, *Curcuma longa*. BioMed Research International, 2014.
- SHANG, C; SASSA, H; HIRANO, H. The role of glycosylation in the function of a 48-kDa glycoprotein from carrot. Biochem. Biophys. Res. Commun. v. 328, p. 144–149, 2005.
- SHEHZAD, A; WAHID, F; LEE, Y, S. Curcumin in Cancer Chemoprevention: Molecular Targets, Pharmacokinetics, Bioavailability, and Clinical Trials. *Arch Pharm Chem Life Sci*, p. 1-11, 2010.
- SILVA, C. P; LEMOS, F. J. A; da SILVA, J. R. Digestão em Insetos. Em: Termignoni, C; MASUDA, H; da SILVA NETO, M. A. C. (Ed). Tópicos avançados em entomologia molecular. Rio de Janeiro: INCT-EM, cap.5, p.1-32, 2013.
- SINGH, R. R; RAO, A. G. Reductive unfolding and oxidative refolding of a Bowman-Birk inhibitor from horsegram seeds (*Dolichos biflorus*): evidence for “hyperreactive” disulfide bonds and rate-limiting nature of disulfide isomerization in folding. Biochim Biophys Acta, n. 1597, p. 280-291, 2002
- SONG, HYUN KYU; SUH, SE WON. Kunitz-type Soyben 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. *J. Mol. Biol.*, nº 275, p. 347-363, 1998.
- SRINIVASAN, A; GIRI, A. P; GUPTA, V. S; Structural and functional diversities in lepdopteran serine proteases. Cellular & Molecular Biology Letters, Wroclaw, v. 11, p. 132-154, 2006.
- TAIZ, L; ZEIGER, E. Fisiologia Vegetal. 3ª edição. Editota Artmed, 2004, 719p.
- TERRA, W. R. FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comparative Biochemistry and Physiology, New York, v. 109B, p.1-62, 1994.
- TERRA, W. R; FERREIRA, C. Fisiologia molecular e evolutiva do processo digestivo dos insetos. In: PANIZZU, A. R; PARRA, J. R. P. Bioecologia e Nutrição de insetos. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009, cap. 4, p.175-209.
- TORTORELLA, M. D; TOMASSELLI, A. G; MATHIS, K. J; SCHNUTE, M. E; WOODARD, S. S; MUNIE, G; WILLIAMS, J. M; CASPERS, N; WITTEWER, A. J; MALFAIT, A. M; SHIEH, H. S. Structural and inhibition analysis reveals the

mechanism of selectivity of a series of aggrecanase inhibitors. *J Biol Chem*, n. 284, p. 24185–24191, 2009.

TRIPATHI, V. R; SAHASRABUDDHE, A. A; KUMAR, S. GARG, S. K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from senna tora active against midgut protease of podborer. *Process Biochemistry*, v. 49, n. 2, p. 347-355, 2014.

USSUF, K. K; LAXMI, N. H; MITRA, R. Protease inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Current Science*, v. 8, p. 847-853, 2001.

VALICENTE, FERNANDO HERCOS. Manejo integrado de pragas na cultura do milho, Sete Lagoas, MG, Embrapa, ISSN, 13p, (Circular Técnica 208), 2015.

VALUEVA, T. A; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. *Biochemistry*, v. 69, n. 1, p. 1305-1309, Nov. 2004.

VERLI, HUGO; BARREIRO, ELIEZER J. Um paradigma da química medicinal: A flexibilidade dos ligantes e receptores. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 95-102, 2005.

VISENTIN, M; IORI, R; VALDICELLI, L; PALMIERI, S. Trypsin inhibitory activity in some rapessed genotypes. *Phytochemistry*, vol. 31, no. 11, p. 3677–3680, 1992.

WIECZOREK, M; OTLEWSKI, J; COOK, J; PARKS, K; LELUK, J; WIELMOWSKA-PELC, A; POLANOWSKI, A; WILUSZ, T; LASKOWSKI, M. Jr. The squash family of serine proteinase inhibitors. Amino Acids Sequences and Association Equilibrium Constants of Inhibitors from Squash, Summer Squash, Zucchini and Cucumber seeds. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, vol. 126, no. 2, p. 646–652, 1985.

YOKOYAMA, A; KITABAYASHI, I; AYTON, P. M; CLEARY, M. L; OHKI, M. Leukemia proto-oncoprotein MLL is proteolytically processed into 2 fragments with opposite transcriptional properties. *Blood* 100, p. 3710–3718, 2002.

YOSHIZAKI, L; TRONCOSO, M. F; LOPES, J. L. S; HELLMAN, U; BELTRAMINI, L. M; WOLFENSTEIN-TODEL, C. Calliandra selloi Macbride trypsin inhibitor: Isolation, characterization, stability, spectroscopic analyses. *Phytochemistry*, v. 68, n. 21, p. 2625-2634, 2007.

YU, B. D; HANSON, R. D; HESS, J. L; HORNING, S. E; KORSMEYER, S. J. MLL, a mammalian trithorax-group gene, functions as a transcriptional maintenance factor in morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 10632–10636, 1998.

ZHANG, YOUZUO; KOUZUMA, YOSHIKI; MIYAJI, TAKAYUKI, YONEKURA, MASAMI. Purification, Characterization, and cDNA Cloning of a Bowman-Birk Type Trypsin Inhibitor from *Apios americana* Medikus Tubers. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v. 72, n. 1, p. 171-178, 2008.