INIBIDORES DE PROTEASES DE COTILÉDONES DE *Clitoria* fairchildiana COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INSETICIDA

LUCILENE OLLIVIER DE OLIVEIRA LÃCZYNSKI

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

AGOSTO - 2015

INIBIDORES DE PROTEASES DE COTILÉDONES DE *Clitoria* fairchildiana COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INSETICIDA

LUCILENE OLLIVIER DE OLIVEIRA LÃCZYNSKI

"Tese apresentada Centro ao de Biociências е Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do titulo de Doutor em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular".

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ

AGOSTO - 2015

INIBIDORES DE PROTEASES DE COTILÉDONES DE *Clitoria fairchildiana* COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E INSETICIDA

LUCILENE OLLIVIER DE OLIVEIRA LÃCZYNSKI

"Tese apresentada Centro de ao Biociências е Biotecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do titulo de Doutor em Biociências e Biotecnologia, área de concentração Biologia Celular".

Aprovada em 18 de agosto de 2015.

Comissão examinadora:

Prof. Adriano Rodrigues de Paula (Dr. em Entomologia) - UENF

Profª. Luciana Belarmindo da Silva (Drª. em Biociências e Biotecnologia) - IFF

Prof^a. Maura da Cunha (Dr^a. em Ciências Biológicas) - UENF

Prof^a. Kátia Valevski Sales Fernandes (PhD em Bioquímica e Biologia Molecular) -UENF (Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar forças para chegar até aqui!

À Professora Kátia Valevski Sales Fernandes, pela dedicada orientação, grande amizade, estímulo, confiança e muita paciência. Obrigada por todos os ensinamentos ao longo destes anos.

Agradeço à professora Antônia Elenir Amâncio Oliveira por ter aceitado participar da revisão desta tese.

Agradeço aos professores Adriano Rodrigues de Paula, Maura da Cunha e Luciana Belarmindo da Silva, por aceitarem fazer parte dessa banca examinadora e por todas as contribuições que vierem a oferecer.

SUMÁRIO

	II
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	XI
ABREVIATURAS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV

1. INTRODUÇÃO	2
1.1. Proteases e seus inibidores protéicos	4
1.1.1 Inibidores de proteases serínicas em plantas	6
1.1.2. Família de inibidores Bowman-Birk (BBIs)	8
1.1.3. Família de inibidores do tipo Kunitz	9
1.2. Atividade inseticida de inibidores de proteases	10
1.3. Atividade antifúngica de inibidores de proteases	13
1.4. Leveduras – Candida albicans	16
1.5. Ação de inibidores de proteases sobre o desenvolvimento de aegypti	<i>Aedes</i> 16

2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo geral	21
2. 2. Objetivos específicos	21

3. MATERIAS	22
3.1. Material botânico	22
3.2. Criação de células de leveduras	23

33	Criação	e preparo	dos testes	utilizando c) mosquito A	aegypti	23
0.0.	Onação	o propuro		atmediate a	, 1110094110 , 1.	uogypii	

4. MÉTODOS	_23
4.1. Extração protéica de cotilédones de <i>Clitoria fairchildiana</i>	_23
4.2. Cromatografia de exclusão molecular	_24
4.3. Quantificação protéica	_24
4.4. Visualização dos perfis protéicos por eletroforese em gel poliacrilamida	de _24
4.5. Eletroforese em gel de Tricina na presença de SDS	_25
4.6. Cromatografia de fase reversa em HPLC	_26
4.7. Espectrometria de massas de proteínas isoladas	_26
4.8. Identificação de inibidores de proteases	_28
4.8.1. Ensaio de inibição da atividade proteolítica da papaína in vitro	_28
4.8.2. Ensaio de inibição da atividade proteolítica da tripsina in vitro	_28
4.8.3. Ensaio de inibição da atividade proteolítica da α-quimiotripsina <i>in vitro</i>	_29
4.8.4. Ensaio de inibição da atividade proteolítica de elastase e subtilisin	a in
vitro	_30
4.8.5. Ensaio de inibição da atividade de α-amilase <i>in vitro</i>	_30
4.8.6. Ensaio de inibição da atividade proteolítica de enzimas digestivas de larva	ls de
A. aegypti in vitro	31
4.9. Visualização do inibidor de protease por zimografia	_32
4.9.1. Inibição da atividade proteolítica das enzimas digestivas (L4) de A. aegypti	i por
diferentes inibidores in gel	32

4.9.2. Análise temporal da inibição da atividade proteolítica das enzimas digestiv	vas
(L4) de <i>A. aegypti</i> por inibidor isolado <i>in gel</i>	33
4.10. Avaliação da atividade antifúngica dos inibidores de sementes de	С.
fairchildiana	33
4.10.1. Obtenção das células	33
4.10.2. Análise da inibição do crescimento das células de leveduras3	34
4.10.3. Efeito do inibidor isolado sobre a permeabilização de membranas	de
leveduras	_34
4.10.4. Análise da viabilidade celular	34
4.11. Análises estatísticas	_35

5. RESULTADOS	_36
5.1. Purificação de inibidores	36
5.2. Avaliação da atividade antifúngica das frações enriquecidas o	com
inibidores	_40
5.2.1. Inibição do crescimento de leveduras com frações enriquecidas c	com
cistatinas	40
5.3. Avaliação do potencial inseticida do ClfTI sobre enzimas digestivas de larvas	s de
A. aegypti em quarto estágio (L4) de desenvolvimento	53
5.3.1. Análise da inibição do crescimento de leveduras em meio líquido	_56
5.3.2. Análise da viabilidade celular	58
5.3.3. Ensaio para verificação da permeabilidade de membrana das células	da
levedura <i>C. albicans</i> crescidas em presença da fração F11	_60

6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÃO	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
9. ANEXO I	

LISTA DE FIGURAS

 Figura 1: Mecanismo de catálise enzimática das quatro classes de enzimas proteolíticas. Retirado e adaptado de Van Der Hoorn (2008)_____4

Figura 2: Estrutura primária de inibidor de soja da família de Bowman-Birk. A estrutura primária do inibidor de soja da família de Bowman-Birk mostra a organização das sete pontes dissulfeto. Os dois sítios reativos localizados nos loops e a posição dos resíduos P1 dos sítios reativos para tripsina (Lisina 16-Serina 17) e quimiotripsina (Leucina 44-Serina 45) estão indicados (Odani & Ikenaka, 1973 a, b)______8

Figura 3: Ciclo biológico do mosquito A. aegypti com as quatro fases: Mosquito, ovo,larva e pupa. Adaptado de (http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos)_____18

Figura 4: *Clitoria faichildiana* R.A. Howard; indvíduo adulto (A), suas flores (B), vagens (C) e sementes (D). (https://sobasombradasarvores.wordpress.com/paubrasil/sombreiro-*clitoria-fairchildiana*)_____22

Figura 5: Sobreposição das proteínas comerciais albumina sérica bovina - 66 kDa (BSA), anidrase carbônica - 29 kDa (AC), lisozima - 14 kDa (L) com os 3 picos (P1, P2 e P3) do extrato bruto fervido (EBF) obtidos na cromatografia de exclusão molecular em uma matriz Sephadex G-100______36

Figura 6: Visualização eletroforética em gel de poliacrilamida 15% corado com azul de coomassie brilhante (A) e em gel de tricina corado com nitrato de prata (B), ambos na presença de SDS, do extrato bruto (EB), do extrato bruto após 10 min de fervura a 100 °C (EBF) e dos picos P1, P2 e P3 obtidos na cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100. Os géis foram corridos na presença de β -mercaptoetanol. M - marcador de massa molecular em kDa. Concetração de proteínas aplicada em cada poço: EB = 82µg; EBF = 90.75 µg; P1 = 31.44 µg; P2= 37.42 µg; P3= 17.4 µg_______37

Figura 7: (A) Dosagem de atividade inibitória de papaína (B) Dosagem de atividade inibitória de tripsina em ausência e presença do extrato bruto (EB), extrato bruto fervido (EBF) e dos picos P1, P2 e P3 obtidos na cromatografia de exclusão

molecular. One-way ANOVA/Dunnett's post-tests do software Graphpad Prism. Asterisco: *P*<0.001 (efeito significativo). O experimento foi realizado em triplicata, com n=2______39

Figura 8: Curva de crescimento de *C. albicans* na presença dos picos P1 (A), P2 (B) e P3 (C) da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100. O crescimento foi avaliado a cada 6 h ao longo de 24 h. O experimento foi feito em triplicata______41

Figura 9: Microscopia ótica de contraste de fase das células das leveduras *C. albicans* crescidas na ausência (controle) e na presença dos extratos protéicos de *C. fairchildiana*. Em A: Controle *C. albicans;* B: *C. albicans* + P1 (15,76 μg de proteína);
C: *C. albicans* + P2 (15,76 μg de proteína); D: *C. albicans* + P3 (3,76 μg de proteína). Ampliação de 40x_____42

Figura 10: Perfil cromatográfico obtido na coluna de fase reversa C8-C18 do P2. As frações foram coletadas por minutos de retenção na coluna, onde NR é Não Retida na coluna (NR - 0 a 10') e as Frações F2 (13 a 14'), F3 (14 a 16,5'), F4(17 a 19'), F5 (30 a 30,5'), F6 (30,7 a 33,5'), F7 (33,6 a 35'), F8 (35,1 a 37'), F9 (37,1 a 43'), F10 (43,1 a 46'), F11 (46 a 49'), F12 (50 a 53'), F13 (54 a 86') e F14 (86 a 89'). As frações foram nomeadas segundo a quantidade de minutos de retenção na coluna. A eluição da coluna foi acompanhada por um detector do tipo DAD, sendo as absorbâncias lidas a 280nm______43

Figura 11: Visualização eletroforética, em gel de tricina na presença de SDS, das frações NR, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, em (A), e F9, F10, F11, F12, F13 e F14, em (B) obtidas na cromatografia de fase reversa em uma coluna C8C18, a partir da separação do P2 da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100. Ambos os géis foram corridos na presença de β-mercaptoetanol e corados com azul de coomassie brilhante. M- marcador de massa molecular em kDa. Foram aplicados 6 μg de proteína em cada poço_____44

Figura 12: Dosagem de atividade inibitória (UAI – Unidade inibitória / µg de proteína) das frações obtidas na cromatografia de fase reversa em uma coluna C8-C18 contra papaína. One-way ANOVA/Dunnett's post-tests do software Graphpad Prism.

Asterisco: P<0.001 (efeito significativo). O experimento foi realizado em triplicata, com n=2_____45

Figura 13: Dosagem de atividade inibitória (UAI – Unidade de atividade inibitória / μg de proteína) das frações obtidas na cromatografia de fase reversa em uma coluna C8-C18 contra tripsina. One-way ANOVA/Dunnett's post-tests do software Graphpad Prism. Asterisco: *P*<0.001. O experimento foi realizado em triplicata_____46

Figura 14: Atividade residual de α -quimiotripsina e α -amilase na presença das frações F10, F11 e F12 obtidas na cromatografia de fase reversa em uma coluna C8-C18. One-way ANOVA/Dunnett's post-tests do software Graphpad Prism. Asterisco: *P*<0.001. Um experimento em triplicata_____47

Figura 15: Atividade residual de elastase e subtilisina na presença da F11 obtida na cromatografia de fase reversa em uma coluna C8-C18. One-way ANOVA/Dunnett's post-tests do software Graphpad Prism. Asterisco: *P*<0.001. O experimento foi realizado em triplicata_____48

Figura 16: Seqüência parcial e alinhamento comparativo de ClfTI com outros inibidores de tripsina de sementes de leguminosas. Retângulo azul: conformação β. Em amarelo são os resíduos de cisteína, em azul claro os aminoácidos polares não carregados, em vermelhos os alifáticos, em cinza o aminoácido prolina e em verde os aminoácidos básicos. InProVigungcy (EMBL CAM35517); BowBirkVigung (2R33_A); InTrVigradsub (ABD91575.1); BowBirkCicart (AEW50186.1); InTrVigradrad (ABD85193.1); InTrVigtril(ABD91574.1); BowBirkIIAcea (P83283)______50

Figura 17: SDS-PAGE 12% (A) e SDS-PAGE 12% contendo 0,1% de gelatina (B) do ClfTI (F11) e extrato bruto fervido (EBF). Ambos os géis foram corridos na ausência de β -mercaptoetanol e corados com azul de coomassie brilhante, aplicando-se 2 µg e 1 µg de proteína do ClfTI, respectivamente e 12,10 µg de EBF em cada poço_____51 **Figura 18:** Atividade residual (%) de enzimas digestivas de larvas de *A. aegypti,* em quarto estágio de desenvolvimento (L4), na ausência e presença do ClfTI. One-way ANOVA/post-tests t do software Graphpad Prism. Asterisco: P<0.001.O experimento foi realizado em triplicata, com n= 2_____53

Figura 19: Zimografia de atividades proteolíticas do intestino médio de larvas de quarto estágio (L4) de *A. aegypti* incubadas ou não na presença de diferentes inibidores durante 16 h a 37° C. Em 1 - L4; 2 - L4 + ClfTl ($3 \mu g \cong 57,7 \mu M$) pH 8,0; 3 - L4 + PMSF ($227 \mu M$); 4 - L4; 5 - L4 + EDTA (9 mM) pH8,0; 6 - L4; 7 - L4 + E-64 (2,56 μM) pH 5,6; 8 - L4; 9 - L4 + pepstatina-A (13,26 μM) pH3,5; 10 - L4 + DMSO (100%). M - marcador de massa molecular (kDa). Atividade proteolítica aparece em branco contra um fundo preto. As setas brancas indicam as bandas de atividade enzimáticas do controle e os asteriscos indicam a redução das bandas atividade enzimáticas de L4 na presença do ClfTl______55

Figura 20: Zimografia de proteases do intestino médio de larvas de quarto estágio (L4) de *A. aegypti*, incubadas na ausência e na presença do ClfTl (2 μg) por 30 min, 2 h, 4 h e 18 h de pré-incubação a 37º C. M - massa molecular (kDa). Atividade proteolítica aparece em branco contra um fundo preto. As setas brancas indicam a redução das bandas atividade enzimáticas de L4 na presença do ClfTl e os asteriscos indicam as bandas de atividade enzimáticas do controle_____56

Figura 21: Atividade antimicrobiana das frações enriquecidas com cistatinas sobre a levedura *C. albicans*. O experimento foi feito em triplicata_____57

Figura 22: Atividade antimicrobiana das frações enriquecidas com inibidor de tripsina sobre a levedura *C. albicans*. As frações foram utilizadas na concentração de 100 µg.mL⁻¹. O experimento foi feito em triplicata_____57

Figura 23: Crescimento de *C. albicans* em ausência e presença das frações enriquecidas com inibidores de tripsina. Em: (A) *C. albicans* + meio Sabouraud; (B) *C. albicans* + fração F10; (C) *C. albicans* + fração F11; (D) *C. albicans* + fração F12. A concentração utilizada de cada fração foi 100 μ g.mL⁻¹; os poços numerados 1, 2 e 3 representam as triplicatas para cada ensaio A, B, C e D_____58

Figura 24: Crescimento de células de *C. albicans* (A) após 24 h de incubação na presença das frações F10 (B), F11 (C) e F12 (D), enriquecidas com atividade antitríptica, e usadas na concentração de 100 µg / mL_____59

Figura 25: Microscopia de fluorescência das células da levedura *C. albicans* tratadas com o corante Sytox Green. Em A e B, são as células crescidas na ausência da fração F12; C e D são as células crescidas na presença de 100 µg.mL⁻¹ da fração F12. Em A e B, as células foram visualizadas por DIC e em C e D, as células foram visualizadas por fluorescência. Aumento de 10x_____61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação, distribuição e proteases alvo de inibidores de proteasesserínicas de plantas (adaptada de Habib & Fazili, 2007)7

 Tabela 2: Tabela de purificação do ClfTI de sementes de Clitoria fairchildiana____52

Tabela 3: Viabilidade das células de *Candida albicans* após 24 h de incubação comas frações enriquecidas com atividade anti-tríptica. O plaqueamento foi feito emtriplicata, e os valores são uma média das colônias das três placas60

ABREVIATURAS

- ABS Absorbância
- AC Anidrase carbônica
- AsPIs Inibidor de proteases do tipo Bowman-Birk de sementes de Acacia senegal

BApNA- N- Benzoil- DL-arginil- p- nitrianilida

BCA - Ácido bicinconínico

Bis-acrilamida – N,N'-metileno bisacrilamida

BSA – Albumina bovina sérica

- BTI-CMe Inibidor de tripsina de cevada
- ClfTI Inibidor de tripsina de Clitoria fairchildiana
- Da Dalton
- DAD Detector de arranjo de diodo
- DNS Ácido 3,5-dinitrosalicilico
- EB Extrato bruto
- EBF Extrato bruto fervido
- EC₅₀ Concentração efetiva para inibição de 50% do crescimento
- EDTA Ácido etilenodiaminotetracético
- HPLC Cromatografia líquida de alto pressão
- IBBs Inibidores Bowman-Birk
- IPs Inibidores de proteases
- kDa Quilodaltons
- L4 Larva no quarto estágio de desenvolvimento
- M Marcador de massa molecular
- nm Nanômetro

- OVA Ovalbumina
- PBS Tampao fosfato salino
- PDTI Inibidor de tripsina de *Pelophorum dubium*
- PMSF Fluoreto de fenilmetilasulfonila
- PPTI Inibidor de tripsina de sementes de Poecilanthe paviflora
- RcTI Inibidor de tripsina de Ricinus communis
- SBBI Inibidor de soja do tipo Bowman-Birk
- SDS Dodecil sulfato de sódio
- TCA Ácido tricloroacético
- TEMED N, N, N', N' -tetrametiletilenodiamina
- TFA Ácido trifluoroacético
- Tris Tris-hidroximetil-aminometano
- UAI Unidade de atividade inibitória

RESUMO

Inibidores de proteases são proteínas ou peptídeos capazes de inibirem a atividade de enzimas proteolíticas, caracterizados por seu mecanismo de ação e especificidade. A literatura registra a habilidade de tais proteínas inibirem o crescimento de fungos e a digestão de insetos, sugerindo importante ação antimicrobiana e inseticida. O objetivo do trabalho foi isolar, caracterizar e analisar o potencial antimicrobiana e inseticida de inibidores de sementes de C. fairchildiana, sobre as leveduras *C. albicans* que podem causar candidíase e enzimas digestivas de larvas de A. aegypti causador da dengue, chinkungunya e febre amarela. Proteínas de cotilédones das sementes foram extraídas, quantificadas e visualizadas por SDS-PAGE. A primeira etapa de purificação foi através de cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100. As frações coletadas foram P1, P2 e P3. P1 e P3 inibiram o crescimento de *C. albicans* e P3 inibiu a atividade de papaína, uma protease da classe cisteínica. P2 apresentou atividade inibitória contra tripsina, uma protease da classe serínica. Esta foi submetida a uma cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, numa coluna C8-C18, da qual foram obtidas 14 frações; destas, três (F10, F11 e F12) apresentaram atividade inibitória contra tripsina e três (F2, F3 e F13), contra papaína. As frações F2, F3, F10, F11 e F12 não inibiram o crescimento de *C. albicans.* As frações F10, F11 e F12 não inibiram a atividade das enzimas comerciais α-quimiotripsina, α-amilase, elastase e subtilisina. A fração F11 foi analisada por espectrometria de massas e foram obtidos os fragmentos peptídicos (SIPPQCHCADIR e SCHSACK), cujas seguências mostraram-se similares a de inibidores de tripsina. Por ensaios in vitro, F11, o inibidor de tripsina de C. fairchildiana, inibiu 87,93 % a atividade de enzimas digestivas de larvas no 4º instar de desenvolvimento de A. aegypti. Por zimografia, foi possível visualizar as atividades das enzimas digestivas das larvas de A. aegypti; quando o ClfTI foi incubado com o extrato enzimático do intestino de tais larvas, foi possível visualizar a inibição da maior parte das bandas de atividades enzimáticas presentes nos extratos. O inibidor PMSF inibiu todas as bandas de atividade das enzimas digestivas, porém os inibidores EDTA, E-64 e pepstatina-A não inibiram tais atividades, nas concentrações testadas.

Palavras-chaves: Inibidores de proteases; *Clitoria fairchildiana*; *Aedes aegypti*; Atividade inseticida; Atividade antifúngica; *Candida albicans.*

ABSTRACT

Protease inhibitors are proteins capable of inhibiting the activity of proteolytic enzymes, characterized by their mechanism of action and specificity. The literature reports the ability of such proteins to inhibit fungi growth and insect digestion, suggesting important antimicrobial and insecticide action. The aim of this work was to isolate, characterize and analyze the antimicrobial and insecticide potential of protease inhibitors from C. fairchildiana seeds, on C. albicans yeasts which can cause candidiasis and digestive enzymes of *A. aegypti* larva cause dengue, yellow fever and chinkungunya. Cotyledonary proteins were extracted, guantified and visualized by SDS-PAGE. The first purification stage was a molecular exclusion chromatography on Sephadex G-100. The collected fractions were referred as P1, P2 and P3. Fractions P1 and P3 inhibited *C.albicans* growth, the P3 fraction also inhibited the activity of papain, a protease from the cysteine class. The P2 fraction presented inhibitory activity against trypsin, a protease from the serine class. This P2 fraction was then submitted to an HPLC-reverse phase chromatography, through a C8-C18 column, and separated in 14 fractions; three of them (F10, F11 and F12) presented trypsin inhibitory activity and three others (F2, F3 and F13), papain inhibitory activity. Fractions F2, F3, F10, F11 and F12 did not inhibit the growth of C. albicans. Fractions F10, F11 and F12 did not inhibit the activity of the commercial enzymes α - chymotrypsin, α - amylase, elastase and subtilisin. Fraction F11 was analyzed by mass spectrometry and two peptide fragments (SIPPQCHCADIR and SCHSACK) were obtained, whose sequences showed similarities with trypsin inhibitors. By *in vitro* assays, F11, which was then referred as *C. fairchildiana* trypsin inhibitor (CIfTI), inhibited 87.93 % of the digestive enzyme activities from 4º instar A. aegypti larva. By zymography, it was possible to visualize the larval digestive enzyme activity bands; when CITI was incubated with the larval midgut enzymatic extract, it was possible to visualize the inhibition of most of the protein bands present in the extract. The PMSF inhibitor inhibited all of the digestive activity bands, while the inhibitors EDTA, E-64 and pepstatin-A did not inhibit such activities, at the tested concentrations.

Word-key: Protease inhibitors; *Clitoria fairchildiana*; *Aedes aegypti*; Insecticide activity; Antifungal activity; *Candida albicans*.

XIV

1- Introdução

As sementes são muito importantes na vida das plantas superiores e o sucesso no estabelecimento de uma nova planta é fortemente determinado por características fisiológicas das sementes. Estes órgãos demonstram uma razoável capacidade de defesa contra eventuais agressões e situações de adversidade presentes no meio, e armazenam as reservas necessárias ao desenvolvimento da planta jovem (Bewley & Black, 1994).

A planta, durante todo o seu ciclo de vida, está exposta ao ataque de insetos, microorganismos e outros agentes que afetam sua integridade. Contudo, as plantas também desenvolveram mecanismos para lutar contra esses organismos patogênicos. Isso, a despeito de sua inabilidade para locomoção, possibilitou a sobrevivência das atuais espécies. Nesse sentido, os vegetais conseguem contornar situações adversas, como ataques de pragas ou patógenos e fatores abióticos desfavoráveis (Agrios, 1997). Para tais confrontos, existe um importante meio de regulação envolvendo a modulação de atividades enzimáticas através da interação com inibidores de proteases e as sementes de leguminosas, em particular, são importantes fontes de tais categorias de proteínas.

A procura por novas fontes biológicas de inibidores de proteases é de grande importância na área médica e biotecnológica, e tem, portanto, recebido cada vez mais atenção (Cyran, 2002; Imada, 2005). Também estão entre os principais candidatos a processos de transformação de plantas, com atividade inibitória comprovada contra pragas e pestes, sendo também conhecidos por melhorar a qualidade nutricional dos alimentos (Bijina *et al.*, 2011).

Neste trabalho, tivemos como alvo, para isolamento de proteínas, a espécie *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard que pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, originária do Brasil. A escolha se baseou, em especial, na observação naturalda não predação de sementes de árvores da espécie encontradas na região de estudo e por uma quase total ausência de informações, na literatura, sobre espécies predadoras ou patogênicas que ataquem tal árvore. Excetuem-se os trabalhos relatados na literatura de insetos-peste do tipo lepidópteros desfolhadores, *Urbanus acawoios* (Williams, 1926), (Silva, 1995; Machado, 2000; Trevisan *et al.*, 2004), *Hyperchiria incisa incisa* (Zanuncio et al., 2013) e o trabalho de Gondim-Júnior *et al.* (2005), que relata a ocorrência do psilídeo *Euphalerus clitoriae* em árvores de *C. fairchildiana* da zona urbana de

Recife. Estes últimos autores descrevem que tal inseto coloniza a superfície adaxial de folhas jovens causando danos severos às mesmas. Assume-se, como hipótese deste trabalho, que o conjunto de proteínas defensivas da espécie *C. fairchildiana* é de eficácia elevada e, portanto, como peça deste arsenal, os inibidores de proteases também o seriam. Ressalte-se, no entanto, que nenhum dos relatos acima descritos têm como alvo da predação dos insetos, as sementes desta espécie.

O fato de *C. fairchildiana* ser uma espécie vegetal não domesticada reforça a estratégia de seleção de inibidores de proteases a partir de plantas não hospedeiras de insetos que se pretendem controlar, conforme proposto por Broadway (2000). Tais inibidores são fortes candidatos a ter ação bioinseticida, e podem ser expressos em plantas comercialmente importantes, como a soja, o feijão-comum e o feijão de corda, produzindo espécies vegetais transgênicas resistentes a seus predadores específicos.

Durante os últimos anos nosso grupo vem isolando e caracterizando diferentes proteínas pertencentes a diversas espécies de plantas como *Vigna unguiculata*, *Vigna vexillata*, *C. fairchildiana* e *Adenanthera pavonina*, as quais estariam diretamente envolvidas nos mecanismos de defesa de plantas.

Cistatinas de atividade inibitória contra crescimento de insetos fitopatogênicos e fungos têm sido alvo de investigações do grupo. Uma cistatina de 87 kDa, isolada de plantas transgênicas de tomate super-expressando pró-sistemina, apresentou atividade antifúngica contra *Trichoderma viride* e *Fusarium solani* (Siqueira-Júnior *et al.*, 2002). Da mesma forma, foi isolada uma cistatina com elevada atividade antifúngica de sementes de *V. vexillata*, uma espécie não domesticada do gênero *Vigna* (Cunha *et al.*, 2007). Tal cistatina tem como aspecto interessante adicional, o fato de ter sido detectada em fluido apoplástico de sementes e imunolocalizada em espaços celulares ectópicos.

Devido à importância dos inibidores de proteases em plantas, o presente trabalho descreve a purificação de um inibidor de tripsina de sementes de *C. fairchildiana* (ClfTI) e a caracterização da atividade inibitória sobre a atividade de enzimas digestivas de larvas do mosquito *Aedes aegypti*, causador da dengue, chinkungunya e febre amarela, doenças arbovirais comuns em regiões tropicais e subtropicais, e a avaliação da atividade biológica do ClfTI contra a levedura *Candida albicans*, que podem causar candidíase em humanos e mastite, em vacas em lactação, influenciando negativamente o desenvolvimento da produção de leite.

1.1- Proteases e seus inibidores protéicos

Proteases são enzimas proteolíticas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas de outras proteínas. As proteases são classificadas como endo e exopeptidases, segundo Storey & Wagner (1986). Endopeptidases, também chamadas de proteinases, são enzimas que clivam ligações peptídicas internas, na porção N-terminal. Já as exopeptidases se dividem em aminopeptidases, que retiram aminoácidos da extremidade N-terminal e carboxipeptidases, que removem aminoácidos a partir da extremidade C-terminal. Todas as proteases polarizam o grupo carbonil da ligação peptídica do substrato alvo pela estabilização do oxigênio em um buraco oxianiônico, o que faz com que o átomo de carbono se torne mais vulnerável para o ataque de um nucleófilo ativado. O nucleófilo é determinante para o mecanismo utilizado na catálise enzimática, que pode ocorrer de quatro formas, de maneira a agrupar as proteases em quatros principais classes catalíticas: proteases cisteínicas, proteases serínicas, metaloproteases e proteases aspárticas (Dunn, 2001).



Classe catalítica	Nucleófilo	Estabilizador oxianiônico
Proteases cisteínicas	Cys-His	-NH-(2x)
Proteases serínicas	Ser-His	-NH-(2x)
Metaloproteases	H ₂ O-Me ²⁺	Me ²⁺
Proteases aspárticas	H₂O-Asp	H⁺-Asp

Figura 1: Mecanismo de catálise enzimática das quatro classes de enzimas proteolíticas. Retirado e adaptado de Van Der Hoorn (2008).

As proteases estão amplamente distribuídas em quase todas as plantas, animais e micro-organismos (Habib & Fazili, 2007). São enzimas indispensáveis para a manutenção e sobrevivência dos organismos, desempenhando um papel fundamental em muitos processos biológicos. Os eventos proteolíticos catalisados por estas enzimas podem servir como mediadores na transmissão de sinais do início ao fim de eventos celulares tais como inflamação, apoptose, vias de coagulação sanguínea e sinalizações hormonais (Ivanov *et al.*, 2006).

Apesar de estas enzimas serem indispensáveis para as células e para os organismos nos quais estão presentes, podem ser potencialmente prejudiciais se houver uma super expressão das mesmas ou se forem expressas em momentos metabólicos inapropriados. Por esta razão, sua atividade precisa ser estritamente regulada e controlada (Rawlings *et al.*, 2004). Um importante mecanismo de controle destas enzimas envolve a interação com proteínas, que podem inibir a sua atividade. Estes inibidores tornam complexos enzimas/substratos menos ativos ou completamente inativos ao se ligarem com as enzimas, e são denominados inibidores de proteases (IPs) (Habib & Fazili, 2007).

Inibidores de proteases (IPs) são moléculas que se caracterizam principalmente por seu mecanismo de ação e sua especificidade. O mecanismo de ação dos inibidores pode ser dividido em reversível ou irreversível, onde, neste último caso, a ligação é definitiva no sítio catalítico (Smith & Simons, 2005).

No reino vegetal, é muito comum a ocorrência de IPs, principalmente nos órgãos reprodutivos e de reserva, tais como os tubérculos e sementes, mas também já foram encontrados em outras partes das plantas (De Leo *et al.*, 2002). Os IPs podem apresentar diversas funções, tais como proteínas de reserva, agentes reguladores de proteases endógenas e agentes de proteção contra ação de proteases exógenas de pragas e pestes (Ryan, 1990; Kato, 2002). Podem ainda ser sintetizados constitutivamente durante o desenvolvimento normal da planta ou podem ser induzidos, em tecidos vegetativos, em resposta ao ataque de insetos e patógenos (Ryan & Pearce, 1998).

Diversos estudos sobre IPs foram publicados com o objetivo de investigar o seu papel no mecanismo de defesa de plantas contra insetos, fungos, bactérias e ataques de pragas (Haq *et al.*, 2004; Dunaevsky *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2011; Rufino *et al.*, 2013).

O desenvolvimento de plantas transgênicas que expressam genes adicionais de IPs tem sido relatado como estratégia de enorme potencial para intervir em um grande número de processos em que atuem proteases que se desejem controlar, sejam elas relacionadas a predadores de plantas, sejam ainda relacionadas a processos patológicos em animais (Habid & Khalid, 2007). Neste contexto, o estudo do mecanismo de inibição e características estruturais de novos inibidores, com especificidades diferentes de ação contra variadas proteases, é fundamental para a total exploração dessa valiosa ferramenta biotecnológica.

1.1.1- Inibidores de proteases serínicas em plantas

Inibidores de proteases serínicas estão presentes em todo reino vegetal e têm sido descritos em muitas espécies de plantas, principalmente, entre as famílias de Leguminosae, Solanaceae e Gramineae, representando a classe de inibidores mais estudada (Haq *et al.*, 2004).

Os ininidores são classificados em sete famílias distintas (tabela 1). A classificação é realizada com base na seqüência de aminoácidos, na localização do sítio ativo, na topologia das pontes dissulfeto, no mecanismo de ação, na estrutura tridimensional e na estabilidade ao calor e a agentes de desnaturação (De Leo *et al.*, 2002). As informações sobre os inibidores e suas proteases podem ser encontradas no banco de dados MEROPS (http://merops.sanger.ac.uk/).

As duas famílias de inibidores de proteases serínicas melhor caracterizadas em plantas são os inibidores do tipo Kunitz e inibidores do tipo Bowman-Birk (Ascenzi *et al.*, 2003). **Tabela 1:** Classificação, distribuição e proteases-alvo de inibidores de proteasesserínicas de plantas (adaptada de Habib & Fazili, 2007).

Família (MEROPS)	Exemplo	Enzima alvo	Fonte	Referência
Kunitz (I3 A)	Inibidor de tripsina/inibidor de	Tripsina; Quimiotripsina	Glycine max	Laskowski e Kato (1980)
	subtilisina	Subtilisina; α-amilase	Hordeum vulgare	Vallee <i>et</i> <i>al</i> .(1998)
	Inibidor de quimiotripsina	α-Quimiotripsina	Psophocarpus tetragonolobus	Habu <i>et al.</i> (1992)
	Inibidor de subtilisina	Proteases serínicas microbianas do tipo	Canavalia lineata	Terada <i>et al.</i> (1994)
Kunitz (I3 B)	Inibidor de proteinase	Tripsina, quimiotripsina	Sagittaria sagittifolia	Laskowski e Kato (1980)
	Inibidor de cathepsina D	Cathepsina D; Tripsina e α-Quimiotripsina	Acacia confusa Solanum tuberosum	Lin <i>et al.</i> (1991) Strukelj <i>et al.</i> (1992)
Cereal (I 6)	Inibidor de α-amilase e tripsina	α-amilase; tripsina	Triticum aestivum	Shewry <i>et al</i> . (1984)
	Inibidor de α-amilase e tripsina	α-amilase; tripsina	Hordeum vulgare	Lazaro <i>et al.</i> (1988)
Abóbora(I 7)	Inibidor de tripsina macrocíclico de abóbora	Tripsina	Momordica cochinchinensis	Hernandez <i>et al</i> .(2000)
	Inibidor de tripsina CSTI-IV	Tripsina	Cucumis sativus	Wieczorek <i>et</i> <i>al</i> . (1985)
Batata tipo I (I 13)	Inibidor de quimiotripsina I	Quimiotripsina; Tripsina	Solanum tuberosum	Poerio <i>et al.</i> (2003)
	Inibidor de quimiotripsina/ subtilisina	Subtilisina; α- quimiotripsina	Triticum aestivum	Richardson (1974)
Batata tipo II (I 20)	Inibidor de protease II	Tripsina; Quimiotripsina	Solanum tuberosum	Greenblatt <i>et al.</i> (1989)
Mostarda (I 18)	Inibidor de tripsina	β-tripsina Tripsina;	Sinapis alba	Menegatti <i>et</i> <i>al</i> . (1992)
	Inibidor de tripsina	Quimiotripsina	Brassica napus	Ceciliani <i>et</i> <i>al</i> . (1994)
Bowman- Birk (I 12)	Inibidor de tripsina cíclico	Tripsina; quimiotripsina; Elastase	Helianthus annuus	Mulvenna <i>et</i> <i>al</i> . (2005)
	Inibidor de tripsina/ quimiotripsina	Tripsina; Quimiotripsina	Arachis hypogaea	Suzuki <i>et al.</i> (1987)

1.1.2- Família de inibidores Bowman-Birk (IBBs)

A família dos inibidores do tipo Bowman-Birk (IBBs) foi nomeada assim, pois Donald Bowman e Yehudith Birk foram os primeiros pesquisadores a identificarem e caracterizarem esses inibidores em soja (*Glycine max*) (Bowman, 1946; Birk *et al.*, 1963) com características distintas. O inibidor desta família melhor estudado é o SBBI – "Soybean Bowman-Birk Inhibitor" (figura 2), formado por 71 resíduos de aminoácidos e dois sítios ativos, o primeiro para tripsina e o segundo para quimiotripsina (Habid & Khalid, 2007). Esta família de inibidores é geralmente encontrada em sementes de leguminosas (Norioka & Ikenaka, 1983) e de gramíneas (Odani *et al.* 1986), mas também já foi relatada em folhas de milho com feridas induzidas (Eckelkamp, 1993).



Figura 2: Estrutura primária de inibidor de soja da família de Bowman-Birk (BBSI). A estrutura primária do BBSI mostra a organização das sete pontes dissulfeto. Os dois sítios ativos localizados nos "loops" e a posição dos resíduos P1 dos sítios ativos para tripsina (Lisina 16-Serina 17) e quimiotripsina (Leucina 44-Serina 45) estão indicados (Odani & Ikenaka, 1973 a, b).

Em plantas, essa família de inibidores possui respresentantes tanto em monocotiledôneas quanto em dicotiledôneas. Em dicotiledôneas, o primeiro sítio ativo é, geralmente, específico para tripsina, e o segundo inibe tripsina, quimiotripsina ou elastase (Qi *et al.*, 2005). A configuração do sítio ativo desses inibidores é estabilizada pela presença de sete pontes dissulfeto conservadas que

minimizam a entropia conformacional e aumentam sua estabilidade (Chen *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1993).

Em dicotiledôneas, os IBBs apresentam massa molecular que varia de 8 a 10 kDa, possuem dupla cabeça, com dois domínios homólogos e os sítios ativos separados para cada protease. Esses inibidores interagem de forma independente, de forma simultânea com duas proteases, que podem ser iguais ou diferentes (Raj *et al.*, 2002).

Os inibidores de Bowman-Birk em monocotiledôneas são de dois tipos. O primeiro grupo é constituído por uma única cadeia polipeptídica com massa molecular de cerca de 8 kDa, com apenas um sítio ativo, enquanto que o segundo grupo apresenta massa molecular em torno de 16 kDa, com dois sítios ativos, também ditos dupla cabeça (Tashiro *et al.*, 1987, 1990; Prakash *et al.*, 1996; Habid & Khalid, 2007). Tem sido sugerido que os inibidores maiores surgiram a partir dos inibidores menores por fusão e duplicação gênica (Odani *et al.*, 1986). Acredita-se que os IBBs de dicotiledôneas podem ter evoluído a partir de um ancestral de IBB de uma cabeça, por duplicação, fusão e mutação de genes. Também tem sido sugerido que, durante a evolução, um dos sítios reativos dos IBBs de dupla cabeça de 8 kDa se tornou não funcional resultando nos IBB de única cabeça de 8kDa das monocotiledôneas (Song *et al.*, 1999).

No caso de IBBs com dupla cabeça, foi verificado que a afinidade de ligação à protease é alterada quando um dos sítios já está ocupado, como relatado no trabalho de Tur-Sinal *et al.* (1972), onde um inibidor de amendoim (*Arachis hypogoea*) não apresentou nenhuma atividade contra quimiotripsina quando estava pré-ocupado com tripsina e vice-versa.

1.1.3- Família de inibidores do tipo Kunitz

A classificação dos inibidores do tipo Kunitz é baseada em homologias de seqüência. Essa família de inibidores é muito difundida em plantas e tem sido descrita em legumes, cereais e em espécies de solanáceas, sendo também expressos sob condições de estresse (Laskowski & Kato, 1980; Ishikawa *et al.*, 1994). Apresentam massa molecular de 18 a 24 kDa, geralmente com quatro resíduos de cisteína que formam duas pontes dissulfeto, proporcionando estabilidade à estrutura protéica e possuem um único sítio ativo com um resíduo de arginina, localizado em um dos "loops" da proteína (Richardson, 1991). Inibidores

com um sítio ativo são chamados de inibidores com uma cabeça; alguns outros inibidores dessa família foram caracterizados como inibidores dupla-cabeça, com dois sítios ativos (Richardson, 1991).

Os membros desta família são mais ativos contra tripsina, mas também são capazes de inibir a quimiotripsina e subtilisina (McManus & Laing, 2002; Park *et al.*, 2005). Outras proteases também foram inibidas, incluindo proteases aspárticas do tipo catepsinas D e a protease cisteínica, papaína (Habib & Fazili, 2007).

Em 2010 esta família foi subdividida em três grupos, de acordo com conteúdo de cisteínas, quando não apresentam nenhum ou um resíduo de cisteína; com dois ou três resíduos; quatro ou mais resíduos de cisteína (Oliva *et al.*, 2010; Macedo *et al.*, 2015). Em relação ao número de pontes dissulfeto nesta família, possivelmente um ancestral com duas ou mais pontes dissulfeto conduziram a derivação de grupos com e sem pontes dissulfeto (Habib & Fazili, 2007).

Esses inibidores têm sido estudados quanto ao seu mecanismo de ação contra proteases serínicas (Iwanaga *et al.*, 2005) e participação em diversas atividades biológicas, como atividade antibiótica (Lima *et al.*, 2011) e antifúngica (Wang & Ng, 2006). Também formam um importante grupo de proteínas de defesa em plantas, devido à sua habilidade de inibir a atividade de proteases serínicas digestivas de insetos (Bhattacharyya *et al.*, 2007), suprimindo o crescimento e desenvolvimento larval (Macedo *et al.*, 2004).

1.2- Atividade inseticida de inibidores de proteases

Inibidores de proteases têm recebido muita atenção por sua capacidade em inibir proteinases digestivas de insetos (Macedo *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2005), dificultando o crescimento e desenvolvimento quando os insetos são alimentados com esses inibidores (Macedo *et al.*, 2004). Os efeitos deletérios desses inibidores contra insetos pragas têm sido descritos tanto a partir de ensaios *in vitro* como de ensaios *in vivo* (Bhattacharyya *et al.*, 2007).

Na literatura existem vários relatos de inibidores de tripsina do tipo Kunitz capazes de inibir a atividade proteolítica de lepidópteros, como *Anagasta kuehniella* (Macedo *et al.*, 2003) e *Spodoptera litura* (Bhattacharyya *et al.*, 2007); Coleópteros, *Callosobruchus maculatus* (Macedo *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2007) e *Zabrotes subfasciatus* (Gomes *et al.*, 2005); Dípteras, tais como *Ceratitis capitata* (Gomes *et al.*, 2009).

O inibidor de tripsina BTI-CMe de cevada, codificado pelo gene *ltr1*, está envolvido na via de defesa dessa planta. Este gene é especificamente expresso em endosperma de cevada e a proteína BTI-CMe mostrou ser ativa *in vitro* contra proteases do tipo tripsina da lagarta *Spodoptera frugiperda* (Alfonso *et al.*, 1997). Arroz, trigo e tabaco transgênicos que expressam esta proteína foram testados contra vários herbívoros-praga e mostraram um impacto negativo sobre o seu desenvolvimento (Lara *et al.*, 2000; Alfonso *et al.*, 2003).

Durante o desenvolvimento de sementes de grão-de-bico (*Cicer arietinum*), vários isoinibidores de tripsina do tipo Kunitz foram diferencialmente expressos e o nível destes inibidores aumentou progressivamente durante todo o desenvolvimento da semente. Tais inibidores apresentaram atividade inibitória contra tripsina, quimiotripsina e proteases intestinais de *Helicoverpa armigera* (principal praga da soja, podendo atacar milho e tabaco) e proteases bacterianas. O pico de expressão deste inibidor ocorreu durante o ataque da praga *H. armigera*. Quando as larvas *de H. armigera* foram criadas em uma dieta contendo inibidores de proteases, ocorreu o retardo do crescimento e a redução total da atividade de proteases tripsinas-símile (Harsulkar *et al.*, 1999).

Uma proteína obtida de sementes de *Albizia kalkora* de 19,7 kDa apresentou atividade inibitória sobre tripsina (Zhou *et al.*, 2008), foi identificada como pertencente à família de inibidores do tipo Kunitz, sendo estável em pHs de 2 a 12 e acima de 80^o C e sob condições redutoras. Apresentou uma potente inibição das proteases do tipo tripsina de *H. armigera*, *Spodoptera exigua* e *Pieris rapa*. Outro inibidor de tripsina semelhante é o de *Cassia obtusifolia* de 19,8 kDa (Wei *et al.* 2007). Ambos os inibidores apresentam um elevado grau de similaridade com diferentes membros da família de inibidores do tipo Kunitz (Wei *et al.*, 2007).

Um inibidor (PdKI-2) de sementes *Pithecelobium dumosum* de 18,1 kDa com uma única cadeia polipeptídica, mostrou atividade de inibição contra tripsina, sendo estável a intervalo de pH de 2-10 a 50 °C. Também mostrou atividade contra papaína, sendo eficaz contra proteases digestivas dos coleópteros *Z. subfasciatus* e *C. maculatus*; do díptera *Ceratitis capitata*; dos lepidópteros *Plodia interpunctella* e *Alabama argillacea*, com 74,5, 70,0, 70,3, 48,7, e 13,6% de inibição, respectivamente. O PdKI-2 é um membro da família de inibidores do tipo Kunitz e os seus efeitos sobre as enzimas digestivas de larvas de diversas ordens indicam a sua potencial utilização como um agente bioinseticida (Oliveira *et al.*, 2007). O inibidor de tripsina do tipo Kunitz de sementes de *Crotalaria pallida* (CpaTI) possui massa de 32,5 kDa composto por duas subunidades com 27,7 e 5,6 kDa ligadas por pontes de dissulfeto e estável a 50 °C, apresentou estabilidade em pH entre 2 e 12 a 37° C, mas perdeu 40% de sua atividade a 100 °C. Também se mostrou ativo contra as enzimas comerciais quimiotripsina, elastase e papaína, bem como contra enzimas digestivas de *Spodoptera frugiperda*, *Alabama argillacea*, *Plodia interpunctella*, *Anthonomus grandis* e *Z. subfasciatus* em diferentes graus (Gomes *et al.*, 2005). Em bioensaios realizados com *C. maculatus* e *Ceratitis capitata*, ambos foram susceptíveis ao CpaTI, especialmente o primeiro inseto, cujas larvas foram afetadas em baixas concentrações (Gomes *et al.*, 2005).

O inibidor de tripsina PPTI de 16 KDa de sementes de *Poecilanthe parviflora* (Papilionaceae, Leguminosae), uma árvore nativa do Brasil, apresentou uma única cadeia polipeptídica e foi estável em uma ampla gama de temperaturas, pHs e na presença de DTT. O PPTI inibiu a atividade de enzimas tripsinas-símile de intestino médio de larvas de *Diatreae saccharalis, Anagasta kuehniella, Spodoptera frugiperda*, e *Corcyra cephalonica* (Garcia *et al.*, 2004).

Babu & Subrahmanyam (2010) isolaram inibidores de proteases do tipo Bowman-Birk de sementes de *Acacia senegal* (AsPIs) com atividade contra proteases serínicas e avaliaram o potencial biológico contra *H. armigera*. O AsPI (5µg/ml) inibiu aproximadamente 70 % da atividade de tripsinas do intestino médio e 61 % de enzimas do tipo quimiotripsina, quando as larvas foram alimentadas com o AsPI, o inibidor retardou o desenvolvimento e o crescimento de *H. armigera* e também afetou a fecundidade da praga.

Um inibidor de tripsina obtido de sementes de *Peltophorum dubium* (PDTI), com massa de 20 kDa apresentou similaridade com sequência de outros inibidores de tripsina do tipo Kunitz. Quando insetos *Anagasta kuehniella* foram alimentados com uma dieta artificial na presença do PDTI o inibidor atrasou o desenvolvimento desse lepidóptero. A concentração de inibidor na dieta necessária para causar uma redução de 50% no peso de larvas de quarto ínstar foi aproximadamente de 1%. A ação do inibidor de *P. dubium* contra *A. kuehniella* pode envolver inibição da atividade de tripsinas-símile presentes no intestino médio de larvas, a resistência do inibidor à digestão por enzimas intestinais ou à associação do inibidor com

Muitos insetos desenvolveram mecanismos múltiplos de adaptação para superar os efeitos dos inibidores de proteases (Gatehouse, 2011). Devido o processo de co-evolução entre insetos e plantas, um caminho possível para obter resultados satisfatórios usando inibidores de proteases no controle de pragas é avaliar o potencial desses inibidores purificados a partir de pragas não relacionadas a plantas hospedeiras naturais, o que tornaria a adaptação dos insetos-praga, à nova dieta, mais difícil (Jongsma e Bolter, 1997). Outra possibilidade é a expressão de inibidores de proteases fusionados a outras toxinas em plantas transgênicas (Jamal *et al.*, 2013).

1.3- Atividade antifúngica de inibidores de proteases

O interesse por proteínas, principalmente isoladas de plantas, com a capacidade de inibir a atividade de proteases e que concomitantemente possuam atividade antimicrobiana, tem despertado a atenção de muitos pesquisadores e vários trabalhos vêm relatando tais ações. Os inibidores de proteases estão envolvidos na defesa das plantas, devido à implicação de proteases extracelulares de micro-organismos em patogênese e o papel digestivo de proteases em herbívoros. Esta função protetora é suportada por evidências de sua habilidade de inibir *in vitro* ambas proteases digestivas de herbívoros e proteases envolvidas no crescimento de patógenos de plantas (Haq *et al.*, 2004; Valueva & Mosolov, 2004).

Ye *et al.* (2001) purificaram um peptídeo com massa molecular de 7,5 kDa de uma leguminosa, com homologia de seqüência com inibidores de proteases serínicas e também possuía atividade antimicrobiana. Essa ação foi observada ao inibirem o crescimento dos fungos *Mycosphaerella arachidicola*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*, na concentração de 60 µM.

Uma proteína denominada Psc-AFP, com massa molecular de 18 kDa, foi isolada de *Psoralea corylifolia* L. e através de seqüenciamento parcial da região N-terminal, foi verificado que esta tinha homologia com inibidores de tripsina de plantas. A partir deste dado, foi testada a capacidade de Psc-AFP de inibir tripsina e foi verificada que sua atividade foi dose-dependente, sendo que na presença de 100 µg.mL⁻¹ ainda se detectava atividade da tripsina e na presença de 900 µg.mL⁻¹ nenhuma atividade foi mais notada. A atividade antimicrobiana desta proteína também foi testada contra os fungos *Alternaria niger, Aspergillus brassicae, Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia cerealis* e demonstrou-se que, na presença de

10 μM de Psc-AFP, todos os fungos testados tiveram seu crescimento inibido, principalmente *A. niger*, *A. brassicae* e *R. cerealis*, os quais sofreram uma inibição mais evidente (Yang *et al.*, 2006).

Estudos relacionados ao papel antimicrobiano de inibidores de proteases serínicas também foram relatados por Lopes *et al.* (2009). Isoformas de inibidores de proteases serínicas do tipo Kunitz, com massa molecular de 20 kDa cada, foram isolados de sementes de *Acacia plumosa* Lowe e denominados ApTIA, ApTIB e ApTIC. Com esses inibidores, foram feitos ensaios de caracterização de suas propriedades estruturais e também testes de atividade biológica, na presença de diferentes fungos fitopatogênicos. Foi observado que as isoformas possuíam duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfeto e apresentavam diferentes pontos isoelétricos com natureza ácida, sendo inibidores muito estáveis, tanto em valores extremos de pH quanto em altas temperaturas, com ponto de desnaturação próximo a 75 °C. Em relação à capacidade de inibição, notou-se que todas as isoformas foram capazes de inibir o crescimento dos fungos *Aspergillus niger, Thielaviopsis paradoxa* e *Colletotrichum sp.*

Um inibidor de tripsina do tipo Kunitz de 20,5 kDa com atividade antifúngica, foi detectado em raízes de *Ginseng* (*Pseudostellaria heterophylla*) (Wang & Ng, 2006).

Em 2011, Carrilo *et al.* analisaram a capacidade antifúngica *in vitro* do inibidor de cevada BTI-CMe contra três fungos fitopatogênicos, *Magnaporthe grisea*, *Plectosphaerella cucumerina* e *F. oxysporum*, e duas bactérias patogênicas de plantas, *Dickeya dadantii* e *Pseudomonas syringae*. O inibidor BTI-CMe foi capaz de inibir o crescimento dos três fungos testados, com valores de concentrações efetivas para inibição de 50% do crescimento (EC50) de 1,23 µM para *Magnaporthe grisea*, 2,5 µM para *Plectosphaerella cucumerina* e 1,52 µM para *F. oxysporum*. O inibidor foi capaz de inibir a germinação de esporos e o desenvolvimento micelial dos três fungos testados, porém não houve alteração morfológica, quando as células fúngicas foram observadas por microscopia. Não houve efeito do inibidor de protease serínica testado contra as bactérias fitopatogênicas *D. dadantii* ou *P. syringae*, nas concentrações até 6 µM.

O inibidor de tripsina de *Ricinus communis* L. (RcTI) na concentração de ~46,4 μM (13 μg) foi capaz de inibir a germinação de esporos do fungo

fitopatogênico *Colletotrichum gloeosporioides* e inibiu em 91% a atividade das proteases intestinais de larvas de *Aedes aegypti* (Silva *et al.*, 2015).

Atividade microbicida de fitocistatinas tem sido relatada em diversos trabalhos. A cistatina de *Vigna vexillata* foi vista como capaz de inibir em 100% o crescimento do fungo fitopatogênico *Fusarum solani*, causando também um drástico efeito sobre a formação de hifas, em concentração de 200 μg/mL (da Cunha *et al.*, 2007). Martinez *et al.* (2005) mostraram que a cistatina recombinante de morango, FaCIP-1, inibiu o crescimento dos fungos *Botritis cinerea*, a uma concentração de 3 μM, e *Fusarium oxysporum*, em concentrações de 6 μM. Ambas as cistatinas de morango e *V. vexillata* inibiram os processos de germinação de esporos e desenvolvimento micelial dos fungos testados.

Uma cistatina de folhas de tomate, quando testada em uma concentração de 200 μ g /mL (Siqueira-Júnior *et al.*, 2002), inibiu cerca de 50% do crescimento dos fungos *Trichoderma viride* e *Fusarium solani*. Abraham *et al.* (2006) demonstraram que seis de sete cistatinas de cevada foram capazes de inibir o crescimento dos fungos *Botrytis cinerea* e *F. oxysporum*, sendo as cistatinas HvCPI-2 e HvCPI-6 as duas mais eficazes quando calculadas as EC₅₀, as quais foram <1,5 μ M para ambos os fungos. Os experimentos realizados por Yang e Yeh (2005), com cistatinas de tubérculos de inhame (*Colocasia esculenta*), mostraram que em concentrações de 150 μ g/mL, o crescimento micelial de *Sclerotium rolfsii Sacc*. foi inibido.

O mecanismo de atividade antifúngica de fitocistatinas, no entanto, não é completamente entendido. Martinez *et al.* (2003) demonstraram, por mutagênese sítio-dirigida, que a inibição de *B. cinerea* pela cistatina de cevada não está associada com a propriedade inibitória de proteinases cisteínicas desse inibidor. Especula-se que alterações na permeabilidade de membranas fúngicas possa ser a origem dos problemas causados pelas fitocistatinas nestes organismos. Alterações de permeabilidade de membrana foram também detectadas quando a orizacistatina OC-I foi expressa no compartimento citossólico de células de folhas de tabaco (Van de Vyver *et al.*, 2003). No entanto, Yang e Yeh (2005) sugeriram que a inibição de crescimento do fungo fitopatogênico *Sclerotium rolfsii* causada por uma cistatina de tubérculos de *Colocasia esculenta* relacionava-se diretamente a inibição de uma proteinase cisteínica do fungo. Já em relatos de Joshi *et al.* (1998), especulou-se que a cistatina de milheto (*Pennisetum glaucum*) inibirie proteases cisteínicas do fungo *Trichoderma reesei* e de espécies fúngicas dos gêneros *Claviceps*,

Helminthosporium, Curvularia, Alternaria e *Fusarium*, proteases estas que estariam, por sua vez, envolvidas com a ativação da quitina sintase, comprometendo indiretamente o crescimento micelial.

Conclui-se, portanto, que trabalhos adicionais são necessários para o estabelecimento dos mecanismos de ação antifúngica de inibidores das diferentes classes sobre diferentes patógenos.

1.4- Leveduras – Candidas albicans

As leveduras são fungos que se diferenciam por se apresentarem predominantemente sob a forma unicelular; se reproduzem comumente por brotamento e não possuem hifas ascogênicas e ascocarpos. Algumas podem ser encontradas no solo, água, esgoto e até no trato digestivo de mamíferos (Alexopoulos *et al.*, 1996). Sua parede é composta predominantemente por polissacarídeos, mais especificamente mananas, β -1,3 e β -1,6-glucanos e quantidades menores de quitina, sendo esta encontrada principalmente nas cicatrizes do broto (Baladrón *et al.*, 2002). Dentre os eucariotos, as leveduras foram os primeiros organismos a terem seu mapa genético completamente sequenciado (Goffeau *et al.*, 1996).

Candida albicans é uma levedura patogênica comum de humanos que coloniza a pele e mucosas da maioria dos indivíduos saudáveis, sendo muito importante por causarem severas infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos, incluindo aqueles que são submetidos à quimioterapia no tratamento de câncer, em pessoas diabéticas e em crianças prematuras (Isola *et al.*, 2009). Além disso, podem também provocar infecções localizadas ou disseminadas como candidíase, meningite, infecções no sangue, entre outras (Alexopoulos *et al.*, 1996).

1.5- Ação de inibidores de proteases sobre o desenvolvimento de Aedes aegypti

O mosquito *A. aegypti* pertence à ordem Diptera e família Culicidae e é o principal agente etiológico da dengue, febre amarela e de febre chikungunya. A família Culicidae é subdividida em três subfamílias: Anophelinae, Culicinae e Toxorhynchitinae, sendo o gênero *Aedes* o principal da subfamília Culicinae. Esta subfamília é a maior entre as três, abrangendo cerca de 3.000 espécies agrupadas

em, aproximadamente, 24 gêneros diferentes, sendo que a grande maioria tem como hábito alimentar a hematofagia (Gwards & Collins, 1996). São bem adaptados às áreas urbanas, resultando em um problema de saúde pública (Mackenzie *et al.*, 2004).

O ciclo de vida do mosquito *A. aegypti* (figura 3) é dividido em quatro estágios diferentes de vida: o ovo, larva, pupa e a fase adulta do mosquito. O ciclo biológico varia em média de 8 a 12 dias, sendo a ovoposição feita próxima a locais inundáveis. Assim, o mosquito *A. aegypti* se adaptou a depositar os ovos nas paredes de recipientes que acumulam água (Natal, 2002).

O mosquito *A. aegypti* apresenta metamorfose completa. Quando os ovos entram em contato com a água passam para o estágio de larvas, as quais se alimentam de matéria orgânica e crescem, passando por quatro estádios de desenvolvimento. No final do quarto estágio, há a reorganização do corpo formando um estágio de pupa, que não se alimenta e após a metamorfose completar-se dentro da cutícula pupal, em aproximadamente 2 dias, o adulto emerge na superfície da água. Os adultos apresentam dimorfismo sexual, apresentando diferenças entre machos e fêmeas na morfologia dos palpos maxilares, das antenas e dos segmentos abdominais terminais (Nasci & Miller, 1996).



Figura 3: Ciclo biológico do mosquito *A. aegypti* com as quatro fases: Mosquito, ovo, larva e pupa. Adaptado de http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/textos/oportunista.html.

As fêmeas de *A. aegypti* transmitem o vírus picando um indivíduo que se encontra em fase virêmica da doença (fase aguda de infecção, em torno de 4 a 5 dias após a picada). Após este período, o vírus multiplica-se no epitélio intestinal do mosquito, atinge a hemocele e dissemina-se por diferentes tecidos. Após um período de incubação, em torno de 7 - 14 dias, o vírus chega às glândulas salivares e o inseto torna-se apto a transmitir o vírus dengue para um novo hospedeiro humano, na ocorrência de repetidas alimentações (Mcbride, 2000). No homem, o período de incubação é de 5 a 7 dias. A fêmea do mosquito também pode transmitir o vírus imediatamente de uma pessoa infectada para outro indivíduo, pela mudança do hospedeiro quando o repasto sanguíneo é interrompido (OMS, 1995).

O controle do vetor até o momento parece ser a única forma de controlar a doença. Tal controle é feito através da eliminação dos criadouros potenciais dos mosquitos vetores, aplicação de larvicidas em depósitos de água de consumo e uso de inseticidas para as formas adultas, durante os períodos de transmissão. Os inseticidas usualmente usados são os organofosforados e piretróides. Os principais

problemas do uso destes inseticidas são o surgimento de populações resistentes de mosquitos a esses produtos e os danos ambientais provocados por seu uso intensivo (Barreto, 2005).

O controle e eliminação do mosquito *A. aegypti* ainda no estágio larval é o ideal, pois as larvas estão confinadas em áreas restritas inundadas. Com o uso de inibidores de proteases, acredita-se que seria possível interromper o clico reprodutivo e prevenir o desenvolvimento de fêmeas adultas com capacidade de oviposição e capazes de transmitir o vírus causador das doenças.

Em 2007, o genoma do *A. aegypti* foi sequenciado e visto como composto por 1376 bilhões de pares de bases, apresentando um número alto de genes codificadores de enzimas tripsinas-símile (Nene *et al.*, 2007).

A tripsina é uma endopeptidase da classe serínica, caracterizada por uma tríade catalítica formada por histidina, aspartato e serina, que cliva a ligação peptídica no lado carboxil dos L-aminoácidos básicos (Craik *et al.*, 1985). Entre as endopeptidases serínicas, as tripsinas e quimiotripsinas são as proteases digestivas mais encontradas no intestino médio de várias espécies de insetos (Terra & Ferreira, 1994), mas as tripsinas podem diferir na especificidade para o substrato entre os grupos de insetos (Lopes & Terra, 2003). Várias enzimas digestivas de *A. aegypti* já foram identificadas, incluindo tripsinas (Barillas-Mury &Wells, 1993), quimiotripsinas (Jiang *et al.*, 1997), aminopeptidases (Morlais *et al.*, 2003) e carboxipeptidases (Isoe *et al.*, 2009). A expressão de tripsina persiste por todos os estágios de desenvolvimento de *A. aegypti* (Yang & Davies, 1971b).

Soares *et al.* (2011) analisaram o perfil de transcrição de uma tripsina e confirmaram sua expressão apenas na fase larval do inseto. Também foi observado um aumento no nível de sua expressão ao longo de todo desenvolvimento larval em cerca de 5000 vezes, no final dos estágios larvais.

Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores, que mostraram que a atividade de tripsina varia durante as fases do desenvolvimento por causa das mudanças nos hábitos alimentares durante o ciclo de vida do mosquito. No intestino médio de larvas a tripsina é muito ativa, mas sua atividade cai drasticamente após a ecdise (mudança do exoesqueleto do estágio larval) e permanece em níveis baixos no estágio de pupa até adulto, até que a fêmea adulta se alimente com sangue, quando a atividade de tripsina é aumentada gradualmente até 24 horas após o repasto sanguíneo (Yang & Davies, 1971a). A ausência de tripsina em adultos não alimentados pode ser explicada pelo fato da mudança que ocorre na fase de ecdise, onde mais de 90 % das enzimas digestivas são excretadas (Yang e Davies, 1971a).

Em contrapartida, o inibidor de tripsina de *A. aegypti* (AaTI) é expresso tanto em larvas quanto em mosquitos adultos. É sugerido o possível papel do AaTI como um controlador endógeno de enzimas digestivas em larvas, pois ambos são expressos durante o desenvolvimento larval (Soares *et al.*, 2011).

Devido à importância dos inibidores de proteases em plantas, o presente trabalho descreve a purificação de um inibidor de tripsina de sementes de *C. fairchildiana* (ClfTI) e a caracterização da atividade inibitória sobre a atividade e enzimas digestivas de larvas do mosquito *A. aegypti*, causador da dengue, chinkungunya e febre amarela, doenças arbovirais comuns em regiões tropicais e subtropicais, e avaliar a atividade biológica do ClfTI contra a levedura *C.albicans.*

2- Objetivos

2.1- Objetivo geral

Identificação de inibidores de proteases em sementes de *Clitoria fairchildiana* e avaliar o efeito contra enzimas digestivas do inseto *Aedes aegypti* e células da levedura *Candida albicans*.

2.2- Objetivos específicos

1- Isolar e caracterizar inibidores de proteases de cotilédones de sementes de *C. fairchildiana*;

2- Analisar a especificidade enzimática do inibidor de protease serínica isolado contra proteases serínicas comerciais de origens diversas;

4- Avaliar a atividade biológica de inibidores isolados contra enzimas digestivas de larvas de *Aedes aegypti*;

5- Avaliar a atividade de inibidores isolados contra a levedura Candida albicans.
3- Materiais e Métodos

3.1- Material botânico

Sementes de *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard foram coletadas no Campus da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

C. fairchildiana R.A. Howard pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, originária do Brasil. É uma árvore de ocorrência nativa com distribuição geográfica na Região Norte, típica das florestas ombrófilas densas dos estados do Amazonas, Pará, Maranhão e Tocantins. Vem sendo muito utilizada na região Sudeste em arborização rural e urbana, pois proporciona ótima sombra e tem ótimo potencial paisagístico. É utilizada como adubo verde, pois é capaz de fixar nitrogênio. A madeira pode ser empregada na construção civil e possui propriedades medicinais de atividade anti-inflamatória. (<u>www.museunacional.ufrj.br/hortobotanico</u>).

É conhecida popularmente pelos nomes sombreiro, palheira, sombra-de-vaca e faveira. Floresce durante o verão, prolongando-se até abril e maio em certas regiões. Os frutos amadurecem em maio e junho quando se inicia a queda das folhas e produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis (figura 4). É uma planta rústica e de rápido crescimento, muito usada em reflorestamentos de áreas degradadas e preservação permanente (Lorenzi, 2002).



Figura 4: *Clitoria faichildiana* R.A. Howard; indvíduo adulto (A), suas flores (B), vagens (C) e sementes (D). https://sobasombradasarvores.wordpress.com/paubrasil/sombreiro-clitoria-fairchildiana.

3. 2- Criação de células de leveduras

A espécie de levedura *Candida albicans* (cepa CE022) foi crescida e mantida em cultura conservada no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microorganismos (LFBM), do Centro de Biociências e Biotecnologia (CBB), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil.

3. 3- Criação e preparo dos testes utilizando o mosquito Aedes aegypti

Os insetos foram obtidos a partir de colônias de *A. aegypti* (Rockfeller estirpe) e mantidas tal como descrito em Gusmão *et al.* (2010). Os insetos adultos foram alimentados com uma solução de sacarose 10%. As larvas foram mantidas em um recipiente de vidro cheio de água, a temperatura ambiente, e alimentadas com ração comercial picada, no insetário do Laboratório de Biotecnologia da UENF. Larvas no quarto estágio de desenvolvimento (L4) foram utilizadas para extração de proteínas. Para tal, as larvas foram colocadas em gelo durante alguns minutos, para a imobilização e, em seguida, os seus intestinos foram dissecados em tampão fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 7,2 (PBS), de acordo com Moll *et al.* (2001). Os intestinos médios dissecados foram mantidos em gelo até serem submetidos a posteriores procedimentos de extração de proteínas.

4- Métodos

4.1- Extração protéica de cotilédones de Clitoria fairchildiana

Sementes de *C. fairchildiana* foram descascadas para remoção do tegumento e o eixo embrionário também foi retirado. Os cotilédones foram triturados com um processador de alimentos até a formação de uma farinha bem fina. Esta foi tratada duas vezes com metanol 80% na proporção de 1: 5 (p/v) durante 15 min, sob agitação, a 4 °C. A suspensão foi centrifugada por 5 min, a 4.000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi armazenado em geladeira para evaporação do metanol restante. O sedimento livre de pigmentos foi submetido à extração de proteínas, realizado pela adição de tampão fosfato de sódio 0,1 M com NaCl 0,5 M, pH 7,6 na proporção de 1:10 (p/v – 5 g de farinha : 50 ml de tampão). A extração procedeu-se por 90 min sob agitação a 4 °C; passado este tempo, o material foi centrifugado a 12.000 x g durante 15 min a 4 °C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante fervido a 100 °C por 10 min. Após a fervura, o material foi centrifugado novamente a 12.000 x g durante 15 min a 4º C, e o precipitado foi descartado. Em seguida, o sobrenadante obtido (extrato bruto fervido - EBF) foi dializado contra água por 48 horas, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado; o pó resultante foi armazenado a – 20 $^{\circ}$ C.

4.2- Cromatografia de exclusão molecular

Para a purificação de inibidores, inicialmente foi usada uma cromatografia de exclusão molecular em uma matriz Sephadex G-100 com dimensões 70 x 2 cm. A coluna foi montada sob ação da gravidade e depois de devidamente empacotada, a resina foi lavada com 200 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,6.

A coluna de exclusão molecular em Sephadex G-100 foi inicialmente calibrada com as proteínas comerciais albumina sérica bovina (BSA) de 66 kDa, anidrase carbônica (AC) de 29 kDa e lisozima (L) de 14 kDa. Posteriormente o EBF foi então aplicado na coluna (30 mg de pó do extrato EBF foram dissolvidos em 1 mL de fosfato de sódio 0,01 M pH 7,6 - contendo 6,18 mg de proteína). Frações de 1 mL foram coletadas, a um fluxo de 0,3 mL/min. As proteínas foram estimadas por leitura óptica de suas absorbâncias em um espectrofotômetro, a 280 nm. Os picos identificados foram submetidos à diálise contra água por 48 h, liofilizados e armazenados para as próximas etapas.

4.3- Quantificação protéica

A determinação da concentração total de proteínas do extrato bruto fervido (EBF) de sementes de *C. fairchildiana* e de todas as amostras obtidas em etapas posteriores foi feita através do método do ácido bicinconínico, descrito por Smith *et al.* (1985), usando-se ovalbumina (OVA) comercial, como proteína de referência, para elaboração de uma curva padrão.

4.4- Visualização dos perfis protéicos por eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, foi realizada segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada em um sistema vertical Mini Protean II da BIORAD. Foram usadas placas de vidro de 7 x 10 cm e 8 x 10 cm e espaçadores de 1,0 mm. O gel de separação foi preparado numa concentração de 12 ou 15% de acrilamida/bis-acrilamida.

As amostras protéicas obtidas em todas as etapas deste trabalho foram concentradas por liofilização, pesadas e ressuspensas em água destilada, quantificadas (como descrito no item 4.3), acrescidas de tampão de amostra contendo SDS na presença e ausência de β-mercaptoetanol (indicados nas legendas das figuras nos resultados). Estas foram aquecidas por 5 min a 100 °C e centrifugadas a 16.000 x g por 2 min e aplicadas no gel. A separação protéica procedeu-se sob uma voltagem constante de 80 V até as amostras entrarem no gel e 100 V no tempo restante. O gel foi corado em solução de 2% de coomassie brilhante azul R-250 com água, metanol e ácido acético (na proporção de 6:3:1, v/v/v) e posteriormente descorado com uma solução composta de água destilada, metanol e ácido acético na mesma relação de proporcionalidade usada na preparação da solução corante, de acordo com Altschul & Evans (1967).

A revelação por prata também foi utilizada em alguns momentos deste trabalho, seguindo-se a metodologia de Dunn *et al.* (1994). Nesse processo, os géis foram postos em uma solução fixadora (metanol 50%, ácido acético 12%, formol 37%) por 1 h. Após isso, foram lavados com solução de etanol 50% durante 20 min por duas vezes e em seguida, lavados com uma solução de etanol 30% durante 20 min. Subseqüentemente foram realizadas três lavagens com água destilada de 20 min, cada uma. Ao gel, foi adicionada a solução de nitrato de prata (200 mg/100 mL) com mais 75 μ L de formol 100%, o que foi seguido por duas lavagens com água destilada por 20 s, cada. Em seguida, ao gel foi adicionada uma solução de tiossulfato de sódio (6 g/100 mL), formol 100% (50 μ L) e 400 μ L de uma solução de tiossulfato de sódio (1 mg/mL), até o aparecimento das bandas. A partir daí, a solução fixadora foi adicionada novamente para parar a reação da solução com as bandas dos géis, e procedidas três novas lavagens com água destilada de 1 min, cada uma. O gel foi armazenado com uma solução de glicerol 2% por um período de 1 h.

4.5- Eletroforese em gel de tricina na presença de SDS

A eletroforese em gel de tricina foi feita segundo metodologia de Schägger e Von Jagow (1987). Foram usadas placas de vidro de 7x10 cm e 8x10 cm e espaçadores de 0,75 mm. O gel de separação foi preparado numa concentração de 16,4% de acrilamida / bis-acrilamida e o gel de concentração numa concentração de 3,9% de acrilamida / bis-acrilamida. As amostras protéicas liofilizadas foram ressuspensas em água ultrapura, quantificadas (como descrito no item 4.3) e acrescidas de tampão de amostra (Tris 0,125 M, SDS 2,5%, azul de bromofenol 0,25%, β -mercaptoetanol 5% e sacarose 15%). Estas foram aquecidas por 5 min a 100 °C e centrifugadas a 16.000 x g por 2 min. Após este tratamento, 20 µL das amostras foram aplicadas no gel. A corrida foi feita a uma voltagem constante de 20 V por um período de aproximadamente 16 h.

O gel foi corado em solução de 2% de coomassie brilhante azul-R 250 com água, metanol e ácido acético (na proporção de 6:3:1, v/v/v) e posteriormente descorado com uma solução composta de água destilada, metanol e ácido acético na mesma relação de proporcionalidade usada na preparação da solução corante, de acordo com Altschul & Evans (1967).

4.6- Cromatografia de fase reversa em HPLC

O pico 2 (P2) obtido na cromatografia de exclusão molecular foi solubilizado em 1mL TFA 0,1% e injetado em uma coluna C18 (Shim-pack ODS-VP, Shimadzu), ligada a uma coluna de guarda C8 (Pelliguard, Sigma), acopladas a um sistema de RP-HPLC. A coluna foi equilibrada com 0,1% de TFA. A cromatografia foi desenvolvida utilizando-se um fluxo de 0,5mL.min⁻¹, numa temperatura de 37 °C. Para eluição das proteínas da coluna, aplicou-se um gradiente de propanol de 0 a 100%. Inicialmente, nos primeiros 10 min, a coluna foi lavada com TFA 0,1% em água ultrapura (solução A) e em seguida, o gradiente de eluição foi sendo formado, pela mistura da solução A (TFA 0,1%) e 100% de propanol (solução B), por 85 min. Após este período, a coluna foi lavada com 100% da solução B totalizando 95 min de corrida. As amostras coletadas ao longo da cromatografia foram analisadas por um detector do tipo DAD (Diode Array Detector – Detector por Díodos), sendo as absorbâncias lidas a 280 nm.

4.7- Espectrometria de massas de proteínas isoladas

Os experimentos de espectrometria de massas foram realizados na FIOCRUZ em colaboração com os Drs. Jonas Perales e André Teixeira da Silva Ferreira. As bandas protéicas visualizadas após coloração do gel de tricina-PAGE foram recortadas e lavadas com uma solução 1:1 (v/v) de tampão bicarbonato de amônia 50 mM pH 8,0 e acetonitrila por 15 min até completa descoloração das bandas. Posteriomente, o gel foi desidratado com acetonitrila e seco por centrifugação a vácuo. As amostras foram reduzidas com 100 µL de DTT (65 mM), alguiladas com 100 µL iodoacetamida (200 mM) e desidratadas novamente com acetonitrila. O solvente foi removido e as bandas reidratadas com uma solução gelada de tripsina 20 ng/mL (Proteomics Grade, Sigma) em 50nM de bicarbonato de amônio pH8,0 por 45 min sob refrigeração. Após 16 horas de digestão a 37 ºC, os peptídeos em solução foram sonicados por 10 min. e dessalinizados por adsorção com tips do tipo C18 ZipTip para micropipetas (capacidade máxima de 3 µg por tip), previamente ativado por acetonitrila e equilibrado com TFA a 0,1% (v/v) em água. As amostras obtidas foram submetidas a oito ciclos de lavagem com 0,1% de TFA aspirando dispensando. Peptídeos retidos no Tip foram eluídos em 1,5mL de acetonitrila 50% em 0,1% TFA. Um volume de 0,3 mL do peptídeo foi depositado sobre a placa de aço do espectrômetro MALDI (ABI 192- target MALDI plate) e co-cristalizado com 0,3 mL de matriz de α-ciano-4- ácido hidroxi-cinâmico (CHCA) a 10mg/mL em solução de acetonitrila 50% e TFA 0,1% (v/v). O espectro de massas foi obtido utilizando o analizador AB SCIEX TOF/TOF 5800, no modo refletor. Para referência de calibração, bradicinina (757,39 Da), angiotensina II (1046,54 Da), P14R (1533,85 Da) e um hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) 18-39 fragmento (2465,19 Da) foram utilizados. Uma lista arquivos de picos monoisotópico (pps e ppw) foram gerados a partir dos dados de MS matérias (ou nativas) de acordo com os seguintes parâmetros usando o Software Data Explorer (AB Sciex). Para MS1: faixa de massa: 800-3,500, densidade de pico: 15 picos por 200 Da, relação sinal-ruído: 20, área mínima: 1000, picos máximos por local: 60. Para MS2: faixa de massa: 60 até que a massa precursor (m/z), a densidade de pico: 55 picos por 200 Da, relação sinalruído: 2, área mínima: 10 e picos máximos por precursor: 200, picos de massa com sinal de 20 ou acima (ruído) foram utilizados para busca em bases de dados (NCBI), utilizando PICOS versão 7.0. Os dados foram considerados adequados quando mostravam score superior a 40.

Os alinhamentos das sequências de aminoácidos foram feitos usando-se o algoritmo do BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.org/Blast) e do Clustal X (http://www.expasy.org) (Altschul, 1990; Thompson *et al.*, 1994).

4.8- Identificação de inibidores de proteases

4.8.1- Ensaio de inibição da atividade proteolítica da papaína in vitro

Inicialmente uma curva de atividade papainásica foi realizada, com o intuito de se determinar a concentração ideal da papaína a ser utilizada nos ensaios de inibição desta enzima por fitocistatinas. O ensaio de atividade papainásica descrito abaixo foi baseado na metodologia desenvolvida por Michaud *et al.* (1994), utilizando azocaseína como substrato.

Para o estudo da atividade do inibidor isolado contra a papaína, o ensaio foi realizado incubando-se 80 μ L de azocaseína 1%, com 10 μ L (5 μ g) de papaína, com tampão citrato de sódio 100 mM fosfato de sódio 100 mM DTT 1,5 mM e Triton X-100 0,1%, pH 5,6 e a 1 μ L do inibidor (1 μ g - dissolvido em água destilada), perfazendo um total de 40 μ L de volume de reação. Após a incubação a 37 °C em banho-maria por 1 h, a reação foi interrompida pela adição de 300 μ L de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Logo em seguida, a solução foi centrifugada por 5 min a 10.600 x g e retirados 350 μ L do sobrenadante, aos quais foram adicionados 300 μ L de NaOH 1 M. As amostras finais foram avaliadas por leitura espectrofotométrica, em comprimento de onda de 440 nm. Uma unidade de atividade inibitória (UAI) foi arbitrariamente definida como aquela responsável por uma redução de 0,01 na absorbância, em relação à leitura das amostras controle (com papaína e ausência de inibidor).

4.8.2- Ensaio de inibição da atividade proteolítica da tripsina in vitro

Uma curva de atividade da enzima tripsina foi realizada, com o intuito de se determinar a concentração ideal de enzima a ser utilizada nos ensaios de inibição desta enzima pelo inibidor purificado. O substrato utilizado para tripsina foi o BApNA (N-benzoil- DL-arginil-p-nitroanilida), dissolvido em DMSO.

A atividade proteolítica foi medida em tampão Tris/HCI 50 mM, com C_aCl₂ 0,02%, pH 8,0 e adicionando-se NaCl 150 mM a 37 °C, num volume final de 200 μ L. A reação durou 30 min e foi interrompida pela adição de 100 μ L de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato foi acompanhada fotometricamente pela medida de absorbância de p-nitroanilida liberada a 405 nm (Adaptado de Macedo *et al.*, 2007).

Para o ensaio de inibição, foi realizada uma pré-incubação do inibidor (1 $\mu g/\mu L$ - dissolvido em água destilada) com a enzima (5 $\mu g/5 \mu L$ – dissolvida em

Tris/HCI 50 mM pH 8,0, concentração de 1 mg/mL) e 94 μ L tampão Tris/HCI 50 mM, com C_aCl₂ 0,02%, pH 8,0 contendo NaCI 150 mM por 10 min a 37 °C e após este tempo acrescentaram-se 25 μ L do substrato BApNA (5 mM) e a mistura foi incubada novamente por 30 min a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato foi acompanhada fotometricamente pela medida de absorbância a 405 nm de p-nitroanilida liberada. Uma unidade de atividade inibitória (UAI) foi arbitrariamente definida como aquela responsável por uma redução de 0,01 na absorbância, em relação à leitura das amostras controle (com tripsina e ausência de inibidor).

4.8.3- Ensaio de inibição da atividade proteolítica da α-quimiotripsina *in vitro*

Uma curva de atividade da enzima α-quimiotripsina foi realizada, com o intuito de se determinar a concentração ideal de enzima a ser utilizada nos ensaios de inibição desta enzima pelo inibidor purificado. O substrato utilizado foi o BTpNA (N-benzoil- L-tirosil-p-nitroanilida) dissolvido em DMSO.

A atividade proteolítica foi medida em tampão Tris/HCl 50 mM, pH8,0 a 37 ^oC, num volume final de 200 μL. A reação durou 30 min e foi interrompida pela adição de 100μL de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato foi acompanhada fotometricamente pela medida de absorbância de p-nitroanilida liberada a 405nm (Adaptado de Macedo *et al.*, 2007).

Para o ensaio de inibição das frações F10, F11 e F12, foi realizada uma préincubação de cada fração (2 μ g/2 μ L dissolvido em água destilada) com a enzima (1 μ g - 5 μ L) e tampão por 10 min a 37 °C e após este tempo acrescentaram-se 25 μ L do substrato BTpNA (5 mM) e a reação foi incubada novamente por 30 min a 37 °C. A reação foi interrompida pela adição de 100 μ L de ácido acético 30% (v/v) e a hidrólise do substrato foi acompanhada fotometricamente pela medida de absorbância de p-nitroanilida liberada a 405 nm. Uma unidade de atividade inibitória (UAI) foi arbitrariamente definida como aquela responsável por uma redução de 0,01 na absorbância, em relação à leitura das amostras controle (com α -quimiotripsina e ausência de inibidor).

4.8.4- Ensaio de inibição da atividade de elastase e subtilisina *in vitro*

Uma curva de atividade de cada enzima foi realizada, com o intuito de se determinar a concentração ideal de enzima a ser utilizada nos ensaios de inibição desta enzima pelo inibidor purificado. O substrato utilizado foi azocaseína 1%.

A ação da fração F11(ClfTl) sobre a atividade da enzima elastase foi avaliada misturando-se 50 μ L de enzima a uma concentração padrão de 100 μ g/mL dissolvida em tampão Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, com 1 μ L (1 μ g dissolvido em água destilada) de cada fração e 349 μ L de tampão 50 mM Tris/HCl a pH 7,5 durante 10 min a 37 °C, seguido pela adição de 500 μ L de azocaseína 1%. A reação foi interrompida após 30 min de incubação a 37 °C pela adição de 150 μ L de TCA 20%. A mistura foi centrifugada durante 10 min a 12.000 x g. Foram retirados 500 μ L do sobrenadante, aos quais adicionaram-se 500 μ L de NaOH 2 M. A densidade óptica da suspensão final foi medida a 440 nm, segundo metodologia adaptada de Kunitz (1947).

O ensaio com a enzima subtilisina foi realizado incubando-se 17,5 μ L de enzima a uma concentração padrão de 100 μ g/mL dissolvida em tampão Tris/HCl 50 mM e CaCl₂ 1 mM, pH 8,0, com 1 μ L (1 μ g dissolvido em água destilada) da F11 (ClfTl) e 381,5 μ L de tampão, durante 10 min a 37 °C, seguido pela adição de 500 μ L de azocaseína 1%. A reação foi interrompida após 30 min de incubação a 37 °C pela adição de 150 μ L de TCA 20%. A mistura foi centrifugada durante 10 min a 12.000 x g. Foram retirados 500 μ L do sobrenadante, aos quais adicionaram-se 500 μ L de NaOH 2 M. A densidade óptica da suspensão final foi medida a 440 nm, segundo metodologia adaptada de Kunitz (1947). Uma unidade de atividade inibitória (UAI) foi arbitrariamente definida como aquela responsável por uma redução de 0,01 na absorbância, em relação à leitura das amostras controle (com elastase e subtilisina e ausência de inibidor).

4.8.5- Ensaio de inibição da atividade de α-amilase *in vitro*

A curva de atividade da α-amilase de *Bacillus sp.* foi realizada, com o intuito de se determinar a concentração ideal de enzima a ser utilizada nos ensaios de inibição desta enzima pelo inibidor isolado. O substrato utilizado foi amido 1%.

A análise da ação das frações F10, F11 e F12 sobre α -amilase de *Bacillus sp.* foi determinada de acordo com Miller (1959), com modificações. Os ensaios foram realizados em banho de água a 37 °C durante 45 min utilizando 1% (m/v) de

amido solúvel como substrato. 1µL de α -amilase (1 µg/µL dissolvida em água destilada) foi pré-incubada com 1µL (1 µg dissolvido em água destilada) de cada fração, em 75 µL de água ultrapura, durante 10 min a 37 °C. Em seguida, adicionouse o amido 1% diluído em água destilada (25 µL) e a mistura foi incubada novamente a 37 °C por 35 min. À reação foram adicionados 400 µL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicilico (DNS). A solução de reagente de DNS foi preparada anteriormente, por combinação de 30 mL de uma solução 1 (NaOH 4,5%) + 88 mL de uma solução 2 (1% de DNS + 25,5% de potássio / tartarato de sódio) + 10 mL de uma solução 3 (2,2 mL de 10% NaOH + 1 g de fenol + 10 mL água destilada). A reação foi interrompida por aquecimento a 100° C durante 5 min. Os produtos de hidrólise foram monitorizados por leitura da absorvância a 540 nm.

Uma unidade de atividade inibitória (UAI) foi arbitrariamente definida como aquela responsável por uma redução de 0,01 na absorbância, em relação à leitura das amostras controle (com α-amilase e ausência de inibidor).

4.8.6- Ensaio de inibição da atividade proteolítica de enzimas digestivas de larvas de *A. aegypti in vitro*

Para o estudo da atividade do inibidor isolado contra enzimas digestivas de larvas de A. aegypti, foi utilizado metodologia descrita segundo Lemos et al. (1996), com modificações. Larvas (quarto estágio de desenvolvimento - L4) de A. aegypti foram imersas em tampão fosfato de sódio 0,1 M, NaCl 0,5 M pH 7,2 (PBS) e imobilizadas em gelo, para remoção dos intestinos médios. Uma vez dissecados, os intestinos foram homogeneizados em Tris-HCI 0,1 M NaCI 0,5 M pH 8,0 e centrifugados a 14.000 x g por 10 min a 4 ºC. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e o precipitado, descartado. O extrato enzimático foi dosado como descrito no item 4.3. Em seguida, foi realizado um ensaio da atividade enzimática, como descrito no item 4.8.2. O efeito da atividade proteolítica do extrato dos intestinos médios da larva (L4) foi medido usando BApNA (5 mM) como substrato. Neste ensaio foi utilizado Tris/HCI 0,1 M e NaCI 0,5 M pH8,0 como tampão de reação. O extrato enzimático (L4-3,15 µg de proteína) foi pré-incubado por 10 min a 37º C na ausência e na presença de (1 µg dissolvido em água destilada) da fração F11 (ClfTI). Após este procedimento foi adicionado o substrato BApNA e a solução foi incubada por 30 min a 37 ºC. A reação foi parada adicionando-se 100 µL de ácido acético 30% e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 405 nm.

4.9- Visualização do inibidor de protease por zimografia

A visualização do inibidor de protease do tipo serínica foi realizada em gel contendo gelatina, utilizando a metodologia descrita por Felicioli et al. (1997). A fração 11 e o EBF dissolvidos em água destilada, e acrescidas de tampão de amostra com SDS, foram separadas em gel de poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina comercial (Sigma) em condições semi-desnaturantes (SDS-PAGE 12%). De modo a remover o SDS, após separação o gel foi incubado em 0,1 M de Tris/HCl pH 8,0, com 2,5% de Triton X-100 por 1 h. Em seguida, o gel foi incubado a 37 °C durante 1 h em Tris/HCI 50 mM, pH 8,0 contendo 20 mM de CaCl₂ e 50 µg de tripsina/mL. O gel foi então lavado com água destilada para remover o excesso de tripsina, corado com uma solução de Coomassie brilhante azul R 2% em água, metanol e ácido acético (na proporção de 6:3:1, v/v/v) e posteriormente descorado com uma solução composta de água destilada, metanol e ácido acético na mesma relação de proporcionalidade usada na preparação da solução corante. A ocorrência de bandas azuis escuras presentes no gel mostra a presença de inibidores de protease, pois a tripsina foi incapaz de digerir a região onde o inibidor estava presente.

4.9.1- Inibição da atividade proteolítica das enzimas digestivas (L4) de *Aedes aegypti* por diferentes inibidores *in gel*

O extrato enzimático de larvas de *A. aegypti* (L4) foi pré-incubado na ausência e na presença de inibidores das quatro classes de proteases, cisteínica (E-64), metaloprotease (EDTA), aspártica (pepstatina-A), serínica (PMSF) e o inibidor de isolado de *C. fairchildiana,* por 16 h a 37 °C. O extrato enzimático com os diferentes inibidores foi visualizado por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS, contendo gelatina em uma concentração de 0,1%, baseado na metodologia descrita por Heussen e Dowdle (1980). A separação protéica procedeuse sob uma voltagem constante de 80 V até as amostras entrarem no gel e 100 V no tempo restante. Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado com Triton X-100 2,5% duas vezes por 30 min cada; logo após, o gel foi recortado para incubação com tampões diferentes de acordo com cada classe. Para proteases da classe cisteínica, o gel foi incubado em tampão citrato de sódio 100 mM fosfato de sódio 100 mM DTT 1,5 mM e Triton X-100 0,1%, pH 5,6 a 37 °C, durante 1 h. Para metaloproteases, o gel foi incubado com Tris/HCI 50 mM, com CaCl₂ 5 mM e 5 µL de ZnCl₂ pH 8,0 a 37 ^oC durante 1 h. Para proteases aspárticas, o gel foi incubado com acetato de sódio 100 mM pH 3,5 a 37 ^oC por 1 h. E para proteases da classe serínica, o gel foi incubado com Tris/HCl 100 mM pH 8,0 a 37 ^oC durante 1 h. Posteriormente os géis foram corados com coomassie brilhante azul R - 250 2% e então descorados com uma solução de metanol: ácido acético: água (40:10:50, v/v/v). As bandas de atividade aparecem brancas em fundo azul.

4.9.2- Análise temporal da inibição da atividade proteolítica das enzimas digestivas (L4) de *A. aegypti* por inibidor isolado *in gel*

O extrato enzimático de larvas de *A. aegypti* (L4) foi pré-incubado na ausência e na presença do inibidor de *C. fairchildiana* por 30 min, 2 h, 4 h e 18 h a 37º C. Os extratos enzimáticos na ausência e na presença do inibidor, após diferentes tempos de incubação, foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS, contendo gelatina em uma concentração de 0,1%, baseado na metodologia descrita por Heussen e Dowdle (1980). A separação protéica procedeuse sob uma voltagem constante de 80 V até as amostras entrarem no gel e 100 V no tempo restante. Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado com Triton X-100 2,5% duas vezes por 30 min. cada; logo após, o gel incubado em tampão Tris/HCI 100 mM pH 8,0 por 1h a 37º C. O gel foi então corado com 2% de coomassie brilhante azul R-250 e então descorado com uma solução de metanol: ácido acético: água (40:10:50, v/v/v). As bandas de atividade aparecem brancas em fundo azul.

4.10- Avaliação da atividade antifúngica dos inibidores de sementes de *C. fairchildiana*

4.10.1- Obtenção das células

Células de leveduras pertencentes ao gênero *Candida* foram colocadas para crescer em placas de Petri contendo Agar Sabouraud por um período de 24 h, a 30^e C, para permitir um crescimento celular homogêneo. Após este período, as células foram utilizadas no ensaio no qual, com o auxílio de uma alça de semeadura, colônias foram retiradas e adicionadas a 10 mL de meio de cultura (caldo Sabouraud). A quantificação do número de células a serem utilizadas no ensaio de inibição de crescimento das mesmas foi feita em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio óptico de campo claro.

4.10.2- Análise da inibição do crescimento das células de leveduras

Em placas de cultura de 96 poços, as amostras-teste foram adicionadas em concentrações variadas junto a 2×10^{-3} células.mL⁻¹ das leveduras, para um volume final de ensaio de 100 µL de meio de cultura. Para a observação da inibição do crescimento celular, a placa foi lida a cada 6 h, num período total de 24 h, em leitor de microplacas, num comprimento de onda de 620 nm.

4.10.3 - Efeito do inibidor isolado sobre a permeabilização de membranas de leveduras

A permeabilização da membrana das células tratadas com F11 foi avaliada através da utilização do corante fluorescente SYTOX Green, segundo metodologia descrita por Thevissen et al. (1999) com algumas modificações. SYTOX Green é um corante que possui alta afinidade para ácidos nucléicos e penetra em células apenas quando sua membrana está comprometida. Imediatamente após 24 h de crescimento, na ausência e presença de F11 (CIfTI), uma alíquota das diferentes células de leveduras foi incubada sob constante agitação por duas horas com o corante fluorescente SYTOX Green a uma concentração final de 0,2 µM, de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. Após este período, estas células foram transferidas para lâminas, cobertas com lamínulas e analisadas por fluorescência em microscópio óptico (Zeiss; Axioplan).

As imagens foram obtidas através do microscópio Axioplan acoplado à câmera "Cannon Power Shot A640".

4.10.4- Análise da viabilidade celular

Esta análise foi feita através do método de contagem de colônias em placas de Petri. Após o ensaio de inibição do crescimento, as células-controle das leveduras foram ressuspensas, quantificadas em câmara de Neubauer, diluídas e espalhadas sobre placas de Petri contendo Agar Sabouraud. As células foram distribuídas de forma homogênea, com o auxílio de uma alça de Drigalsky e logo após, as placas foram deixadas numa estufa a 30° C por um período de 24 h para que as colônias pudessem se desenvolver. Após esse período, as colônias foram contadas e fotografias das placas foram tiradas. A mesma diluição das células utilizada no experimento controle foi feita também para incubação com as amostrasteste, permitindo também um tempo de 24 h de contato entre células e amostras,

para análise do efeito destas últimas sobre o crescimento celular. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.11- Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Para todos os experimentos, foram calculados a média e o desvio padrão. Foi realizada análise de variância (ANOVA), seguida por teste Dunnett' e test t. O nível de significância considerando foi P < 0,001.

5- Resultados

5.1- Purificação de inibidores

A figura 5 mostra a sobreposição do perfil cromatográfico das proteínas comerciais e o perfil cromatográfico das proteínas presentes no EBF de *C. fairchildina*. De acordo com o gráfico, pode-se observar a presença de três picos proteicos com massas moleculares próximas a 66 kDa (P1), inferiores a 29 kDa (P2) e próximas a 14 kDa (P3). Foram realizadas várias cromatografias para acúmulo de material, e foi observado o mesmo perfil nas cromatografias seguintes.



Figura 5: Sobreposição das proteínas comerciais albumina sérica bovina - 66 kDa (BSA), anidrase carbônica - 29 kDa (AC), lisozima - 14 kDa (L) com os 3 picos (P1, P2 e P3) do extrato bruto fervido (EBF) obtidos na cromatografia de exclusão molecular em uma matriz Sephadex G-100.

A figura 6 mostra o resultado das eletroforeses em gel de poliacrilamida (A) e em tricina (B), ambas na presença de SDS, onde foi possível visualizar os perfis protéicos do extrato bruto (EB), extrato bruto fervido (EBF) e dos picos (P1, P2 e P3) obtidos na cromatografia de exclusão molecular. Nas amostras de EB, EBF e P1 foi possível observar a presença de várias proteínas. No P2, tanto na figura 6A quanto em 6B, foi possível observar a presença de uma banda de aproximadamente 14 kDa (indicado com asterisco preto), que não foi observada em P1. Também foi possível observar a presença de duas bandas protéicas acima de 16,9 kDa neste P2. No pico 3 (P3) da figura 6B foi possível observar a presença de duas bandas com massa aproximada de 11 e abaixo de 8,1kDa.



Figura 6: Visualização eletroforética em gel de poliacrilamida 15% corado com coomassie brilhante blue (A) e em gel de tricina corado com nitrato de prata (B), ambos na presença de SDS, do extrato bruto (EB), do extrato bruto após 10 min de fervura a 100 °C (EBF) e dos picos P1, P2 e P3 obtidos na cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100. Os géis foram corridos na presença de β-mercaptoetanol. M - marcador de massa molecular em kDa. Concetração de proteínas aplicada em cada poço: EB = 82µg; EBF = 90.75 µg; P1 = 31.44 µg; P2= 37.42 µg; P3= 17.4 µg.

Os resultados obtidos nos ensaios de inibição contra a enzima papaína foram expressos em unidade de atividade inibitória específica (UAI). O EB apresentou uma média de 1,7 UAI enquanto o EBF apresentou maior taxa de atividade por massa de proteína 2,8 UAI. A fração P1 apresentou menor quantidade 0,6 UAI, enquanto as frações P2 e P3 apresentaram 1,7 e 3,5 UAI (figura 7A).

No ensaio de inibição da atividade da tripsina, ambos os extratos inibiram a atividade da tripsina, o EB apresentou 2,5 UAI enquanto o EBF 1,6 UAI. As frações P1, P2 e P3 apresentaram 0,48, 16,4, 12, 1 UAI, respectivamente (figura 7B).

De acordo com as análises estatísticas apenas a fração P1 não teve efeito estatisticamente significativo, considerando P como < 0,001, sendo o grau de confiança de 99,99% de acordo com o teste usado.



Figura 7: (A) Dosagem de atividade inibitória de papaína **(B)** Dosagem de atividade inibitória de tripsina em ausência e presença do extrato bruto (EB), extrato bruto fervido (EBF) e dos picos P1, P2 e P3 obtidos na cromatografia de exclusão molecular. One-way ANOVA/Dunnett's post-tests do software Graphpad Prism. Asterisco: *P*<0.001 (efeito significativo). O experimento foi realizado em triplicata, com n=2.

5.2- Avaliação da atividade antifúngica das frações enriquecidas com inibidores

5.2.1- Inibição do crescimento de leveduras com frações enriquecidas com cistatinas

A fração P1 inibiu 49% do crescimento das células de *C. albicans* quando comparados com o controle. A fração P2 inibiu 16,71% do crescimento das células de *C. albicans* quando comparados com o controle e a fração P3 inibiu em 43% o crescimento das células de *C. albicans*, quando comparados com o controle (figuras 8 A, B e C), também foi possível observar alterações na morfologia das células quando comparadas com o controle (figura 9B). Nota-se a formação de pseudohifas (indicadas com seta preta) que não são observadas no controle e aglomerados celulares (indicadas com seta branca). Na figura 9 C e D foi possível observar aglomerados celulares, mas o número de células em D é menor que em A (controle), em B e C.



Figura 8: Curva de crescimento de *C. albicans* na presença dos picos P1 (A), P2 (B) e P3 (C) da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100. O crescimento foi avaliado a cada 6 h ao longo de 24 h. O experimento foi feito em triplicata.



Figura 9: Microscopia ótica de contraste de fase das células das leveduras *C. albicans* crescidas na ausência (controle) e na presença dos extratos protéicos de *C. fairchildiana*. Em A: Controle *C. albicans;* B: *C. albicans* + P1 (15,76 μg de proteína); C: *C. albicans* + P2 (15,76 μg de proteína); D: *C. albicans* + P3 (3,76 μg de proteína). Ampliação de 40x.

Com base nos resultados descritos acima, foram realizadas etapas cromatográficas na tentativa de isolar os inibidores presentes na fração P3 rica em inibidores de papaína e tripsina, mas a mesma perdeu a atividade ao longo do processo. Então, a fração P2, foi submetida a uma cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, numa coluna C18 com uma pré-coluna C8 acoplada, para purificação do inibidor ou inibidores de proteases serínicas e cisteínicas de sementes de *C. fairchildiana,* a partir da qual foram coletadas 14 frações (figura 10).



Figura 10: Perfil cromatográfico obtido na coluna de fase reversa C8-C18 do P2. As frações foram coletadas por minutos de retenção na coluna, onde NR é Não Retida na coluna (NR - 0 a 10') e as Frações F2 (13 a 14'), F3 (14 a 16,5'), F4(17 a 19'), F5 (30 a 30,5'), F6 (30,7 a 33,5'), F7 (33,6 a 35'), F8 (35,1 a 37'), F9 (37,1 a 43'), F10 (43,1 a 46'), F11 (46 a 49'), F12 (50 a 53'), F13 (54 a 86') e F14 (86 a 89'). As frações foram nomeadas segundo a quantidade de minutos de retenção na coluna. A eluição da coluna foi acompanhada por um detector do tipo DAD, sendo as absorbâncias lidas a 280nm.

A visualização das frações separadas por HPLC pode ser observada na figura 11, na eletroforese em gel de tricina, na presença de SDS e β -mercaptoetanol. Nas frações NR, F2, F3, F4, F5, F13 e F14 não foi possível a visualização de bandas protéicas. Nas frações F6, F9, F10, F11 e F12 foi visualizada uma banda protéica entre 10 e 14 kDa. Nas frações F7 e F8 foi visualizada uma banda abaixo de 10 kDa e pelo menos duas bandas na fração F7 e uma na fração F8 entre 10 e 14 kDa. A fração F10 apresentou pelo menos 3 bandas entre 10 e 16 kDa.



Figura 11: Visualização eletroforética, em gel de tricina na presença de SDS, das frações NR, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, em (A), e F9, F10, F11, F12, F13 e F14, em (B) obtidas na cromatografia de fase reversa em uma coluna C8C18, a partir da separação do P2 da cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100. Ambos os géis foram corridos na presença de β -mercaptoetanol e corados com coomassie brilhante blue. M- marcador de massa molecular em kDa. Foram aplicados 6 µg de proteína em cada poço.

Para melhor caracterização dos inibidores foram realizados ensaios de sua atividade sobre proteases. A figura 12 mostra o resultado do ensaio de inibição da papaína pelas frações separadas na cromatografia de fase reversa. As frações F10 e F13 inibiram em cerca de 26,79 e 34,14% respectivamente, a atividade da papaína. Para as outras frações, a inibição foi menor. Os resultados foram expressos em atividade inibitória específica (UAI) e mostram que as frações F2, F3 e F13 apresentaram 5,05, 3,81 e 1,73 unidades de atividade inibitória específica (UAI), respectivamente. As frações NR e F10 apresentaram 1,15 e 1,17 UAI, as demais frações apresentam valores abaixo de 0,49 UAI. No entanto, de acordo com as análises estatísticas apenas a fração F3 teve efeito estatisticamente significativo, considerando P como < 0,001, sendo o grau de confiança de 99,99% de acordo com o teste usado.



Figura 12: Dosagem de atividade inibitória (UAI – Unidade inibitória / μ g de proteína) das frações obtidas na cromatografia de fase reversa em uma coluna C8-C18 contra papaína. One-way ANOVA/Dunnett's post-tests do software Graphpad Prism. Asterisco: *P*<0.001 (efeito significativo). O experimento foi realizado em triplicata, com n=2.

Para a detecção de inibidores de proteases serínicas, foi realizado o ensaio de inibição de tripsina pelas frações separadas na cromatografia de fase reversa. Apenas as frações F10, F11 e F12 inibiram a atividade da tripsina. As frações F10, F11 e F12 apresentaram 3,18%, 0,7% e 2,65% de atividade residual de tripsina, respectivamente, o que representou 96,82%, 99,3% e 97,35% de inibição da atividade da tripsina, respectivamente (figura 13). As frações F10, F11 e F12 apresentaram 5,52 UAI, 5,60 UAI e 5,74 UAI.



Figura 13: Dosagem de atividade inibitória (UAI – Unidade de atividade inibitória / μ g de proteína) das frações obtidas na cromatografia de fase reversa em uma coluna C8-C18 contra tripsina. One-way ANOVA/Dunnett's post-tests do software Graphpad Prism. Asterisco: *P*<0.001. O experimento foi realizado em triplicata.

As frações F10, F11 e F12, também foram avaliadas em sua habilidade de inibirem outras enzimas comerciais como a α -quimiotripsina e α -amilase (figura 14). Nenhuma das três frações inibiu a atividade das duas enzimas testadas.



Figura 14: Atividade residual de α -quimiotripsina e α -amilase na presença das frações F10, F11 e F12 obtidas na cromatografia de fase reversa em uma coluna C8-C18. One-way ANOVA/Dunnett's post-tests do software Graphpad Prism. Asterisco: *P*<0.001. Um experimento em triplicata.

De acordo com os resultados obtidos a fração F11 foi escolhida para as próximas etapas do trabalho por ser a mais efetiva na inibição da enzima tripsina e não inibir outras enzimas comerciais, por ser a fração mais limpa que as demais quando visualizadas por eletroforese e por estar mais concentrada (5,41 μ g/ μ L) que as frações F10 e F12 (3,22 e 2,87 μ g/ μ L, respectivamente), ainda tal fração também não foi efetiva a inibição das enzimas elastase e subtilisina (figura 15).



Figura 15: Atividade residual de elastase e subtilisina na presença da F11 obtida na cromatografia de fase reversa em uma coluna C8-C18. One-way ANOVA/Dunnett's post-tests do software Graphpad Prism. Asterisco: *P*<0.001. O experimento foi realizado em triplicata.

A análise por espectrometria de massas foi realizado no Laboratório de Toxinologia, da Fundação Oswaldo Cruz, pelo Dr. André Teixeira da Silva Ferreira.

Como a fração (P2) apresentou uma atividade inibitória contra a tripsina, a banda proteica majoritária de aproximadamente 13 kDa foi analisada e foi obtido o fragmento peptídicos de 12 aminoácidos, a saber SIPPQCHCADIR. A fração (F11) também foi analisada e foram obtidos dois fragmentos peptídicos, sendo um o mesmo obtido com a fração (P2) um segundo fragmento de 7 aminoácidos, a saber

SCHSACK. Tais fragmentos foram alinhados com sequências de outros inibidores de tripsina de leguminosas (figura 16), incluindo o inibidor de tripsina de *Vigna unguiculata* - InProVigungcy (EMBL CAM35517), o qual apresentou uma cobertura de 32 % de alinhamento. A proteína foi chamada de ClfTI – Inibidor de tripsina de *C. fairchildiana.* De acordo com figura 16 foi possível observar que a seqüência de aminoácidos identificada em sementes de *C. fairchildiana* é bem conservada em todas as seqüências analisadas. Apesar de ter uma massa molecular próxima dos inibidores de tripsina do tipo Kunitz, os dados do alinhamento mostram semelhanças de estrutura primárias mais altas com inibidores de tripsina do tipo Bowman-Birk.

BowBirkCicart MWVLKVCVLVVFLLGVTAAGMDLNHLRSIHHNHDSSDEPSESSEPCCDSCRCTKS PPOCHCAD RLNSCHSACKSCMCTRSRPGKCRCLDTDDFCYKPCKSMDKDDYSCFG NSCHSACKSCMCTRSRPEKCRCLDTDDFCYKPCKSMDEDDV---------SS-HHHDSSDEPSESEPCCDSCRCTKS PPOCHCAD RLNSCHSACKSCMCTRSMP KCRCLDTDDFCYKPCESMDKDDD---------SSKWEACCDRCACTKS PPOCHCAD RINSCHSACESCACTHSIP OCRCFDIIDFCYKPCSG------NSCHSACKSCMCTRSMPHKCRCLDTDDFCYKPCESMDKDDD--MAVLKVCVLVVFLVGVTAAGMDLNHLRSIHHHHDSSDEPSESEPCCDSCRCTKS PPOCHCAD RINSCHSACKSCMCTRSMP KCRCLDTDNFCYKPCESRDKDDD-BowBirkVigung -----------SGHHEDSTDEPSESSEPCCDSCVCTKS PPOCHCIN RINSCHSGCKSCLCTFSIP SCRCLDIANFCYKPCKS---NSCHSACKSCMCIRSMP KCRCLDIDDFCYKPCKSR-------SPPOCHCADER--SCHSACK------InTrVigradsub MMVLKVCVLVVFLVGVTAAGMDLNHLRSIHHNHDSSDEPSESSEPCCDSCRCTKSTPPOCHCADUR InTrVigradrad MMVLKVCVLVVFLVGVTTAGMDLNQLRSS-HHHDSSDEPSESSEPCCDS<mark>CRCTKS</mark>EPPOCHCAD -----EPCCDSCRCTKSEPPOCHCAD InProVigungcy ------BowBirkIIAcea ---InTrVigtril InTrVigrad ClfTI

***** ********

Retângulo azul: conformação β. Em amarelo são os resíduos de cisteína, em azul claro os aminoácidos polares não carregados, CAM35517); BowBirkVigung (2R33_A); InTrVigradsub (ABD91575.1); BowBirkCicart (AEW50186.1); InTrVigradrad Figura 16: Seqüência parcial e alinhamento comparativo de ClfTl com outros inibidores de tripsina de sementes de leguminosas. em vermelhos os alifáticos, em cinza o aminoácido prolina e em verde os aminoácidos básicos. InProVigungcy (EMBL (ABD85193.1); InTrVigtril(ABD91574.1); BowBirkIIAcea (P83283). Na zimografia reversa pode ser visualizado o inibidor de tripsina presente em sementes de *C. fairchildiana* (ClfTI) presente na F11 (figura 17A eB) . Tanto no EBF quanto no ClfTI foi possível observar que a gelatina não foi digerida pela tripsina (seta contínua) devido a presença do inibidor de tripsina, confirmando que o ClfTI, uma proteína com massa molecular de aproximadamente 13 kDa, é um inibidor de tripsina de cotilédones de *C. fairchildiana* (ClfTI) (figura 17B). As proteínas de reservas presentes no EBF (asteriscos) não foram digeridas porque a tripsina não é uma proteáne específica para degradar proteínas de reserva de leguminosas; estas proteínas são degradadas por proteases da classe cisteínica. Um reforço a este resultado é a revelação do inibidor de tripsina de soja (SBTI), presente no marcador (M) de massa molecular (20,1 kDa), também visualizado no gel de gelatina no painel B, por não ter sido digerido pela tripsina, indicado pelas setas pontilhadas. A marcação é mais intensa do que as outras bandas.



Figura 17: SDS-PAGE 12% (A) e SDS-PAGE 12% contendo 0,1% de gelatina (B) do ClfTI (F11) e extrato bruto fervido (EBF). Ambos os géis foram corridos na ausência de β -mercaptoetanol e corados com coomassie brilhante blue, aplicando-se 2 µg e 1 µg de proteína do ClfTI, respectivamente e 12,10 µg de EBF em cada poço.

O procedimento de purificação para obtenção do inibidor de protease serínica de sementes de *C. fairchildiana* (ClfTI) pode ser visto na tabela 2, revelando uma purificação de 372,51 vezes e um rendimento de 0,048%. O valor baixo de rendimento pode ocorrido pelo fato da presença de inibidores de tripsina nas outras frações (F10 e F12), pois o tempo de retenção na coluna é diferente, ou seja, são inibidores de tripsina, com a composição de aminoácidos diferentes.

Tabela	2:	Tabela	de	purificação	de	inibidor	de	tripsina	de	sementes	de	С.
fairchild	iana	(ClfTI).										

Amostra	Peso	Proteína	Atividade	Atividade	Rendimento	Purificação
	total	total	total	específica	(%)	(X)
	(mg)	(mg)	(UAI)	(UAI/µg		
				proteína)		
Extrato Bruto Fervido (EBF)	3400	205.7	34408	0.167	100	1.0
P2	130	64.87	5317	81.96	15.45	490.77
ClfTI	0.3	0.27	16.83	62.33	0.048	372.51

Uma unidade de atividade inibitória (UAI) foi arbitrariamente definida como aquela responsável por uma redução de 0,01 na absorbância.

5.3- Avaliação do potencial inseticida do ClfTl sobre enzimas digestivas de larvas de *A. aegypti* em quarto estágio (L4) de desenvolvimento

Para avaliar o potencial inseticida do ClfTI sobre enzimas digestivas de larvas de *A. aegypti*, foram realizados ensaios de inibição *in vitro*, na ausência e na presença do ClfTI, A atividade das enzimas intestinais de larvas de *A. aegypti*, em L4, foram afetadas na presença do ClfTI, onde 1 μ g (~0,37 μ M), de proteína foi capaz de inibir a atividade das enzimas digestivas de *A. aegypti* (6,45 μ g de proteína) em 87,93% (figura 18). De acordo com as análises estatísticas a inibição pelo ClfTI foi estatisticamente significativo, considerando P como < 0,0001, sendo o grau de confiança de 99,999% de acordo com o teste usado.



Figura 18: Atividade residual de enzimas (%) digestivas de larvas de *A. aegypti,* em quarto estágio de desenvolvimento (L4), na ausência e presença do ClfTI. One-way ANOVA/post-tests t do software Graphpad Prism. Asterisco: P<0.001. O experimento foi realizado em triplicata, com n= 2.

O efeito dos diferentes inibidores de proteases, inclusive do ClfTI, após 16 h de incubação com o extrato enzimático intestinal (L4 - 0,57 µg) de larvas de A. aegypti é mostrado na figura 19. O perfil enzimático de L4 mostrou pelo menos sete bandas de atividade de proteolítica (setas brancas), três faixas entre 26 e 34 kDa, uma faixa entre 34 e 43 kDa, uma banda acima de 55 kDa e pelo menos duas bandas sobre 130 kDa (figura 19, raia 1). O extrato enzimático (L4) incubado com EDTA (9 mM) (figura 19, raia 5) e E-64 (2,56 µM) (figura 19, raia 7) permaneceram ativos, iguais ao extrato controle. Porém, PMSF (227 µM) (figura 19, raia 3) inibiu completamente o extrato enzimático quando comparados ao controle. O CITI (3 µg = 57,7 μ M) (figura 19, raia 2) inibiu a atividade de três bandas acima de 26 kDa, como também a atividade da banda de ~95 kDa e ~130 kDa, também diminuiu a intensidade de uma banda com massa aproximada de 26 kDa do extrato enzimático (L4) (asteriscos brancos). Em condições ácidas, a atividade de L4 foi afetada, principalmente as atividades com massas moleculares mais altas (figura 19, raia 8), e na presença de pepstatina-A (13,26 µM) as enzimas foram totalmente afetadas (figura 19, raia 9). Entretanto ao incubar L4 com DMSO, que é o solvente de pepstatina-A, as atividades enzimáticas (L4) foram completamente inibidas (figura 19, raia 10), o que leva a crer que este solvente é o real responsável pelo aparente efeito inibitório da pepstatina-A.



Figura 19: Zimografia de atividades proteolíticas do intestino médio de larvas de quarto estágio (L4) de *A. aegypti* incubadas ou não na presença de diferentes inibidores durante 16 h a 37° C. Em 1 - L4; 2 - L4 + ClfTl ($3 \mu g \cong 57,7 \mu M$) pH 8,0; 3 - L4 + PMSF ($227 \mu M$); 4 - L4; 5 - L4 + EDTA (9 mM) pH8,0; 6 - L4; 7 - L4 + E-64 (2,56 μM) pH 5,6; 8 - L4; 9 - L4 + pepstatina-A (13,26 μM) pH3,5; 10 - L4 + DMSO (100%). M - marcador de massa molecular (kDa). Atividade proteolítica aparece em branco contra um fundo preto. As setas brancas indicam as bandas de atividade enzimáticas do controle e os asteriscos indicam a redução das bandas atividade enzimáticas de L4 na presença do ClfTI.

O ClfTI (2 µg) foi pré-incubado com L4 durante 30 min, 2 h, 4 h e 18 h (figura 20). Após 30 min de incubação de com L4, houve uma redução da atividade em várias bandas (indicado por setas) quando comparadas com o controle (L4- indicado por asteriscos), também foi observado a inibição completa de uma banda com massa aproximada de 34 kDa, após 4 h de incubação. A banda de atividade com massa de aproximadamente 26 kDa foi perdendo a sua atividade ao longo dos tempos de incubação, mas não perdeu a sua atividade total até 18 h de incubação com o ClfTI. A concentração do ClfTI neste experimento foi menor que no anterior (figura 20).



Figura 20: Zimografia de proteases do intestino médio de larvas de quarto estágio (L4) de *A. aegypti*, incubadas na ausência e na presença do ClfTl (2 μg) por 30 min, 2 h, 4 h e 18 h de pré-incubação a 37º C. M - massa molecular (kDa). Atividade proteolítica aparece em branco contra um fundo preto. As setas brancas indicam a redução das bandas atividade enzimáticas de L4 na presença do ClfTl e os asteriscos indicam as bandas de atividade enzimáticas do controle.

5.3.1- Análise da inibição do crescimento de leveduras em meio líquido

De acordo com as quantificações da atividade inibitória específica de papaína, ou seja, os resultados de quantificação de cistatinas (figura 12), foi analisado o crescimento da levedura C. *albicans* na ausência e na presença das frações F2, F3 e F13, enriquecidas com estes inibidores (figura 21). Como a dosagem para proteínas em tais amostras foi baixa, foi utilizada uma concentração de amostra de forma a se obter 50 % de inibição de papaína, ou seja, 5,96 UAI.mL⁻¹ para a fração

F2; 8,37 UAI.mL⁻¹ para a fração F3 e 8,99 UAI.mL⁻¹ para a fração F13. Não foi possível observar inibição do crescimento da levedura *C. albicans* com as concentrações testadas no ensaio.



Figura 21: Atividade antimicrobiana das frações enriquecidas com cistatinas sobre a levedura *C. albicans*. O experimento foi feito em triplicata.

A figura 22 mostra a curva de crescimento da levedura *C. albicans* na ausência e na presença das frações F10, F11 e F12, enriquecidas com inibidores de tripsina (figura 13). Não foi possível observar inibição do crescimento da levedura *C. albicans* com a concentração testada no ensaio, de 100 μ g.mL⁻¹.



Figura 22: Atividade antimicrobiana das frações enriquecidas com inibidor de tripsina sobre a levedura *C. albicans*. As frações foram utilizadas na concentração de 100 µg.mL⁻¹. O experimento foi feito em triplicata.
Foram feitas imagens da placa de 96 poços, onde o ensaio de inibição do crescimento de *C. albicans* foi realizado (figura 23). Como observado pelo padrão visual de expansão das células após cultivo, não houve inibição do crescimento, quando *C. albicans* foi crescida na presença das frações F10, F11 e F12, enriquecidas com atividade anti-tríptica.



Figura 23: Crescimento de *C. albicans* em ausência e presença das frações enriquecidas com inibidores de tripsina. Em: (A) *C. albicans* + meio Sabouraud; (B) *C. albicans* + fração F10; (C) *C. albicans* + fração F11; (D) *C. albicans* + fração F12. A concentração utilizada de cada fração foi 100 μ g.mL⁻¹; os poços numerados 1, 2 e 3 representam as triplicatas para cada ensaio A, B, C e D.

5.3.2- Análise da viabilidade celular

Apesar de não ter ocorrido inibição do crescimento, a fração F11 aparentemente induziu o crescimento das leveduras, como observado pelo padrão de crescimento observado na figura 22. Então, para verificar se houve alguma alteração celular, após a incubação das células de *C. albicans* com as frações enriquecidas com inibidores, foi feita uma análise da viabilidade celular.

A análise foi realizada através do espalhamento de uma alíquota das células após 24 h de incubação na presença e ausência das frações em placas de Petri contendo meio sólido. Após 24 h de crescimento as colônias foram contadas e as placas fotografadas (figura 24). Os dados deste experimento estão em consonância com os resultados do ensaio de inibição do crescimento, não tendo sido observadas alterações no crescimento das células. O número de colônias em cada fração foi contado (Tabela 3).



Figura 24: Crescimento de células de *C. albicans* (A) após 24 h de incubação na presença das frações F10 (B), F11 (C) e F12 (D), enriquecidas com atividade anti-tríptica, e usadas na concentração de 100 µg / mL.

Tabela 3: Viabilidade das células de *Candida albicans* após 24 h de incubação com as frações enriquecidas com atividade anti-tríptica. O plaqueamento foi feito em triplicata, e os valores são uma média das colônias das três placas.

Fração	Concentração	Número de	Viabilidade das
		colônias	células (%)
Controle	0	54	100 %
F10	100 µg / mL	50	92,59 %
F11	100 µg / mL	71	131,48 %
F12	100 µg / mL	72	133,33 %

5.3.3- Ensaio para verificação da permeabilidade de membrana das células da levedura *C. albicans* crescidas em presença da fração F11

As células da levedura *C. albicans*, crescidas tanto na ausência quanto na presença da fração F11 enriquecida com atividade anti-tríptica, foi analisada para verificação de eventual efeito de permeabilização de membrana, utilizando-se o corante Sytox Green. Na figura 25 (C e D) pode ser observada a marcação das células das leveduras *C. albicans* crescidas na presença da fração F11, sugerindo que esta fração atuou de alguma forma sobre a membrana plasmática destas leveduras, permitindo a permeabilização do corante e sua marcação. Se comparado com as marcações dos controles (A e B), onde se vêem poucas células marcadas, pode-se sugerir que houve efeito de permeabilização de membrana. No entanto, nota-se também um número bem mais elevado de células em C (células crescidas com a fração F11 por 24 h) que em A (células crescidas na ausência da fração pelo mesmo período de tempo). A partir desta observação se cogita que, dentre esse maior universo de células, um número de células morrendo, por processo natural, também seria maior em D que em B.



Figura 25: Microscopia de fluorescência das células da levedura *C. albicans* tratadas com o corante Sytox Green. Em A e B, são as células crescidas na ausência da fração F11; C e D são as células crescidas na presença de 100 µg.mL⁻¹ da fração F11. Em A e B, as células foram visualizadas por DIC e em C e D, as células foram visualizadas por fluorescência. Aumento de 10x.

6- Discussão

Inibidores de proteases são moléculas potentes, pois são seletivos e específicos para inativação de proteases alvo (Johnson & Pellecchia, 2006). Tais proteínas são capazes de inibirem a digestão de insetos e o crescimento de fungos, sugerindo importante ação antimicrobiana e inseticida. Por isso, tem recebido muita atenção por causa de sua importância econômica. Também estão entre os principais candidatos a processos de transformação de plantas, com atividade inibitória comprovada contra pragas de insetos (Bijina *et al.*, 2011). Devido a importância dos inibidores de proteases, o presente trabalho descreve a purificação de um inibidor de tripsina de sementes de *C. fairchildiana* (CIfTI) e a caracterização de sua atividade inibitória sobre a atividade de proteases comerciais de função digestivas, enzimas digestivas de larvas do mosquito *A. aegypti*, causador da dengue, chinkungunya e febre amarela, doenças arbovirais comuns em regiões tropicais e subtropicais e a atividade biológica do inibidor isolado contra a levedura *C. albicans* que responsável pela candidíase e podem causar severas infecções sistêmicas.

A primeira etapa de purificação do extrato protéico denominado extrato bruto (EB) foi a fervura por 10 minutos a 100 °C, e então chamado de extrato bruto fervido (EBF). Ao avaliar a capacidade do EB e do EBF em inibir a atividade da enzima papaína após o tratamento, o número de unidades de atividade inibitória (UAI) do EBF aumentou, no entanto, para a enzima tripsina de pâncreas de porco, ambos foram eficientes na inibição, mas o EBF perdeu 14,39 % de sua atividade inibitória após a fervura a 100 ºC por 10 min (figura 7 A, B). O aquecimento de extratos vegetais pode enriquecer a presença de inibidores de tripsina, devido à desnaturação de enzimas presentes no extrato bruto (Benjakul et al., 2000). Klomklao et al. (2010) avaliaram a extração, purificação e propriedades de um inibidor de tripsina do feijão Vigna radiata. Quando o extrato foi aquecido de 60 a 90 ^oC por 10 min, a atividade inibitória específica se manteve constante, mas na temperatura de 100 ºC a atividade foi reduzida. O tratamento térmico do extrato deste feijão aumentou a pureza em 2,84 vezes, talvez por ação do calor sobre estruturas protéicas compactadas e estabilizadas por ligações dissulfeto (Benjakul et *al.*, 2000; Klomklao *et al.*, 2010).

Quando extrato bruto fervido (EBF) foi submetido à segunda etapa de purificação por uma cromatografia de filtração em gel, em uma matriz sephadex G-100, onde foram obtidos 3 picos (figura 5), de acordo com as análises estatísticas

apenas a fração P1 não teve efeito estatisticamente significativo sobre as enzimas papaína e tripsina, considerando P como < 0,001, sendo o grau de confiança de 99,99%. Na separação protéica do EB, EBF, P1, P2, e P3 foram observadas (figura 6 A e B) bandas majoritárias observadas no EB, EBF e P1, provavelmente representam subunidades das proteínas oligoméricas de reserva, tipicamente vicilinas de espécies de leguminosas, com massa molecular entre 66 e 45 kDa (Shutov et al., 1995). Como o P2 apresentou uma alta atividade inibitória contra tripsina, inibiu a atividade da enzima papaína e apresentou apenas três bandas protéicas na eletroforese em gel de tricina. A banda majoritária entre 10,8 e 14,4 kDa foi retirada do gel e analisada por espectrometria de massas, para identificar o inibidor ou inibidores de protease presentes no P2. O fragmento peptídico obtido de tal banda majoritária com massa aproximada de 13 kDa continha 12 aminoácidos, com a sequência SIPPQCHCADIR, e mostrou similaridade com inibidor de tripsina de Vigna unguiculata - InProVigungcy (EMBL CAM35517). De acordo com pesquisa BLAST no banco de dados do NCBI e de alinhamento de seguências utilizando Clustal X, o fragmento encontrado alinhado a outros inibidores de tripsina já descritos na literatura (figura 16). Os resultados sugerem que esta proteína se trata de um inibidor de tripsina pertencente à família do tipo Kunitz de semente de *Clitoria* fairchildiana. A sugestão foi baseada principalmente no peso molecular do CITI que se encaixa mais aos do tipo Kunitz do que nos inibidores do tipo Bowman-Birk, os quais possuem peso moleculares mais típicos entre 6-9 kDa. Apesar de ter uma massa molecular mais próxima para os de inibidores de tripsina tipo Kunitz, os dados do alinhamento mostram grandes semelhanças com a estrutura primária dos inibidores de tripsina do tipo Bowman-Birk. A homologia de sequência primária tem sido, em alguns casos, um critério não definitivo de classificação, como foi o caso de inibidores de Bowman-Birk, SBBI, que mostraram maior homologia (90%) com AAD09816.1 (inibidor do tipo Kunitz de *Glycine max*, leguminosa) com muitos resíduos conservados (Gu et al., 2014) e também com alguns inibidores bifuncionais de cereais α-amilase / serínica para o qual a sequência N-terminal de aminoácidos mostrou algum grau de homologia com inibidor de tripsina da família Kunitz de soja (Hejgaard et al., 1983, Mundy et al., 1984). Godbole et al. (1994) reportaram dois inibidores de proteases, incluindo um inibidor de tripsina e quimiotripsina, e outro inibidor de tripsina (tipo Bowman-Birk), com pesos moleculares de 15.000 e 10.500 Da, respectivamente, encontrados em *Cajanus cajan*. Klomklao et al., (2010) relataram que o peso molecular aparente do inibidor de tripsina foi estimado em 14 kDa baseados em gel SDS-PAGE. A massa molecular do inibidor de tripsina de feijão-bambara (*Vigna subterranea*) foi de 13 kDa (Benjakul *et al.*, 2000). Foram observadas duas bandas de atividade inibitória de tripsina em feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) (10 e 18 kDa) e feijão gandula (*Cajanus cajan*) (15 e 25 kDa) (Benjakul *et al.*, 2000). Wang *et al.* (2006) relataram que um inibidor de protease de feijão mungo (*Phaseolus mungo*) tinha uma massa molecular de 10 kDa em SDS-PAGE.

Os IPs serínicas isolados de várias sementes de leguminosas pertencem, em sua maioria, às famílias de inibidores do tipo Kunitz e do tipo Bowman-Birk. A massa molecular de inibidores do tipo Kunitz é de cerca de 20 kDa. Eles contêm quatro resíduos de cisteína que formam duas pontes dissulfeto e possuem um único sítio reativo (Richardson, 1991). Os inibidores de Bowman-Birk (BBIs) tem massa molecular entre 6 e 9 kDa e contêm principalmente uma cadeia polipeptídica com um padrão conservado e característico de 14 resíduos de cisteína que formam sete pontes de dissulfeto, são responsáveis por manter a estabilidade e estrutura dos BBI (Clemente & Domoney, 2006; Qi et al., 2005). Uma exceção é um inibidor do tipo Bowman-Birk de 13,600 Da purificado de sementes de Torresea cearensis, que tem ação sobre tripsina, quimiotripsina e o fator XII de coagulação do sangue (Tanaka et al., 1989). Geralmente possuem dupla cabeça e estão localizadas nos lados opostos da molécula, inibindo a tripsina e quimiotripsina de forma independente ou simultaneamente (Singh & Appu Rao, 2002). Estes sítios inibitórios diferem uns dos outros no que diz respeito à importância biológica (Clemente & Domoney, 2006). O sítio inibitório de tripsina é associado com a proteção de plantas contra insetos e microorganismos. Esta propriedade tem sido explorada no desenvolvimento de estratégias de controle de inseto (Franco et al., 2003; Pereira et al., 2007).

O isolamento desse inibidor foi continuado através de RP-HPLC, onde foram obtidas quatorze frações, sendo que apenas três frações apresentaram atividade inibitória contra tripsina (F10, F11 e F12) e quatro frações contra a papaína (F2, F3, F10 e F13). A fração F11 foi selecionada por apresentar uma banda protéica com massa aproximada de 13 kDa, pela confirmação através da análise por espectrometria de massas que proporcionou a mesma sequência obtida anteriormente (SIPPQCHCADIR) e foi obtido ainda um segundo fragmento (SCHSACK). A visualização em gel de SDS-PAGE 12% contendo 0,1% de gelatina confirmou também que a F11 é um inibidor de tripsina, uma vez que a tripsina não

digeriu a gelatina nesta região, devido à presença do inibidor. Estes dados estão de acordo com o ensaio de inibição da atividade da tripsina *in vitro* e com a seqüência dos fragmentos de aminoácidos obtidos, sugerindo então que a F11 é o ClfTI (inibidor de tripsina de *Clitoria fairchildiana*).

Diante desses resultados, a capacidade de inibição do ClfTI sobre a atividade de outras enzimas importantes, foi analisada. Nos ensaios realizados *in vitro*, o ClfTI foi capaz de inibir a atividade da tripsina de pâncreas de porco na proporção de 1 μ g de proteína do ClfTI (~0,37 μ M) para 5 μ g de enzima, na presença do substrato BApNA. Entretanto, não foi capaz de inibir a atividade das enzimas papaína, α -quimiotripsina, α -amilase, elastase e subtilisina.

A capacidade de inibição do ClfTI para enzimas intestinais de larvas em 4[°] instar (L4) de *A. aegypti* foi avaliada em ensaios *in vitro*. O ClfTI (0,37 μ M) foi capaz de inibir 87,93 % a atividade de enzimas intestinais de larvas de *A. aegypti*. Na literatura, apesar de vários estudos com *A. aegypti* e vários estudos com extratos vegetais, existem poucos relatos com proteínas vegetais purificadas envolvidas nos mecanismos de defesa, como as lectinas (Coelho *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2012; Napoleão *et al.*, 2012), proteínas inativadoras de ribossomos – RIPs (Nuchsuk *et al.*, 2012) e inibidores de proteases (Pontual *et al.*, 2014; Sasaki, 2014; Botelho- Júnior *et al.*, 2014). De forma similar, também há poucos relatos sobre as enzimas digestivas de larvas deste inseto, destacando-se os estudos sobre atividades de proteases serínicas (tripsina, quimiotripsina, elastase e colagenase) (Yang & Davies, 1971a; Kunz, 1978; Horler & Briegel, 1997; Mesquita-Rodrigues *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2011) e atividade de protease cisteínica do tipo papaína (Nunes *et al.*, 2013).

O primeiro trabalho relatando o efeito de um inibidor de tripsina isolado de flor de *Moringa oleifera* (MoFTI) sobre larvas de *A. aegypti* foi o de Pontual *et al.*, (2014), em que estes autores avaliaram a capacidade de eclosão dos ovos, a viabilidade de larvas, a sobrevivência de pupas e o crescimento de bactérias habitantes do intestino médio de larvas de quarto instar (L4) de *A. aegypti* na presença de extrato de flor de *M. oleifera* e de um inibidor de tripsina com massa de 18,2 kDa, isolado de *M. oleifera* (MoFTI). O extrato de flor (em concentrações de 8,5-17,0 mg/mL) reduziu a eclosão do ovo e a taxa de mortalidade não ultrapassou 19,1%. Enquanto MoFTI (0,05-0,5 mg/mL) não afetou a eclosão dos ovos, mas promoveu mortalidade (LC₅₀ de 0,3 mg/mL) de larvas. Na presença de MoFTI, em todas as concentrações testadas, as larvas não passaram do primeiro instar. Também foram investigados os

efeitos do extrato da flor e do MoFTI em pupas e os bioensaios mostraram que ambas as preparações não foram capazes de afetar a sobrevivência de pupas. Tanto o extrato quanto o MoFTI inibiram o crescimento de bactérias do intestino L4, mas apenas o inibidor MoFTI mostrou efeito bactericida na concentração de 1,0 mg/mL. Sabe-se que as larvas de *A. aegypti* sintetizam um elevado nível de enzimas tipo tripsina, porém, existem também outras proteases, em níveis mais baixos (Kunz 1978; Borovsky & Meola 2004; Venâncio *et al.*, 2009). Neste sentido, a morte de larvas provenientes de ovos de *A. aegypti* tratados com MoFTI, pode estar ligado ao bloqueio de enzimas semelhantes à tripsina ou outras proteases essenciais para nutrição larval desde os primeiros momentos após a eclosão (Pontual *et al.*, 2014).

Sasaki (2014) investigou os efeitos da exposição crônica e aguda do inibidor de protease de semente de Adenanthera pavonina (ApTI) sobre as larvas de A. aegypti, bem como um possível mecanismo de adaptação. O ApTI em concentração não-letal diminuiu a sobrevivência, o peso e atividades proteolíticas do intestino médio das larvas de A. aegypti. As enzimas digestivas das larvas alimentadas foram sensíveis ao ApTI e as atividades enzimáticas voltavam ao normal na ausência de ApTI; também as enzimas digestivas de larvas não foram capazes de degradar o inibidor. Além disso, os estudos histológicos demonstraram uma degeneração das microvilosidades das células epiteliais do intestino médio na região posterior, hipertrofia das células de cecos gástricos e um aumento no espaço ectoperitrófico. Ainda neste trabalho, para investigação do efeito agudo do ApTI (0,2 mg/mL) sobre a atividade proteolítica das enzimas digestivas de A. aegypti, usando BApNA e SAAPFpNA como substratos, foi observada uma redução significativa na atividade tríptica entre os tratamentos (grupo controle e alimentado) nos instares (L1, L2 e L3), exceto no L4, onde não houve diferenca significativa; o mesmo foi observado para a atividade quimotríptica.

Em nosso trabalho, o ClfTI na concentração de 0,37 µM foi capaz de reduzir 87,93% (figura 18) da atividade tríptica das enzimas digestivas das larvas no estágio L4. Níveis semelhantes de inibição foram relatados para um inibidor de tripsina de mamona (RcTI) que promoveu 91 % de inibição das proteases intestinais de *A. aegypti* quando testado a uma concentração de ~4,5 µM (Silva *et al.*, 2015) . Além disso, uma lectina isolada a partir de folhas de *Myracrodruon urundeuva* – aroeira (MuLL) foi avaliado em relação aos seus efeitos sobre as atividades de tripsina de intestinos de larvas (L4) de *A. aegypti* (Napoleão *et al.*, 2012). A atividade das

proteases na presença de MuLL foi inibida em apenas 30% na concetração de 4,4 uM. Ambos os exemplos demonstram uma menor eficácia para inibir enzimas intestinas de larvas de *A. aegypti* em L4, quando comparado com CfITI.

Botelho-Júnior *et al.* (2014) relataram a presença de sete inibidores de proteases de folhas de maracujá, e todos foram capazes de inibir a atividade da tripsina, sendo o PfKTI-1 específico para tripsina, os PfKTI- 2, 3, 5 e 6 ativos sobre quimitripsina, e os PfKTI-4 e 7 ativos sobre papaína. Os inibidores também foram capazes de inibir as proteases do intestino médio de *A. aegypti*, sendo o PfKTI-7 foi mais eficiente e os PfKTI-4 e 5 menos eficientes na inibição destas proteases.

Com a intenção de visualização de quais enzimas eram afetadas na presença do ClfTI, foram realizadas zimografias na presença e na ausência de ClfTI, PMSF, EDTA, E-64 e pepstatina-A. No presente trabalho, foram detectadas as atividades proteolíticas de homogenatos intestinais de larvas de 4º instar durante 1 h de incubação em pH 8,0, o perfil enzimático, o uso de alguns inibidores, foi semelhante ao trabalho de Mesquita et al., (2011), no qual observaram seis a oito bandas no perfil enzimático de homogenatos intestinas de larvas de A. aegypti, corroborando com os nossos dados. Os autores relataram que a atividade de enzimas intestinais de larvas de *A. aegypti* são tempo e pH dependentes, sugerindo que as condições experimentais ótimas para detectar a atividade proteolítica em larvas de diferentes instares seriam em pH 7,5, por 1 h. Também foram utilizados inibidores de proteases, comercialmente adquiridos, como o E-64, pepstatina A e PMSF, onde o E-64 e a pepstatina A não afetaram a atividade das enzimas intestinais e o PMSF inibiu a atividade das enzimas. Ao contrário do relatado por estes autores, pepstatina A reduziu a atividade de uma banda de atividade acima de 95 kDa, a uma concentração de 13,26 μ M, concentração maior que a usada pelos autores (10 μ M), acreditamos que o efeito não foi da pepstatina e sim do DMSO, uma vez que a tal enzima é dissolvida em DMSO. Também foi testado o EDTA (9 mM) como o inibidor de metaloproteases, o qual não afetou a atividade das enzimas digestivas. Já o inibidor isolado neste trabalho, ClfTI, inibiu a atividade de todas as bandas de atividade do extrato enzimático (L4) após 16 h de incubação (figura 19). Nos primeiros 30 min de incubação das enzimas digestivas com o ClfTI a atividade das enzimas foram afetadas (figura 20), corroborando com os ensaios in vitro no qual o CITI (0,37 µM) foi capaz de inibir 87,93 % a atividade de enzimas intestinais de larvas de Aedes aegypti.

Sasaki *et al.* (2014) também observaram por zimografia o perfil proteolítico do extrato de intestino médio de larvas expostas cronicamente ao ApTI por 96 h, dos grupos controle e alimentado. As amostras foram tratadas com inibidores de protease antes da corrida eletroforética: TLCK 100 mM (inibidor de tripsina), TPCK 100 mM (inibidor de quimiotripsina) e PSMF 250 mM (serino/cisteíno proteases do inibidor). Os padrões de atividade de protease resultaram no aparecimento de sete proteases, tanto no controle quanto no alimentado. Não foram observadas diferenças no perfil do grupo controle e do alimentado. Quando os extratos enzimáticos foram tratados com TLCK, três bandas foram inibidas, o que sugere a presença de três proteases do tipo tripsina. O perfil proteolítico do controle e das larvas alimentadas mostra bandas fracamente inibidas por TPCK. No entanto, quando as amostras foram incubadas com PMSF, todas as bandas foram aparentemente inibidas, demonstrando uma alta atividade de proteases do tipo serino / cisteíno nos homogenatos intestinais.

Em plantas, inibidores de tripsina geralmente exibem um resíduo de lisina na posição P1 no seu sítio reativo, e enzimas do tipo tripsina de insetos, preferencialmente hidrolisam ligações peptídicas envolvendo resíduos de arginina (Hedstrom, 2002; Lopes *et al.*, 2004). Estas características permitem que o sítio reativo do inibidor possa interagir com o sítio ativo da enzima, sem sofrer hidrólise. Assim, a ingestão de inibidores de tripsina pode levar ao bloqueio de enzimas digestivas que afetam a absorção de aminoácidos essenciais e matar o inseto por desnutrição (Paiva *et al.*, 2013).

Além dos testes realizados com *A. aegypti*, também foi avaliada a ação antifúngica das frações enriquecidas com inibidores de proteases cisteínicas e serínicas, sobre o crescimento de células de leveduras *C. albicans*. Inicialmente, os ensaios foram realizados com os picos obtidos na cromatografia de exclusão molecular P1, P2 e P3. Os picos P1 e P3 inibiram o crescimento das células de *C. albicans*, quando comparados com o controle, como pode ser observado na figura 8 A e C. O P3, apesar de apresentar perfil semelhante ao P1, foi testado em concentração muito mais baixa de proteína (3,76 µg/mL, comparada a 15,76 µg/mL de P1). Também foi possível observar alterações na morfologia das células como a formação de pseudohifas (figura 9B) que não são observadas no controle e também aglomerados celulares (figura 9 C, D). Na figura 9 C e D também foi possível observar aglomerados celulares, mas o número de células em D é muito menor que

em A (controle) e em C. Porém, com as frações F2, F3 e F13 (figura 21), obtidas em cromatografia de fase reversa em sistema HPLC, enriquecidas com cistatinas, não foi possível observar inibição do crescimento da levedura *C. albicans*, nas concentrações testadas. Uma cistatina de clara de ovo de galinha mostrou atividade candidacida, e inibiu completamente o crescimento de isolados de *C. albicans* em concentrações efetivas mínimas variando de 0,8 a 3,3 µmol L-1. Esta cistatina inibiu também o crescimento de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* em concentrações similares, enquanto *C. glabrata* foi resistente à cistatina de clara de ovo de galinha (Koaczkowska *et al.*, 2009). Até o presente momento, esse é o único relato na literatura de ação candidacida de uma cistatina e nenhum relato para fitocistatinas foi encontrado.

Nos ensaios realizados com as frações F10, F11 (ClfTI) e F12, da cromatografia de fase reversa, enriquecidas com inibidores de proteases serínicas, não foi possível observar inibição do crescimento da levedura *C. albicans* (figura 22), nas concentrações testadas (100 µg.mL⁻¹).

Um inibidor de tripsina do tipo Bowman-Birk de sementes de *Lens culinaris* com massa de 16 kDa, altamente sensível ao agente redutor ditiotreitol (DTT), e ativo contra tripsina e quimiotripsina, não exerceu nenhum efeito inibitório sobre algumas espécies de fungos testadas incluindo *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola* (Cheung & Ng 2007).

Alguns estudos têm relatado ação fungicida de inibidores de tripsina e albuminas 2S (Giudici *et al.*, 2000; Agizzio *et al.*, 2003, 2006; Pelegrini *et al.*, 2006). Por exemplo, uma proteína antifúngica designada como Psc-AFP, com massa molecular aproximada de 18 kDa, foi isolada a partir de *Psoralea corylifolia*. Através da sequência parcial do N-terminal, foi constatada homologia com inibidores de tripsina. O Psc-AFP, na concentração de 10 mM, inibiu o crescimento micelial de *Alternaria brassicae, Aspergillus niger, Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia cerealis,* sugerindo que o Psc-AFP também tem um papel importante na defesa contra agentes patogênicos (Yang *et al.*, 2006).

Ribeiro *et al.* (2007) avaliaram a atividade tóxica de uma fração rica em peptídeos, chamada F3, obtida em cromatografia de troca iônica, presentes em sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.) contra as espécies de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Pichia membranifaciens*, *Kluyveromyces marxiannus* e *Candida*

guilliermondii; tal fração inibiu o crescimento de todas as leveduras citadas. A fração F3 também foi capaz de inibir a acidificação do meio, estimulada por glicose, por células de leveduras de *S. cerevisiae* e foi capaz de causar várias alterações morfológicas, tais como desorganização da parede celular, formação de gemas, bem como a formação de pseudohifas. O inibidor de tripsina presente na F3 foi isolado, e chamado de CaTI, O efeito desse inibidor foi testado na concentração de 16 µg.mL⁻¹, contra as leveduras *S. cerevisiae* e *C. albicans*, sendo possível observar um efeito significativo do CaTI, especialmente contra *S. cerevisiae*. A diferença encontrada no crescimento destas espécies diferentes de levedura pode ser influenciada, principalmente, pelo desenvolvimento diferenciado de cada célula.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que o inibidor de tripsina de *C. fairchildiana* chamado de ClfTI, com massa molecular aparente de 13000 Da, age especificamente sob a enzima tripsina e pôde inibir eficazmente, em testes *in vitro*, a maioria das enzimas digestivas de larvas de *A. aegypti* no quarto estágio de desenvolvimento. Porém não foi capaz de inibir o crescimento da levedura *C. albicans.*

7- Conclusão

- ✓ O inibidor de tripsina com massa molecular aparente de 13.000 Da de (ClfTI) que atua especificamente sobre as enzimas semelhantes à tripsina, foi isolado de sementes de *C. fairchildiana.*
- A partir desse inibidor foram obtidos dois fragmentos peptídicos de 12 e 7 aminoácidos (SIPPQCHCADIR e SCHSACK) identificados por espectrometria de massas, similares aos inibidores de tripsina do tipo Bowman-Birk, de *Vigna unguiculata* - InProVigungcy (EMBL CAM35517);
- Frações denominadas P1, P2 e P3 obtidas de cotilédones de sementes de *C. fairchildiana* alteraram a morfologia das células de *C. albicans*. Com a formação de pseudohifas, aglomerados celulares e redução do número de células;
- ✓ As frações F10, F11 e F12 resultantes do fracionamento do pico P2 não inibiram o crescimento das leveduras *C. albicans*;
- Em testes *in vitro*, o ClfTl inibiu em 87,93% a atividade de enzimas digestivas de larvas do mosquito *A. aegypti* no quarto estágio de desenvolvimento;
- O ClfTI inibiu seis enzimas digestivas de larvas do mosquito Aedes aegypti no quarto estágio de desenvolvimento;
- O inibidor PMSF (específico para proteases da classe serínica), inibiu completamente a atividade de todas as enzimas digestivas de larvas do mosquito *A. aegypti* no quarto estágio de desenvolvimento;
- Os inibidores EDTA (específico para metaloproteases), pepstatina-A (específico para proteases aspáticas) e E-64 (específico para proteases cisteínicas) não inibiram a atividade das enzimas digestivas de larvas do mosquito *A. aegypti* no quarto estágio de desenvolvimento, nas concentrações testadas.

8- Referências Bibliográficas

Abraham, Z., Martinez, M., Carbonero, P., Diaz, I. (2006). Structural and Functional diversity within the cystatin gene family of *Hordeum vulgare. Journal of Experimental Botany*. 57: 4245 - 4255.

Agizzio, A.P., Carvalho, A.O., Ribeiro, S.F.F., Machado, O.L.T., Alves, E.W., Okorokov, L.A., Samarão, S.S., Júnior, C.B., Prates, M.V., Gomes, V.M. (2003). A 2S albumin-homologous protein from passion fruit seeds inhibits the fungal growth and acidification of the medium by *Fusarium oxysporum*. *Archives Biochemistry Biophysics*. 416, 188 - 195.

Agrios, G.N. (1997). How plants defend themselves against pathogens. In: Agrios, G.N. (Ed.) *Plant pathology*. 4thed., 93 - 114.

Alexopoulos, C.J., Mins, C.W., Blackwell, M. (1996). *Introductory Mycology*. 4thed. 272 - 291.

Alfonso-Rubí, J., Ortego, F., Sanchez-Monge, R., Garcia-Casado, G., Pujol, M., Castañera, P., Salcedo, G. (1997). Wheat and barley inhibitors active towards a-amylase and trypsinlike activities from *Spodoptera frugiperda*. *Journal of Chemical Ecology*. 23, 1729 - 1741.

Alfonso-Rubí, J., Ortego, F., Castañera, P., Carbonero, P., Díaz, I. (2003) Transgenic expression of trypsin inhibitor CMe from barley in *Indica* and *Japonica* rice, confers resistance to the rice weevil *Sitophilus oryzae*. *Transgenic Research*. 12, 23 - 31.

Altschul, A.M. & Evans, W.J. (1967). Zone electrophoresis with polyacrylamide gel. *Methodos in Enzymology.* 11, 179 - 186.

Ascenzi, P., Bocedi, A., Bolognesi, M., Spallarossa, A., Coletta, M., De Cristofaro, R., Menegatti, E. (2003). The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor: A milestone protein). *Current Protein & Peptide Science*. 4, 231 - 251.

Babu, S.R., Subrahmanyam, B. (2010). Bio-potency of serine proteinase inhibitors from *Acacia senegal* seeds on digestive proteinases, larval growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Pesticide Biochemistry Physiology*. 98, 349 - 358.

Barahona, R., Lascano, C.E., Narvaez, N., Owen, E., Morris, P., Theodorou, M.K. (2003). In vitro degradability of tropical legumes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 83, 1256 - 1266.

Barillas-Mury, C. & Wells, M.A. (1993). Cloning and sequencing of the blood mealinduced late trypsin gene from the mosquito *Aedes aegypti* and characterization of the upstream regulatory region. *Insect Molecular Biology*. 2, 7 - 12.

Barreto, C. F. (2005). *Aedes aegypti* – resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. *Revista eletrônica Faculdade Montes Belos*. V.1, n.2, p. 62 - 73.

Benjakul, S., Visessanguan, W., Thummaratwasik, P. (2000). Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some *Thai legume* seeds. *Journal of Food Biochemistry*. 24, 107 - 127.

Bewley, J.D. & Black, M. (1994). In: Seeds – Physiology of Development and Germination. 2th ed. *Plenum Press*. 445.

Bhattacharyya, A., Rai, S., Babu, C.R. (2007). A trypsin and chymotrypsin inhibitor from *Caesalpinia bonduc* seeds: isolation, partial characterization and insecticidal properties. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45, 169 - 177.

Bijina, B., Chellappan, S., Krishna, J.G., Basheer, S.M., Elyas, K.K., Bahkali A.H., Chandrasekaran, M. (2011). Protease inhibitor from *Moringa oleifera* with potential for use as therapeutic drug and as seafood preservative. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 18, 273 - 281.

Birk, Y. (1985). The Bowman-Birk inhibitor trypsin and chymotrypsin inhibitor from *soybeans*. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 25, 113-131.

Birk, Y., Gertler, A., Khalef, S. (1963). A pure trypsin inhibitor from Soybeans. *Biochemical Journal*. 87, (2) 281.

Bode, W. & Hubr, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *European Journal of Biochemistry*. 204, 433 - 451.

Borovsky, D. & Meola S.M. (2004) Biochemical and cytoimmunological evidence for the control of *Aedes aegypti* larval trypsin with Aea- TMOF. *Archives of Insect Biochemistry Physiology.* 55, 124 - 139.

Botelho-Júnior, S., Machado, O.L.T., Fernandes, K.V.S., Lemos, F.J.A., Perdizio, V.A., Oliveira, A.E.A., Monteiro, L.R., Filho, M.L., Jacinto, T. (2014). Defense response in non-genomic model species: methyl jasmonate exposure reveals the passion fruit leaves' ability to assemble a cocktail of functionally diversified Kunitz-type trypsin inhibitors and recruit two of them against papain. *Planta*. 240, 345 - 356.

Bowman, D.E. (1946). Differentiation of *Soybean* antitryotic factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 63, 547 - 550.

Broadway, R.M. (2000). The response of insects to dietary protease inhibitors. *Bioscience / Eurekah.*com. 80 - 88.

Carrillo, L., Herrero, I., Cambra, I., Sánchez-Monge, R., Díaz, I., Martinez (2011). Differential *in vitro* and *in vivo* effect of barley cysteine and serine protease inhibitors on phytopathogenic microorganisms. *Plant Physiology and Biochemistry*. 49, 1191-1200.

Chen, P., Rose, J., Love, R., Wei, C.H., Wang, B.C. (1992). Reactive sites of an anticarcinogenic Bowman-Birk proteinase inhibitor are similar to other trypsin inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*. 267, 1990 - 1994.

Cheung, A.H.K. & Ng, T.B. (2007). Isolation and characterization of a trypsinchymotrypsin inhibitor from the seeds of green lentil (*Lens culinaris*). *Protein Peptide Letters*. 14, 859 - 864.

Clemente, A. & Domoney, C. (2006). Biological significance of polymorphism in legume protease inhibitors from the Bowman-Birk family. *Current Protein & Peptide Science*. 7, 201 - 216.

Coelho, J.S., Santos, N.D.L., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Ferreira, R.S., Zingali, R.B., Coelho, L.C.B.B., Leite, S.P., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G. (2009). Effect

of *Moringa oleifera* lectin on development and mortality of *Aedes aegypti* larvae. *Chemosphere.* 77, 934 - 938.

Craik, C.S., Largman, C., Fletcher, T., Roczniak, S., Barr, P.J, Fletterick, R., Rutter, W.J. (1985). Redesigning trypsin: alteration of substrate specificity. *Science*. 228, 291 - 297.

Cyran, R. (2002). New Developments in Therapeutic Enzyme Inhibitors and Blockers. *BCC Research*. C- 202.

Da Cunha, P. (2005). Monografia apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense para obtenção do Grau de Bacharelado em Ciências Biológicas.

De Leo, F., Volpicella, M., Licciulli, F., Liuni, S., Gallerani, R., Ceci, L.R. (2002). Plant-IPs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Research*. 30, 347 - 348.

Dunaevsky, Y.E., Elpidina, E.N., Vinokurov, K.S., Belozersky, M.A. (2005). Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. *Molecular Biology*. 39, 608 - 613.

Dunn, B.M. (2001). Determination of protease mechanism. *In Proteolytic Enzymes: A Practical Approach.* 2nded. 77 - 104.

Dunn, M.J. & Crisp, S.J. (1994). Detection of Proteins in Polyacrylamide Gels Using an Ultrasensitive Silver Staining Technique. *In: Walker, Journal Methods in Molecular Biology*. 113 - 118.

Eckelkamp, C., Ehmann, B., Schopfer, P. (1993). Wound-induced systemic accumulation of a transcript coding for a Bowman-Birk trypsin inhibitor-related protein in maize (*Zea mays L.*) seedlings. *FEBS* Letters. 323, 73 - 76.

Erlanger, B.F., Kokowsky, N., Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 95, 271 - 278.

Farias, D.F., Cavalheiro, M.G., Viana, M.P., Queiroz, V.A., Rocha-Bezerra, L.C.B., Vasconcelos, I.M., Morais, S.M., Carvalho, A.F.U. (2010). Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 82, 585 - 594.

Felicioli, R., Garzelli, B., Vaccari, L., Melfi, D., Balestreri, E. (1997). Activity staining of proteins inhibitors of proteases on gelatin containing polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry*. 244, 176 - 178.

Franco, O.L., Dos Santos, R.C., Batista, J.A.N. (2003) Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. *Phytochemistry* 63, 343 - 349.

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

Gatehouse, J.A. (2011). Prospects for using proteinase inhibitors to protect transgenic plants against attack by herbivorous insects. *Current Protein & Peptide Science*. 5, 409 - 416.

Giudici, A.M., Regente, M.C., Cana, L. (2000). A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. *Plant Physiology and Biochemistry*. 38, 881 - 888.

Godbole, S.A., Krishna, T.G., Bhatia, C.R. (1994). Purification and characterization of protease inhibitors from pigeon pea (*Cajanus cajan* (L) Millsp) seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 64, 87 - 93.

Goffeau, A., Barrel, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*. 274, 546 - 567.

Gomes, C.E.M., Barbosa, E.A.D., Macedo, L.L.P., Pitanga, J.C.M., Moura, F.T., Oliveira, A.S., Moura, R.M., Queiroz, A.F.S., Macedo, F.P., Andrade, L.B.S., Vidal, M.S., Sales, M.P. (2005) Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida seeds* on

Callosobruchus maculates (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). *Plant Physiology and Biochemistry*. 46, 1095 - 1102.

Gondim-Junior, M.G.C., Barros, R., Silva, F.R., Vasconcelos, G.J.N. (2005). Occurrence and biological aspects of the *Clitoria* tree psyllid in Brazil. *Scientia Agricola.* 62, 281 - 285.

Gu, C., Song, X., Zhao, L., Pan, S., Qin, G. (2014). Purification and Characterization of Bowman-Birk Trypsin Inhibitor from *Soybean. Journal of Food and Nutrition Research.* 2, 546 - 550.

Gusmão, D.S., Santos, A.V., Marini, D.C., Bacci, Jr. M., Berbert-Molina, M.A., Lemos, F.J.A. (2010) Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Tropica*. 115, 275 - 281.

Gwards, R & Collins, FH (1996). Anopheline mosquitoes and the agents they transmit. In: Beaty, B.J. & Marquardt, W.C. *The Biology of Disease Vectors*. 73 - 84.

Habib, H. & Fazili, K. M. (2007). Plant protease inhibitors: defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 2, 068 - 085.

Haq, S.K., Atif, S.M., Khan, R.H. (2004). Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 431, 145 - 159.

Harsulkar, A.M., Giri, A.P., Patankar, A.G., Gupta, V.S., Sainani, M.N., Ranjekar, P.K, Deshpande, V.V. (1999). Successive use of non-host plant protease inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteases and larval growth. *Plant Physiology*. 121, 497 - 506.

Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. Chemical Reviews. 102, 4501-4523.

Heintze, C., Garrido, M.V., Kroeger, A. (2007). What do community-based dengue control programmes achieve? A systematic review of published evaluations. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 101, 317 - 325.

Heussen, C. & Dowdle, E.B. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry*. 102,196 - 202.

Horler, E. & Briegel, H. (1997). Chymotrypsin inhibitors in mosquitoes: Activity profile during development and after blood feeding. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 36, 315 - 333.

Imada, C. (2005). Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek.* 87, 59 - 63.

Ishikawa, A., Ohta, S., Matsuoka, K., Hattori, T., Nakamura, K. (1994). A family of potato genes that encode Kunitz type proteinase inhibitors: structural comparisons and differential expression. *Plant Cell Physiology*. 35, 303 - 312.

Isoe, J., Zamora, J., Miesfeld, R.L. (2009). Molecular analysis of the *Aedes aegypti* carboxypeptidase gene family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 39, 68-73.

Isola, M., Isola, R., Lantini, M. S., Riva, A. (2009). The three-dimensional morphology of *Candida albicans* as seen by hight-resolution scanning electron microscopy. *Journal Microbiology*. 47, 260 - 264.

Ivanov, D., Emonet, C., Foata, F., Affolter, M., Delly, M., Fisseha, M., Blum-Sperisen, S., Kochhar, S., Arigoni, F. (2006). A serpin from the gut bacterium Bifidobacterium longum inhibits eukaryotic elastase like serine proteases. *The Journal of Biological Chemistry.* 28, 246 - 252.

Iwanaga, S., Yamasaki, N., Kimura, M., Kouzuma, Y. (2005). Contribution of conserved Asn residues to the inhibitory activities of Kunitz-type protease inhibitors from plants. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 69, 220 - 223.

Jamal, F., Pandey, P.K., Singh, D., Khan, M.Y. (2013). Serine protease inhibitors in plants: nature's arsenal crafted for insect predators. *Pytochemistry Reviews*. 12, 1-34.

Jiang, Q., Hall, M., Fernando, G. Noriega, F.G., Wells, M. (1997). cDNA cloning and pattern of expression of an adult, female specific chymotrypsin from *Aedes aegypti* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 27, 283 - 289.

Johnson, S. & Pellecchia, M. (2006). Structure and fragment based approaches to protease inhibition. *Current Topics in Medicinal Chemistry.* 6, 317 - 329.

Jongsma, M.A. & Bolter, C. (1997). The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal Insect Physiology*. 43, 885 - 895.

Joshi, B.N., Sainani, M.N., Bastawade, K.B., Gupta, V.S., Ranjekar, P.K. (1998). Cysteine proteinase inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 246, 382 - 387.

Kato, H. (2002). Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor-basic and clinical aspects. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 22, 539 - 548.

Klomklao, S., Benjakul, S., Kishimura, H., Osako, K., Tanaka, M. (2010). A heatstable trypsin inhibitor in adzuki bean (*Vigna angularis*): effect of extraction media, purification and biochemical characteristics. *Journal of Food Science and Technology*. 45, 163 - 169.

Kolaczkowska A., Kolaczkowski M., Sokolowska A., Miecznikowska H., Kubiak A., Rolka K., Polanowski A. (2009). The antifungal properties of chicken egg cystatin against *Candida* yeast isolates showing different levels of azole resistance. *Mycoses.* 53 (4), 314 - 320.

Kovendan, K., Murugan, K., Vincent, S. (2012). Evaluation of larvicidal activity of *Acalypha alnifolia* Klein ex Willd. (Euphorbiaceae) leaf extract against the malarial vector, *Anopheles stephensi*, dengue vector, *Aedes aegypti* and *Bancroftian filariasis* vector, *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*. 110, 571 - 581.

Kunitz, M. (1947). Crystalline soybean trypsin Inhibitor: II. General properties. *The Journal of General Physiology*. 30, 291 - 310.

Kunz, P.A. (1978). Resolution and properties of the proteinases in the larva of the mosquito, *Aedes aegypti. Insect Biochemistry.* 8, 43 - 51.

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

Lara, P., Ortego, F., Gonzalez-Hidalgo, E., Castañera, P., Carbonero, P., Díaz, I. (2000). Adaptation of Spodoptera exigua (Lepidoptera: Noctuidae) to barley trypsin inhibitor BTI-CMe expressed in transgenic tobacco. *Transgenic Research*. 9, 169 - 178.

Laskowski, M.Jr. & Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Annual Review of Biochemistry*. 49, 685 - 693.

Lawrence, P.L. & Koundal, K.R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*. 5, 93 - 109.

Lee, C.F. & Lin, J.Y. (1995). Amino acid sequences of trypsin inhibitors from the *Cucumis melo. The Journal Biochemistry*. 118, 18 - 22.

Lee, S.J., Lee, S.H., Koo, J.C., Chun, H.J., Lim, C.O., Mun, J.H., Song, Y.H., Cho, M.J. (1999). Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown planthopper (*Nilaparvata lugens* Stal) in transgenic rice. *Molecular Breeding.* 5, 1 - 9.

Lemos, F.J.A., Cornel, A.J., Jacobs-Lorena, M. (1996). Trypsin and aminopeptidase gene expression is affected by age and food composition in *Anopheles gambit*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 26, 651 - 658.

Lima, T.B., Silva, O.N., Migliolo, L., Souza-Filho, C.R., Gonçalves, E.G., Vasconcelos, I.M., Oliveira, J.T.A., Amaral, A.C., Franco, O.L. (2011). A kunitz proteinase inhibitor from corms of *Xanthosoma blandum* with bactericidal activity. *Journal of Natural Products*. 74, 969 - 975.

Lin, G.D., Bode, W., Huber, R., Chi, C.W., Engh, R.A. (1993). The 0.25nm X-ray structure of the Bowman-Birk type inhibitor from *Mung bean* in ternary complex with porcine trypsin. *European Journal of Biochemistry.* 212, 549 - 555.

Lopes, A.R., Juliano, M.A., Juliano, L., Terra, W.R. (2004) Coevolution of insect trypsins and inhibitors. *Arch Insect Biochemistry Physiology.* 55, 140 - 152.

Lopes, A.R. & Terra, W.R. (2003). Purification, properties and substrate specificity of a digestive trypsin from *Periplaneta americana* (Dictyoptera) adults. *Insect Biochemistry Molecular Biology*. 33, 407 - 415.

Lopes, J.L.S., Valadares, N.F., Moraes, D.I., Rosa, J.C., Araujo, H.S.S., Beltramini, L.M. (2009). Physico-chemical and antifungal properties of protease inhibitors from *Acacia plumosa. Phytochemistry.* 70, 871 - 879.

Lorenzi, H.(2002). Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, vol. 1, 4ª edição. *Instituto Plantarum*.

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

Macedo, M.L.R., Garcia, V.A., Freire, M.G.M., Richardson, M. (2007). Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Wild. *Phytochemistry*. 68, 1104 - 1111.

Macedo, M.L.R., Oliveira, C.F.R., Costa, P.M., Castelhano, E.C., Silva-Filho, M.C. (2015). Adaptive mechanisms of insect pests against plant protease inhibitors and future prospects related to crop protection: A review. *Protein Peptide Letters*. 22, 149 - 163.

Macedo, M.L.R., Sá, C.M., Freire, M.G.M., Parra, J.R.P. (2004). A Kunitz-type inhibitor of coleopteran proteases, isolated from *Adenanthera pavonina* L. seeds and its effect on *Callosobruchus maculatus. Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 2533 - 2540.

Machado, M.C. (2000). Biologia comparada de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: *Hesperiidae*) em *Clitoria fairchildiana*, *Centrosema pubescens, Galactia striata* (Leguminosae) e alimentação alternada. Dissertação (Mestrado em

Ciências Ambientais e Florestais) Curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Mackenzie, J.S., Gubler, D.J., Petersen, L.R. (2004) Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of *Japanese encephalitis*, West Nile and dengue viruses. *Nature Medicine*. 10, 98 - 109.

Martinez, M., Abrahan, Z., Gambardella, M., Echaide, M., Carbonero, P., Díaz, I. (2005). The strawberry gene Cyf1 encodes a phytocystatin with antifungal properties. *Journal of Experimental Botany.* 56, 1821 - 1829.

Martinez, M., Lopez-Solanilla, E., Rodriguez-Palenzuela, P., Carbonero, P., Diaz, I. (2003). Inhibition of plant-pathogenic fungi by the barley cystatin HvCPI (gene Icy) is not associated with its cysteine proteinase inhibitory properties. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. 16, 876 - 883.

Mcbride, J. L. & Bielefeldt-Ohmann, H. (2000). Dengue Viral Infections, pathogenesis and epidemiology. *Microbes and infections*. 1041 - 1050.

McManus, M.T., Laing, W.A., Allan, A.C. (2002). In Protein Protein interactions in plants. *Sheffield Academic Press*. 7, 77 - 119.

Mesquita-Rodrigues, C., Saboia-Vahia, L., Cuervo, P., Levy, C.M., Honorio, N.A. (2011). Expression of trypsin-like serine peptidases in pre-imaginal stages of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 76, 223 - 235.

Michaud, D., Nguyen-Quoc, B., Bernier-Vadnais, N., Faye, L., Yelle, S. (1994). Cysteine proteinase forms in sprouting potato tuber. *Plant Physiology*. 90, 497 - 503.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry.* 31, 426 - 428.

Moll, R.M., Romoser, W.S., Modrzakowski, M.C., Moncayo, A.C., Lerdthusnee, K. (2001). Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *Journal of Medical Entomology*. 38, 29 - 32.

Morlais, I., Mori, A., Schneider, J.R., Severson, D.W. (2003). A targeted approach to the identification of candidate genes determining susceptibility to *Plasmodium gallinaceum* in *Aedes aegypti*. *Molecular Genetics Genomics*. 269, 753 - 764.

Mundy, J., Heigaard, J. Svendsen, I. (1984). FEBS Letters. 167, 210 - 214.

Mundy, J., Svendsen, I., Hejgaard, J. (1983). Carlsberg Res. Commun.48, 81 - 90.

Napoleão, T.H., Pontual, E.V., Lima, T.A., Santos, N.D.L., Sá, R.A., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G. (2012). Effect of *Myracrodruon urundeuva* leaf lectin on survival and digestive enzymes of *Aedes aegypti* larva. *Parasitology Research.* 110, 609 - 616.

Nasci, R.S. & Miller, B.R. (1996). Culicine mosquitoes and the agents they transmit. *In The biology of disease vectors*. 85 - 97.

Natal, D. (2002). Bioecologia do Aedes aegypti. Biológico. V.64, (2), 205 - 207.

Nene, V., Wortman, J.R., Lawson, D., Haas, B., Kodira, C., Tu, Z.J., Loftus, B., Xi, K., Grabherr, M., Ren, Q., Zdobnov, E.M., Lobo, N.F., Campbell, Z., Megy, K.S., Brown, S.E., Bonaldo, M.F., Zhu, J., Sinkins, S.P., Hogenkamp, D.G., Amedeo, P., Arensburger, P., Atkinson, P.W., Bidwell, S., Biedler, J., Birney, E., Bruggner, R.V., Costas, J., Coy, M.R., Crabtree, J., Crawford, M., Debruyn, B., Decaprio, D., Eiglmeier, K., Eisenstadt, E., El-Dorry, H., Gelbart, W.M., Gomes, S.L., Hammond, M., Hannick, L.I., Hogan, J.R., Holmes, M.H., Jaffe, D., Johnston, J.S., Kennedy, R.C., Koo, H., Kravitz, S., Kriventseva, E.V., Kulp, D., Labutti, K., Lee, E., Li, S., Lovin, D.D., Mao, C., Mauceli, E., Menck, C.F., Miller, J.R., Montgomery, P., Mori, A., Nascimento, A.L., Naveira, H.F., Nusbaum, C., O'leary, S., Orvis, M., Quesneville, H., Reidenbach, K.R., Rogers, J., Pertea, Y.H., Roth, C.W.; Schneider, J.R.; Schatz, M.; Shumway, M.; Stanke, M.; Stinson, E.O.; Tubio, J.M., Vanzee, J.P., Verjovski-Almeida, S., Werner, D., White, O., Wyder. S., Zeng, Q., Zhao, Q., Zhao, Y., Hill, C.A., Raikhel, A.S., Soares, M.B., Knudson, D.L., Lee, N.H., Galagan, J., Salzberg, S.L., Paulsen, I.T., Dimopoulos, G., Collins, F.H., Birren, B., Fraser-Liggett, C.M., Severson, D.W. (2007). Genome sequence of Aedes aegypti, a major arbovirus vector. Science. 316, 1718 - 1723.

Ng, T.B. (2004). Antifungal proteins and peptides of leguminous and non-leguminous origins. Review. *Peptides.* 25, 1215 - 1222.

Norioka, S. & Ikenaka, T. (1983). Aminoacid sequence of a trypsin chymotrypsin inhibitor B-III, of peanut (Arachis hypogaea). *Journal of Biochemistry*. 93 (2), 479 - 485.

Nuchsuk, C., Wetprasit, N., Roytraku, L.S., Ratanapo, S. (2012). Larvicidal activity of a toxin from the seeds of *Jatropha curcas* Linn. against *Aedes aegypti* Linn. and *Culex quinquefasciatus. Asian Pacific Journal Tropical Biomedicine*. 29, 286 - 296.

Nunes, N.N., Santana, L.A., Sampaio, M.U., Lemos, F.J., Oliva, M.L. (2013). The component of *Carica papaya* seed toxic to *Aedes aegypti* and the identification of tegupain, the enzyme that generates it. *Chemosphere*. 92, 413 - 420.

Odani, S., Koide, T., Ono, T. (1986). Wheat gram trypsin inhibitor. Isolation and structural characterization of single-headed and double-headed inhibitors of the Bowman-Birk type. *Journal Biochemistry*. 100, 975 - 983.

Oliva, M.L.V., Silva, M.C.C., Sallai, R.C., Brito, M.V., Sampaio, M.U. (2010). A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie*. 92, 1667 - 1673.

Oliveira, A.S., Migliolo, L., Aquino, R.O., Ribeiro, J.K., Macedo, L.L., Bemquerer, M.P., Santos, E.A., Kiyota, S., Sales, M.P. (2009). Two Kunitz-type inhibitors with activity against trypsin and papain from *Pithecellobium dumosum* seeds: purification, characterization, and activity towards pest insect digestive enzyme. *Protein Peptides Letters*. 16, 1526 - 1532.

Oliveira, A.S., Migliolo, L., Aquino, R.O., Ribeiro, J.K., Macedo, L.L., Andrade, L.B., Bemquerer, M.P., Santos, E.A., Kiyota, S., Sales, M.P. (2007). Purification and characterization of a trypsin–papain inhibitor from *Pithecelobium dumosum* seeds and its in vitro effects towards digestive enzymes from insect pests. *Plant Physiology Biochemistry*. 45, 858 - 865.

Paiva, P.M.G., Pontual, E.V., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B. (2013) Lectins and trypsin inhibitors from plants: biochemical characteristics and adverse effects on insect larvae. *Nova Science*. 52.

Paiva, P.M.G., Pontual, E.V., Napoleão, T.H., Coelho, L.C.B.B. (2012). Effects of plant lectins and trypsin inhibitors on development, morphology and biochemistry of insect larv*a*. In: Kia Pourali; Vafa Niroomand Raad. (Org.). Larvae: Morphology, Biology and Life Cycle. *Nova Science Publishers*. 37 - 55.

Park, Y., Choi, B.H., Kwak, J.S., Kang, C.W., Lim, H.T., Cheong, H.S., Hahm, K.S. (2005). Kunitz-type serine protease inhibitor from potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Jopung). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 6491 - 6496.

Pelegrini, P.B, Noronha, E.F., Muniz, M.A., Vasconcelos, I.M., Chiarello, M.D., Oliveira, J.T., Franco, O.L. (2006). An Antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2s albumin proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1764, 1141 - 1146.

Pereira, K.R.B., Botelho-Júnior, S., Domingues, D.P., Machado, O.L.T., Oliveira, A.E.A., Fernandes, K.V.S., Madureira, H.C., Pereira, T.N.S., Jacinto, T. (2011). Passion fruit flowers: Kunitz trypsin inhibitors and cystatin differentially accumulate in developing buds and floral tissues. *Phytochemistry*. 72, 1955 - 1961.

Pereira, R.A., Valencia, A., Magalhäes, C.P., Prates, M.V., Melo, J.A., Lima, L.M., Sales, M.P., Nakasu, E.Y., Silva, M.C., Grossi-de-Sá, M.F. (2007). Effect of a Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Phaseolus coccineus* on Hypothenemus hampei gut proteinases in vitro. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 55, 10714 - 10719.

Pontual, E.V., Santos, N.D.L., Moura, M.C.M., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.M.F. (2014). Trypsin inhibitor from *Moringa oleifera* flowers interferes with survival and development of *Aedes aegypti* larvae and kills bacteria inhabitant of larvae midgut. *Parasitology Research.* 113, 727 - 733.

Prakash, B., Selvaraj, S., Murthy, M.R.N., Sreerama, Y.N., Rao, D.R., Gowda, L.R. (1996). Analysis of the aminoacid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors. *Journal of Molecular Evolution*. 42, 560 - 569.

Prasad, E.R., Dutta-Gupta, A., Padmasree, K. (2010). Purification and characterization of a Bowman-Birk proteinase inhibitor from the seeds of black gram (*Vigna mungo*). *Phytochemistry.* 71, 363 - 372.

Qi, R.F., Song, Z.W., Chi, C.W. (2005). Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* 37, 283 - 292.

Rahuman, A.A., Gopalakrishnan, G., Venkatesan, P., Geetha, K. (2008). Larvicidal activity of some Euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Parasitology Research*. 102, 867 - 873.

Raj, S.S., Kibushi, E., Kurasawa, T., Atsuo Suzuki, A., Yamane, T., Odani, S., Iwasaki, Y., Yamane, T., Ashida, T. (2002). Crystal structure of bovine trypsin and wheat germ trypsin inhibitor (I-2b) complex (2:1) at 2.3 a resolution. *Journal Biochemistry*. 132, 927 - 933.

Rawlings, N.D., Tolle, D.P., Barrett, A.J. (2004). MEROPS: The peptidase database. *Nucleic Acid Research.* 32 Database issue: D.160 - 164.

Ribeiro, S. F., Da Cunha, A. O., Rodrigues, M., Melo, V. M., Vasconcelos, I. M., Melo, E. J. T., Cruz, L. P., Gomes, V. M. (2007) Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: antimicrobial activities against phathogenic yeasts. *Toxicon.* 50, 600 - 611.

Richardson, M. (1991). Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: Dey PM, Harborne JB. (Eds.), Methods in Plant Biochemistry: Amino Acids, Proteins and Nucleic Acids. 5. *Academic Press.* 259 - 305.

Rufino, F.P.S., Pedroso, V.M.A., Araujo, J.N., França, A.F.J., Rabêlo, L.M.A., Migliolo, L., Kiyota, S., Santos, E.A., Franco, O.L., Oliveira, A.S. (2013). Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) seeds against

seeds against insect-pests digestive proteinases. *Plant Physiology Biochemistry.* 63, 70 - 76.

Ryan, C.A. (1990). Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annual Review of Phytopathology.* 28, 425 - 449.

Ryan, C.A., Pearce, G. (1998) Systemin: A Polypeptide Signal for Plant Defensive Genes. *Annual Review of Cell and Developmental Biology.* 14, 1 - 17.

Sá, R.A., Santos, N.D.L., Silva, C.S.B., Napoleão, T.H., Gomes, F.S., Cavada, B.S., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Bieber, L.W., Paiva, P.M.G. (2009). Larvicidal activity of lectins from *Myracrodruon urundeuva* on *Aedes aegypti. Comparative Biochemistry and Physiology*. 149, 300 - 306.

Santos, N.D.L., Moura, K.S., Napoleão, T.H., Santos, G.K.N., Coelho, L.C.B.B., Navarro, D.M.A.F., Paiva, P.M.G. (2012) Oviposition-stimulant and ovicidal activities of *Moringa oleifera* Lectin on *Aedes aegypti*. PLoS ONE 7: 44840.

Sasaki, D.Y. (2014). Avaliação de um inibidor de proteinase serínica sobre o desenvolvimento larval de *Aedes aegypti*: efeito da exposição crônica e aguda. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste.

Schägger. H., Von-Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*. 166, 368 - 379.

Shutov, A.D., Kakhovskaya, I.A., Braun, H., Bäumlein, H., Müntz, K. (1995). Legumin-like and vicilin-like seed storage proteins: evidence for a common single-domain ancestral gene. *Journal of Molecular Evolution*. 41,1057 - 1069.

Silva, L. K. F. (1995). Aspectos biológicos de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperiidae) em *Clitoria fairchildiana, Centrosema pubescens, Glycine max* e *Phaseolus vulgaris* (Leguminosae). Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais) – Curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Silva, R.G.G., Vasconcelos, I.M., Filho, A.J.U.B., Carvalho, A.F.U., Souza, T.M., Gondim, D., Varela, A.L.N., Oliveira, J.T.A. (2015). Castor bean cake contains a trypsin inhibitor that displays antifungal activity against *Colletotrichum gloeosporioides* and inhibits the midgut proteases of the dengue mosquito larva. *Industrial Crops and Products*. 70, 48 - 55.

Singh, R.R. & Appu, R.A.G. (2002). 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. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1597, 280 - 291.

Siqueira-Junior, C.L., Fernandes, K.V.S., Machado, O.L.T., Cunha, M., Gomes, V.M., Moura, D., Jacinto, T. (2002). 87 kDa tomato cystatin exhibits properties of a defence protein and forms crystals in prosystemin over-expressing transgenic plants. *Plant Physiology Biochemistry*. 40, 247 - 254.

Smith, H.J. & Simons, C. (2005). In: Enzymes and their inhibitors: drug development. *Boca Raton: CRC Press.*

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Maallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Oslon, B.J., Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 150, 76 - 85.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Maallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Oslon, B.J., Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*. 150, 76 - 85.

Soares, T.S., Watanabe, R.M.O., Lemos, F.J.A., Tanaka, A.S. (2011). Molecular characterization of genes encoding trypsin-like enzymes from *Aedes aegypti* larvae and identification of digestive enzymes. *Gene*. 489, 70 - 75.

Song, H.K., Kim, Y.S., Yang, J.K., Moon, J., Lee, J.Y., Suh, S.W. (1999). Crystal structure of a 16 kDa double-headed Bowman-Birk trypsin inhibitor from barley seeds at 1.9 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology*. 293, 1133 - 1144.

Storey, R.D. &. Wagner, F.W. (1986). Plant proteases: A need for uniformity. *Phytochemistry*. 25, 2701 - 2709.

Tanaka, A.S., Sampaio, M.U., Sampaio, C.A., Oliva, M.L. (1989). Purification and preliminary characterization of *Torresea cearensis* trypsin inhibitor. *Brazilian Journal Of Medical and Biological Research*. 22, 1069 - 1071.

Tashiro, M., Asao, T., Hitara, C., Takahashi, K., Kanamori, M. (1990). The complete aminoacid sequence of a major trypsin inhibitor from seeds of foxtail millet (*Setaria italica*). *Journal Biochemistry*. 108, 669 - 672.

Tashiro, M., Hashino, K., Shiozaki, M., Ibuki, F., Maki, Z. (1987). The complete aminoacid sequence of rice bran trypsin inhibitor, *Journal Biochemistry*. 102, 297 - 306.

Terra, W.R., Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 109, 1 - 62.

Thevissen, K., Terras, F.R.G., Broekaert, W.F. (1999). Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Applied Environmental Microbiology*. 65, 5451 - 5458.

Trevisan, H., Nadai, J.D., Lunz, A.M., Carvalho, A.G. (2004). Consumo foliar e aspectos biológicos de *Urbanus acawoios* (Lepidoptera: Hesperiidae) alimentado com folíolos de *Clitoria fairchildiana* (leguminosae: Faboideae) em três níveis de maturidade. *Ciencia Rural.* 34, 1 - 4.

Tur-Sinal, A., Birk, Y., Gertler, A., Rigbi, M. (1972). A basic trypsin and chymotrypsin inhibitor from groundnuts (*Arachis hypogaea*). *Biochimica et Biophysica Acta*. 263, 666 - 672.

Valueva, T.A. & Mosolov, V.V. (2004). Role of Inhibitors of Proteolytic Enzymes in Plant Defense against Phytopathogenic Microorganisms. *Biochemistry*. 69, 1305 - 1309.

Van Der Hoorn, R.A.L. (2008). Plant proteases from phenotypes to molecular mechanisms. *The Annual Review of Plant Biology*. 59, 191 - 223.

Van der Vyver, C., Schneidereit, J., Driscoll, S., Turner, J., Kunert, K., Foyer, C.H. (2003). Oryzacystatin I expression in transformed tobacco produces a conditional

growth phenotype and enhances chilling tolerance. *Journal Plant Biotechnology*. 1, 101 - 112.

Venancio, T.M., Cristofoletti, P.T., Ferreira, C., Verjovski-Almeida, S., Terra, W.R. (2009). The *Aedes aegypti* larval transcriptome: a comparative perspective with emphasis on trypsins and the domain structure of peritrophins. *Insect Molecular Biology.* 18, 33 - 44.

Wang, H.X. & Ng, T.B. (2006). Concurrent isolation of a Kunitz-type trypsin inhibitor with antifungal activity and a novel lectin from *Pseudostellaria heterophylla* roots. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 342, 349 - 353.

Wang, S., Lin, J., Ye, M., Ng, T.B., Rao, P., Ye, X. (2006). Isolation and characterization of a novel mung bean protease inhibitor with antipathogenic and anti-proliferative activities. *Peptides*. 27, 3129 - 3136.

Wei, R., Hai, L., Lin-Fang, D.U. (2007). Inhibitory effect of trypsin inhibitor from Cassia obtusifolia seeds against Pieris rapae larvae. *Sichuan Journal Zoology*. 03 - 054

Wohlke, J.L., Adelmann, J., Fontana, J.D. (2004). Larvicidal action of ethanolic extracts from fruit endocarps of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* against the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Toxicon.* 44, 829 - 835.

World Health Organization (1995). Guidelines For Dengue Surveillance and mosquito control. http://www.wpro.who.int/publications/pub_9290610689.htm.

World Health Organization (2008). Chikungunya. Fact sheet 327.

World Health Organization (2011). Yellow fever. Fact sheet 100.

World Health Organization (2012). Dengue and severe dengue. Fact sheet 117.

Yang, A.H. & Yeh, K.W. (2005). Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung). *Planta.* 221, 493 - 501.

Yang, X., Li, J., Wang, X., Fang, W., Bidochka, M.J., She, R., Xiao, Y., Pei, Y. (2006). Psc-AFP, an antifungal protein with trypsin inhibitor activity from *Psoralea corylifolia* seeds. *Peptides*. 27, 1726 - 1731.

Yang, Y.J. & Davies, D.M. (1971b). Trypsin and chymotrypsin during metamorphosis in *Aedes aegypti* and properties of the chymotrypsin. *Journal Insect Physiolology*. 17, 117 - 131.

Yang, Y.J. & Davies, D.M. (1971a). Digestive enzymes in the excreta of *Aedes aegypti* larvae. *Journal Insect Physiolology*. 17, 2119 - 2123.

Ye, X.Y. & Ng, T.B. (2001). Peptides from pinto bean and red bean with sequence homology to cowpea 10-kDa protein precursor exhibit antifungal, mitogenic, and HIV-1 reverse transcriptase-inhibitory activities. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 285, 424 - 429.

Zanuncio, J.C., Parreira, D.S., Mielke, O.H.H., Ramalho, F.D.S., Serrão, J.E., Zanuncio, T. V. (2013). *Hiperchiria incisa incisa* (Lepidoptera: Saturniidae) on plants of *Clitoria fairchildiana. Journal Lepidopterists Society.* 2, 131 - 133.

Zhou, J.Y., Liao, H., Zhang, N.H., Tang, L., Xu, Y., Chen, F. (2008). Identification of a Kunitz inhibitor from *Albizzia kalkora* and its inhibitory effect against pest midgut proteases. *Biotechnology Letters*. 30, 495 - 499.

9. ANEXO I





Author(s): Lucilene O. de Oliveira, Katia V.S. Femandes, Dayanni de Souza Padua, Andre de O. Carvalho, Francisco J.A. Lemos, Valdirene M. Gomes, Antonia E.A. Oliveira, Andre T. da Silva Ferreira and Jonas Perales

Affiliation: Laboratorio de Química e Funcao de Proteínas e Peptideos, CBB, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF), Avenida Alberto Lamego, 2000 - Parque California, CEP: 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brasil.

Graphical Abstract



Anexo I: Artigo publicado derivado da tese.