

INIBIDORES DE PROTEASES DE SEMENTES DE *Glycine max* E OS
EFEITOS NA INIBIÇÃO DE PROTEASES INTESTINAIS DE INSETOS
PRAGA DA AGRICULTURA

JANAINA DE CAMPOS MACEDO DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO – 2018

INIBIDORES DE PROTEASES DE SEMENTES DE *Glycine max* E OS
EFEITOS NA INIBIÇÃO DE PROTEASES INTESTINAIS DE INSETOS
PRAGA DA AGRICULTURA

JANAINA DE CAMPOS MACEDO DA SILVA

Dissertação apresentada ao Centro de
Biotecnologia e Biotecnologia da Universidade
Estadual do Norte Fluminense - Darcy
Ribeiro, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e
Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Antônia Elenir Amâncio Oliveira

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
MARÇO - 2018

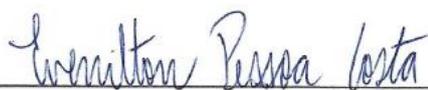
Inibidores de proteases de sementes de *Glycine max* e os efeitos na inibição de proteases intestinais de insetos praga da agricultura

Janaina de Campos Macedo da Silva

Comissão examinadora:



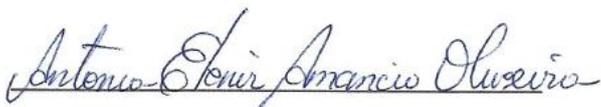
Dr^a Aline Teixeira Carolino (CCTA - UENF)



Dr^o Evenilton Pessoa Costa (CBB - UENF)



Dr^a Luciana Belarmindo da Silva (IFF - Campos)



Dr^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira (CBB-UENF)

Orientadora

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Biociências e Biotecnologia
da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

733 / 2018

Silva, Janaína de Campos Macedo da

Inibidores de proteases de sementes de *Glycine max* e os efeitos na
inibição de proteases intestinais de insetos praga da agricultura / Janaína
de Campos Macedo da Silva. -- Campos dos Goytacazes, 2018.
xii, 80, [1] f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Biociências e
Biotecnologia. Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Oliveira, Antônia Elenir Amâncio

Bibliografia: f. 62-79

1. *Glycine max* 2. Inibidores de proteases 3. *Tribolium castaneum*
4. *Tenebrio molitor* 5. *Callosobruchus maculatus* I. Universidade
Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro II. Título

571.6
S586in

Agradecimentos

À minha orientadora, Dr^a Antônia Elenir Amâncio Oliveira, pelos ensinamentos científicos e de cotidiano, sempre com muita alegria e descontração;

À minha mãe, Maria Marta, sempre disposta a melhorar nossa qualidade de vida, atenta aos mais simples e essenciais detalhes;

Ao meu irmão, Sthael Wagner, por sua singularidade;

Ao meu padrasto, José Joaquim, sempre atencioso e solícito;

Ao meu esposo, Bruno Amorim, por seu carinho, atenção e companheirismo em todos os momentos;

Ao meu pai, Wagner Fábio (*in memoriam*), por deixar conosco a sua alegria;

À minha avó, Luiza Macedo, por quebrar todas as barreiras físicas para estar sempre ao nosso lado;

À minha avó, Joseth Malvino (*in memoriam*), pelo seu carinho e atenção;

À minha família, por entender as ausências;

À flor, pela companhia;

Ao nosso grupo do LQFPP: Luciana, Eduardo, Leonardo, Kayan, Roberta, Sarah, Geovanna, Patrícia, Aline e Kethleen ;

A todos os colegas do LQFPP;

Aos amigos, Dayanni Pádua e Gustavo Lemos;

Ao colaborador, Dr^o Evenilton Pessoa Costa, por sua atenção e dedicação;

Aos professores da UENF, pessoas especiais durante a nossa trajetória;

Aos órgãos de fomento, CAPES, CNPq e FAPERJ e

A UENF, por nos inserir no mundo científico.

Índice

Resumo	X
Abstract	XI
1.0 – Introdução	1
1.1 – Soja (<i>Glycine max</i>).....	1
1.1.1 – Inibidores de proteases (PIs) de <i>Glycine max</i>	2
1.2 – Insetos	7
1.2.1 – <i>Tribolium castaneum</i>	7
1.2.2 – <i>Tenebrio molitor</i>	9
1.2.3 – <i>Callosobruchus maculatus</i>	12
1.3 – Sistema Digestivo de insetos.....	15
2.0 – Objetivos	22
2.1 – Objetivo geral.....	22
2.2 – Objetivos específicos	22
3.0 – Materiais e Métodos	23
3.1 – Obtenção das sementes e farinha	23
3.1.1 – <i>Vigna unguiculata</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Triticum spp.</i>	23
3.2 – Insetos	23
3.2.1 – <i>Callosobruchus maculatus</i>	23
3.2.2 – <i>Tribolium castaneum</i> e <i>Tenebrio molitor</i>	23
3.3 – Efeito da farinha de cotilédones de <i>G. max</i> sobre os parâmetros de desenvolvimento (sobrevivência larval, tamanho larval, formação de pupas e adultos) do inseto <i>T. castaneum</i>	24
3.4 – Efeito da dieta contendo farinha de cotilédones de <i>G. max</i> sob a atividade das proteases digestivas de <i>T. castaneum</i>	24
3.4.1 – Atividade de protease cisteínica	24
3.4.2 – Atividade de protease serínica.....	25
3.5 – Efeito inibitório, in vitro, do extrato proteico de farinha de <i>G. max</i> sob a atividade de proteases cisteínicas e serínicas do intestino larval de <i>T. castaneum</i>	25

3.5.1 – Atividade Antipapainásica.....	25
3.5.2 – Atividade Antitriptica	26
3.6 – Isolamento e caracterização de inibidores de proteases dos cotilédones de <i>G. max</i> através de cromatografia de afinidade	26
3.6.1 – Montagem da coluna de afinidade Sepharose 4B-papaína	26
3.6.2 – Isolamento dos inibidores de proteases de <i>G. max</i> por cromatografia de afinidade Sepharose 4B-papaína	27
3.6.3 – Visualização do perfil das proteínas retidas na coluna de afinidade Sepharose 4B-papaína.....	27
3.6.4 – Caracterização das proteínas isoladas através de espectrometria de massas	27
3.7 – Efeito, <i>in vitro</i> , dos inibidores de proteases sob a atividade de proteases digestivas de larvas de <i>Tribolium castaneum</i> , <i>Callosobruchus maculatus</i> e <i>Tenebrio molitor</i>	28
3.8 – Análise da inibição da atividade das enzimas papaína e tripsina pelo inibidores de proteases isolados na afinidade Sepharose 4B-papaína	29
3.9 – Construção <i>in silico</i> dos modelos tridimensionais proteicos e os ensaios de <i>docking</i> proteína-proteína.....	29
3.10 – Análises estatísticas	31
4.0 – Resultados.....	32
4.1 – Efeitos da farinha de cotilédone de <i>G. max</i> sobre a sobrevivência larval, tamanho larval, formação de pupas e adultos do inseto <i>T. castaneum</i>	32
4.2 – Efeito da farinha de cotilédones de <i>G. max</i> sobre a atividade das proteases digestivas de larvas de <i>T. castaneum</i>	35
4.3 – Efeito inibitório, <i>in vitro</i> , do extrato de farinha de <i>G. max</i> sobre as principais proteases intestinais de larvas de <i>T. castaneum</i>	37
4.4 – Isolamento e caracterização de inibidores de proteases de cotilédones de <i>G. max</i>	39
4.5 – Efeitos, <i>in vitro</i> , da fração retida na cromatografia Sepharose 4B-papaina sobre as atividades das principais proteases digestivas dos insetos praga <i>T. castaneum</i> , <i>T. molitor</i> e <i>C. maculatus</i>	42
4.6 – Análise da inibição da atividade de proteases sérnicas e cisteínicas pelo método de zimografia reversa	45
4.7 – Modelagem molecular <i>in silico</i> e <i>docking</i> dos inibidores de proteases sérnicas e cisteínicas de <i>G. max</i> com as proteases cisteínicas e sérnicas de <i>T. castaneum</i>	46

5.0 – Discussão.....	56
6.0 – Conclusão.....	61
7.0 – Referências.....	62

Lista de Figuras

Figura 1 - Composição nutricional de sementes de <i>Glycine max</i>	2
Figura 2 - Estrutura do inibidor de tripsina do tipo Kunitz de <i>Glycine max</i>	4
Figura 3 - Estrutura do inibidor de tripsina do tipo Bowman-Birk de <i>Glycine max</i>	5
Figura 4 - Estrutura do inibidor de protease cisteínica do tipo fitocistatina Oryzacistatin-I de <i>Oryza sativa</i> L.....	6
Figura 5 - Esquema representativo do ciclo de vida do inseto <i>T. castaneum</i> . Representação dos quatro estágios de desenvolvimento de <i>T. castaneum</i> (ovo, larva, pupa e adulto).....	9
Figura 6 - Insetos adultos de <i>Tenebrio molitor</i> e <i>Tribolium castaneum</i> . <i>Tenebrio molitor</i> (A) e <i>Tribolium castaneum</i> (B).....	10
Figura 7 - Larvas de <i>T. molitor</i> se alimentando de poliestireno	11
Figura 8 - Esquema do ciclo de vida do inseto <i>Callosobruchus maculatus</i> . Representação dos quatro estágios de desenvolvimento de <i>C. maculatus</i> (ovo, larva, pupa e adulto)	13
Figura 9 - Estágios de desenvolvimento e danos ocasionados aos grãos pelo inseto <i>Callosobruchus maculatus</i>	14
Figura 10 - Divisão geral do intestino de insetos	15
Figura 11 - Número total de proteases aspártica, cisteínica e serínica em diversas espécies de insetos.....	18
Figura 12 - Principais genes anotados de <i>Callosobruchus maculatus</i> avaliados através de BLAST do banco de dados não redundantes do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e sua distribuição entre as espécies	21
Figura 13 - Sobrevivência de larvas de <i>T. castaneum</i> alimentadas com farinhas de trigo (Tr) e de cotilédones de <i>G. max</i> (Gm). Sobrevivência larval 11 DAE (A) e 17 DAE (B).....	32
Figura 14 - Tamanho de larvas de <i>T. castaneum</i> alimentadas com farinhas de trigo (Tr) e de cotilédones de <i>G. max</i> (Gm).....	33
Figura 15 - Formação de pupas de <i>T. castaneum</i> . Formação de pupas a partir de larvas alimentadas com as farinhas de trigo (Tr) e de cotilédones de <i>G. max</i> (Gm) .	34
Figura 16 - Emergência de adultos de <i>T. castaneum</i> . Emergência de adultos a partir de larvas alimentadas com as farinhas de trigo (Tr) e de cotilédones de <i>G. max</i> (Gm)	35
Figura 17 - Atividade das proteases cisteínica e serínica do intestino de larvas de <i>T. castaneum</i> . Larvas de 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE foram alimentadas com as farinhas de trigo (Tr) e de cotilédones de <i>G. max</i> (Gm)	37

Figura 18 - Inibição da atividade das proteases cisteínica e serínica do intestino de larvas de <i>T. castaneum</i>	39
Figura 19 - Cromatograma e perfil proteico da fração retida da coluna de afinidade	41
Figura 20 - Sequência completa do inibidor do tipo Kunitz (gij 13375349) de <i>G. max</i> , proveniente da fração retida da coluna cromatográfica.....	42
Figura 21 - Inibição das proteases cisteínicas e serínicas e das enzimas puras papaína e tripsina pela fração retida contendo o inibidor do tipo Kunitz de <i>G. max</i> (+GmKTI)	44
Figura 22 - Zimografia reversa. Inibição da atividade das enzimas tripsina e papaína pelos inibidores presentes na fração retida da coluna cromatográfica.....	46
Figura 23 - Diagrama mostrando o número de resíduos, o tipo de ligações e a área de superfície de cada proteína. Dados gerados pelas análises do modelo construído da protease cisteínica (NP_001164001.1) de <i>T. castaneum</i> e o inibidor de cisteino protease de <i>G. max</i> (KRH58814.1)	48
Figura 24 - Resíduos de aminoácidos que interagem entre a protease cisteínica de <i>T. castaneum</i> e o inibidor de cisteino protease de <i>G. max</i> do modelo gerado. Resíduos de aminoácidos que interagem ente protease e inibidor	49
Figura 25 - Modelo de interação, <i>in silico</i> , entre a protease cisteínica de <i>Tribolium castaneum</i> (NP_001164001.1) (cathepsin L-like) e o inibidor de protease cisteínica (KRH58814.1) (cistatina) de <i>Glycine max</i> (A e B)	51
Figura 26 - Diagrama mostrando o número de resíduos, o tipo de ligações e a área de superfície de cada proteína. Dados gerados pelas análises do modelo construído da protease serínica (EFA01278) de <i>T. castaneum</i> e o inibidor de serino protease de <i>G. max</i> (NP_001238611.2).....	52
Figura 27- Resíduos de aminoácidos que interagem entre a protease cisteínica de <i>T. castaneum</i> e o inibidor de cisteino protease de <i>G. max</i> do modelo gerado. Resíduos de aminoácidos que interagem ente protease e inibidor	53
Figura 28 - Modelos de interação, <i>in silico</i> entre a protease serínica (serino protease P41) de <i>Tribolium castaneum</i> e o inibidor de serino protease (Kunitz) de <i>Glycine max</i> (A e B)	55

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Soja (<i>Glycine max</i>): Fornecimento e Distribuição dos principais produtores mundiais.....	1
Tabela 2 - Principais famílias de inibidores de proteases de plantas (PIs).....	4
Tabela 3 - Características de ciclo de vida e desenvolvimento dos insetos <i>T. molitor</i> e <i>T. castaneum</i>	10
Tabela 4 - Classes de ptoteases.....	16
Tabela 5 - Genes mais expressos de proteases digestivas de <i>Tribolium castaneum</i> e seus ortólogos em <i>Drosophila melanogaster</i>	19
Tabela 6 - Identificação por espectrometria de massas das bandas 1, 2 e 3	42
Tabela 7 - Proteínas utilizadas para a modelagem e docking e seus acessos nos bancos de dados Phytozome e Beetlebase.....	47
Tabela 8 - Código de acesso dos complexos protease-inibidor utilizados como controle positivo para a modelagem e docking.....	48
Tabela 9 - Dados comparativos entre o modelo gerado da protease cisteínica de <i>T. castaneum</i> e o inibidor de cisteino protease de <i>G. max</i> com o modelo de controle positivo depositado no PDB	50
Tabela 10 - Dados comparativos entre o modelo gerado da protease serínica de <i>T. castaneum</i> e o inibidor de serino protease de <i>G. max</i> com o modelo de controle positivo depositado no PDB.....	54

Abreviaturas

DAO – Dias após a oviposição

Gm – *Glycine max*

MP – Matriz peritrófica

PIs – Inibidores de proteases

STI – Inibidor de tripsina

SKTI – Inibidor do tipo Kunitz

Tr – *Triticum spp.*

ΔG – Energia livre de Gibbs

K_d – Constante de dissociação

Resumo

O uso indiscriminado de inseticidas químicos tem causado problemas ambientais, de saúde e desenvolvido resistência em insetos. Os compostos naturais de sementes que atuam como inibidores de enzimas digestivas estão sendo estudados como uma alternativa ao controle químico. *Tribolium castaneum*, *Tenebrio molitor* e *Callosobruchus maculatus* são insetos praga que atacam alimentos armazenados e o seu controle é fundamental para a agroeconomia. Neste trabalho buscamos isolar inibidores de proteases das sementes de *Glycine max* e avaliar seus efeitos sob as enzimas digestivas dos insetos *T. castaneum*, *T. molitor* e *C. maculatus*. As larvas de *T. castaneum* alimentadas com farinha de *G. max* tiveram os parâmetros de sobrevivência e tamanho larval, formação de pupas e emergência de adultos afetados negativamente, assim como, a atividade das proteases digestivas serínicas e cisteínicas reduzidas. Desta forma, buscamos isolar possíveis inibidores presentes na farinha de *G. max* através da cromatografia de afinidade. A identificação das proteínas contidas na fração cromatográfica foi obtida por espectrometria de massas que revelou homologia com o inibidor do tipo Kuniz (gi | 13375349 |) de *G. max*. A fração cromatográfica foi capaz de reduzir a atividade das proteases digestivas da classe cisteínica de *T. molitor* e *C. maculatus* e também a atividade das proteases digestivas serínicas e cisteínicas de *T. castaneum*. Pelo método de zimografia reversa foi verificada a capacidade da fração cromatográfica em inibir a atividade das enzimas puras papaína e tripsina, sugerindo a presença de dois inibidores distintos. Concatenando as análises *in vivo* e *in vitro*, as análises *in silico* de docking proteína-proteína, mostraram alta especificidade (ΔG) entre os inibidores de *G. max* e as proteases digestivas do inseto *T. castaneum* quando comparada aos controles positivos depositados no Protein Data Bank (PDB) utilizados nas análises. Desta forma, os estudos *in vivo*, *in vitro* e *in silico* foram capazes de mostrar que os inibidores presentes nas sementes de *G. max* podem atuar como um potencial alvo biotecnológico para o desenvolvimento de novos métodos de controle natural em detrimento ao químico.

Palavras-chave: *Glycine max*; inibidores de proteases; *Tribolium castaneum*; *Tenebrio molitor*; *Callosobruchus maculatus*

Abstract

Indiscriminate use of chemical insecticides has caused environmental, health problems and develops resistance insects. Natural compounds of seed that act as digestive enzyme inhibitors have been studied as an alternative to chemical control. *Tribolium castaneum*, *Tenebrio molitor* and *Callosobruchus maculatus* are insect pests that attacks stored foods and their control is fundamental to agro-economics. In this work we sought to isolate protease inhibitors from *Glycine max* seeds and to evaluate their effects under the digestive enzymes of insects *T. castaneum*, *T. molitor* and *C. maculatus*. *T. castaneum* larvae fed with *G. max* flour had survival and larval size, pupae formation and adults emergence parameters negatively affected, as well as the reduced serine and cysteine digestive proteases activity. In this way, we sought for inhibitors possible to isolate presents in *G. max* flour by affinity chromatography. Identification of proteins in the chromatographic fraction was obtained by mass spectrometry that revealed homology with the Kuniz type inhibitor (gi | 13375349 |) of *G. max*. The chromatographic fraction was able to reduce the digestive proteases activity of the cysteine class of *T. molitor* and *C. maculatus* and also the digestive serine and cysteine proteases activity of *T. castaneum*. The chromatographic fraction ability to inhibit the activity of the pure papain and trypsin enzymes was verified by the reverse zymography method, suggesting the presence of two different inhibitors. Concatenating, *in vivo* and *in vitro* analyzes, the *in silico* protein-protein docking analyzes showed high specificity (ΔG) between the inhibitors of *G. max* and the digestive proteases of the insect *T. castaneum* when compared to the positive controls deposited in Protein Data Bank (PDB) used in the analyzes. In this way, *in vivo*, *in vitro* and *in silico* studies are able to show that the inhibitors presents in *G. max* seeds can act as a potential biotechnological target for the development of new natural control methods in detriment to the chemical.

Keywords: *Glycine max*; proteases inhibitors; *Tribolium castaneum*; *Tenebrio molitor*; *Callosobruchus maculatus*

1.0 - Introdução

1.1 – Soja (*Glycine max*)

A soja, *Glycine max*, é uma das culturas de maior importância e seu cultivo é principalmente direcionado a produção de sementes para a formulação de alimentos (consumo humano e animal), para os setores industriais e para a fabricação de biocombustíveis (CONAB, 2017). Estudos sobre a origem de *Glycine max* ainda é assunto de debates, porém indícios sugerem que *Glycine max* seja nativa da região Central e Norte da China (Hymowitz, 1970; Harrigan *et al.*, 2013). A China foi um dos maiores produtores e exportadores mundiais de *G. max* na primeira metade do século 20. Na década de 1950, a produção de *G. max* teve um aumento significativo nos Estados Unidos que na atualidade é o maior produtor mundial de soja. Já na década de 1970, o cultivo de *G. max* se desenvolveu no Brasil, e atualmente, somos o segundo maior produtor de soja no mundo (Qiu & Chang, 2010; Harrigan *et al.*, 2013; CONAB, 2017). Dados de produção de *G. max* (Tab. 1) mostram os principais produtores: Estados Unidos; Brasil; Argentina; China; Índia, Paraguai; Canada e outros países (USDA, 2018).

Tabela 1 – Soja (*Glycine max*): Fornecimento e Distribuição dos principais produtores mundiais. Adaptado de USDA (2018).

Mil toneladas métricas						
Produtores	2013/14	2014/15	2015/16	2016/17	Janeiro 2017/18	Fevereiro 2017/18
Estados Unidos	91,389	106,878	106,857	116,920	119,518	119,518
Brasil	86,700	97,200	96,500	114,100	110,00	112,000
Argentina	53,400	61,400	56,800	57,800	56,000	54,000
China	11,951	12,154	11,785	12,900	14,200	14,200
Índia	9,477	8,711	6,929	11,500	10,000	9,500
Paraguai	8,190	8,154	9,217	10,665	9,400	9,200
Canadá	5,359	6,049	6,459	6,552	8,000	8,000
Outros	16,283	19,471	19,220	20,886	21,451	20,501

A importância econômica de *G. max* está diretamente relacionada aos altos teores de óleos (20%) e proteínas (40%) contidas em suas sementes (Fig. 1) (Qiu & Chang, 2010).



Figura 1 – Composição nutricional de sementes de *Glycine max*. Fonte: content.ces.ncsu.edu/north-carolina-soybean-production-guide. Acessado em: 16/01/2018.

Não menos importante, sementes de *G. max*, possuem alto teor de metabólitos secundários e inibidores de proteases (PIs) com aplicabilidade na área farmacêutica (fitoterápicos) e na agricultura (método natural de controle de pragas - bioinseticidas) (Messina, 1999; Délano-Frier et al. 2008; Kim *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2013).

1.1.1 – Inibidores de proteases (PIs) de *Glycine max*

Dentre os diversos tecidos e órgãos das plantas, as sementes se destacam por suas riquezas de nutrientes, dentre eles macromoléculas como proteínas, carboidratos e lipídios. Dentre essas macromoléculas podemos evidenciar a presença de inibidores de proteases (PIs) que possuem função de proteínas de reserva, reguladores endógenos e principalmente de defesa contra microrganismos e insetos, este sendo amplamente estudado como alternativa ao controle químico (inseticidas) com aplicabilidade biotecnológica (Cândido *et al.*, 2011).

Os inibidores de proteases de plantas (PIs) são classificados de acordo com a classe de enzimas inibidas, homologia estrutural/sequencial, número e localização de pontes dissulfeto e sítio reativo em: inibidores de proteases serínicas, cisteínicas, aspárticas e inibidores de metaloproteases (Tab. 2) (Migliolo 2008).

Os inibidores de serino proteases mais bem caracterizados em soja são os inibidores do tipo Kunitz (KTI) e Bowman-Birk (BBTI) (Kuar *et al.*, 2012; Macedo *et*

al., 2015). O inibidor do tipo Kunitz foi caracterizado e cristalizado em 1947 (Kunitz, 1947a,b) e o inibidor do tipo Bowman-Birk foi caracterizado em 1946 (Kunitz *et al.*, 1936; Birk *et al.*, 1963; Birk, 1985). Sementes de *G. max* possuem maior concentração de inibidores do tipo Kunitz (KTI) em relação aos inibidores do tipo Bowman-Kirk (BBTI) (Maranna *et al.*, 2016).

Os KTI de *G. max* possuem massa molecular em torno de 18-20 kDa, 181 resíduos de aminoácidos, duas pontes dissulfeto, uma ou duas cadeias polipeptídicas e apenas um sítio ativo (Fig. 2). Os inibidores da família do tipo Kunitz geralmente, são mais ativos contra proteases serínicas como tripsina, quimotripsina, elastase e subtilisina. Porém, eles também podem inibir outras classes de proteases como aspártica (catepsina D) cisteínica (catepsina L) e amilases de insetos e plantas (Heibges *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2005). Estudo de cristalografia da família do tipo Kunitz revela uma estrutura terciária globular, composta por 12 folhas β -pregueadas antiparalelas interligadas por "loops". A família de inibidores do tipo Kunitz reagem com suas enzimas cognatas de forma semelhante à ligação enzima-substrato e essa ligação ocorre principalmente através da alça exposta, chamada de canônica que está presente em todos os membros da família (Grutter *et al.*, 1998; Bode & Hube, 1992; Krauchenco *et al.*, 2003)

Os BBTIs possuem peso molecular em torno de 8-10 kDa, possuem alta concentração de pontes dissulfetos (em geral 7, sendo 14 resíduos de cisteína) e apresentam dois domínios ativos com capacidade de inibir simultaneamente ou de forma independente tripsina e/ou quimotripsina (Fig. 3) (Carlini & Grossi de Sá, 2002; Srinivasan *et al.*, 2005; Bhattacharyya, Leighton, Babu, 2007).

Tabela 2 – Principais famílias de inibidores de proteases de plantas (PIs). Obtido de Miglioto, L. (2008).

Proteases	Classe	Família de Inibidores
Serínicas	Inibidores de proteases serínicas	Bowman-Birk
		Kunitz
		Batata I
		BatataII
		Superfamília de cereais
	Taumatina	
Cisteínicas	Inibidores de proteases cisteínicas	Fitocistatinas
Aspárticas	Inibidores de proteases aspárticas	Inibidores de proteases aspárticas
Metaloproteases	Inibidores de metaloproteases	Inibidores de carboxipeptidases A e B

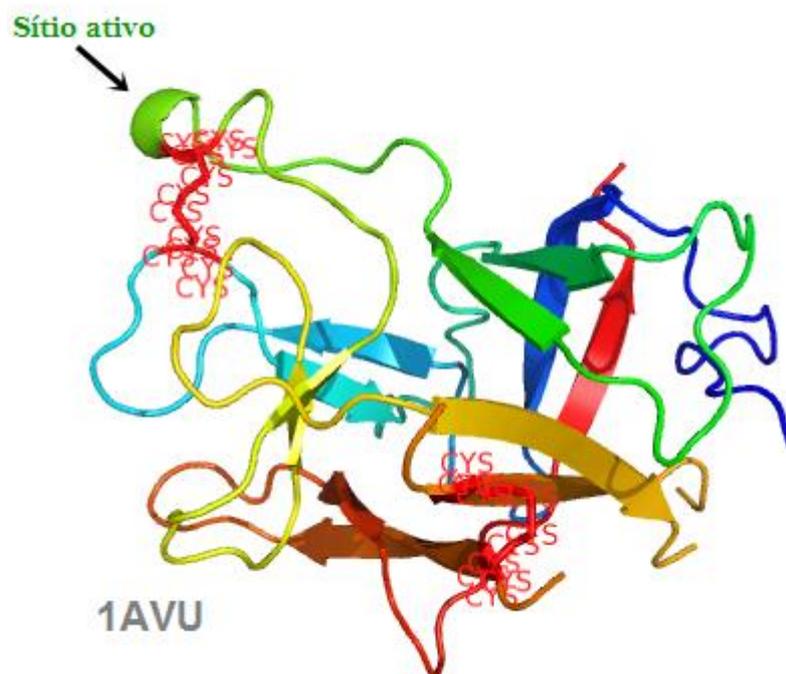


Figura 2 – Estrutura do inibidor de tripsina do tipo Kunitz de *Glycine max*. Código de acesso no Protein Data Bank (PDB: 1AVU). Seta: Sítio de ligação com a tripsina. As duas pontes dissulfeto em destacado pelos resíduos de cisteína.

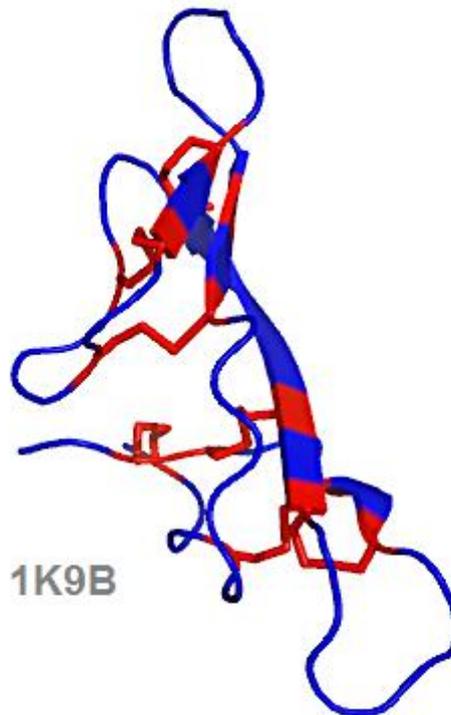


Figura 3 – Estrutura do inibidor de tripsina do tipo Bowman-Birk de *Glycine max*. Código de acesso no Protein Data Bank (PDB: 1K9B). As sete pontes dissulfeto em destaque na cor vermelha.

Dentre os inibidores de proteases cisteínicas destaca-se a família das cistatinas. As cistatinas possuem efeito inibitório sobre as proteases cisteínicas endógenas e exógenas sendo uma das proteínas de defesa de plantas que possui ação direta sobre as proteases cisteínas contidas no intestino médio das larvas de insetos (catepsinas do tipo L) amplamente expressas nos intestinos de *Tribolium castaneum* e *Tenebrio molitor*. As cistatinas, assim como os inibidores de proteases serínicas e cisteínicas, são classificados de acordo com sua massa molecular, número de pontes dissulfeto, sítio reativo, homologia estrutural e sequencial. Em humanos a família das cistatinas é subdividida em cistatinas I, II e kininogênios (Ryan *et al.*, 1990; Richards *et al.*, 2008). Já em plantas as cistatinas são pertencentes à família das fitocistatinas. Através de estudo de cristalografia foi identificado que as cistatinas possuem uma α -hélice central envolvida por cinco folhas β antiparalelas. Na extremidade das folhas β é formado um grampo apresentando uma sequência altamente conservada em todas as cistatinas. As fitocistatinas são polipeptídios com cadeias desprovidas de pontes dissulfeto (Bode & Hube, 1992). As fitocistatinas contemplam um amplo espectro de massa molecular

(10 a 87 kDa) . As fitocistatinas de *G. max* possuem aproximadamente 26 kDa, enquanto as de arroz têm aproximadamente 12 kDa (Abe *et al.*, 1987; Misaka *et al.*, 1996). Uma das fitocistatinas mais bem caracterizadas é a cistatina do arroz, denominada oryzacistatinas (Fig. 4) (Koia *et al.*, 1998).

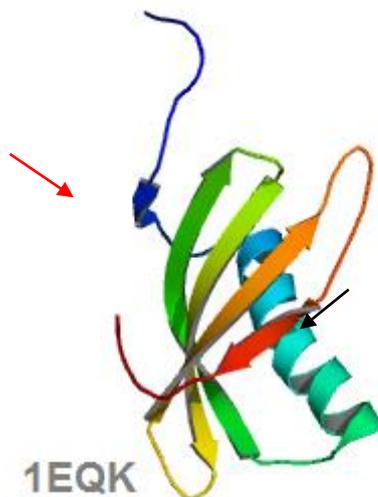


Figura 4 – Estrutura do inibidor de protease cisteínica do tipo fitocistatina Oryzacistatin-I de *Oryza sativa* L. Código de acesso no Protein Data Bank (PDB: 1EQK). Seta vermelha: estruturas em folhas β ; seta preta: estrutura em α -hélice e ausência de pontos dissulfeto, são característica de inibidores da família das cistatinas.

Swathi *et al.* (2016) mostraram que o inibidor do tipo Kunitz, CpPi 63, purificado de *Cajanus platycarpus* L. (Fabaceae) foi capaz de inibir proteases serínicas do intestino de larvas de *Helicoverpa armigera* (Lepidóptera).

Li-Byarlay *et al.* (2016) mostraram que larvas de *Drosophila melanogaster* e *Callosobruchus maculatus* quando alimentadas com PIs (BBTI e lectinas) apresentaram disfunção estrutural do intestino de forma similar à redução e/ou ausência total de alimento, devido ao deplecionamento nutricional ocasionado pelas PIs.

A busca e a utilização de inibidores de plantas contra insetos praga da agricultura é pertinente, pois as proteases intestinais dos insetos são indispensáveis aos processos de digestão e absorção de nutrientes (Franco *et al.*, 2003; Vinokurov *et al.*, 2009; Chapman, 2013). Quando o alimento contendo o inibidor chega ao intestino médio dos insetos ocorre a formação do complexo inibidor-protease que desativa a ação catalítica das proteases para o processo digestivo. Assim, o resultado da inativação de proteases digestivas, afeta diretamente a eficiência da

conversão nutricional, reduzindo a massa corporal dos insetos, aumentando o tempo de desenvolvimento e podendo levar a morte por déficit nutricional (Macedo *et al.*, 2015). Portanto, o conhecimento dos mecanismos de ação dos PIs e das proteases digestivas de insetos pragas, assim como, o entendimento da especificidade de inibição entre inibidor e protease, através de predições, *in silico*, podem auxiliar na indicação de proteínas inibidoras para o desenvolvimento de plantas transgênicas que expressem PIs direcionados aos seus principais predadores e em consequência reduz a utilização de inseticidas (Sharma, 2005).

1.2 – Insetos

1.2.1 – *Tribolium castaneum*

Inseto pertencente ao filo Artrópoda, classe Insecta, ordem Coleóptera, família Tenebrionidae, também conhecido como besouro castanho, é uma das espécies de insetos praga mais incidentes entre cereais e produtos estocados, possuindo preferência por alimentos farináceos como farinhas de trigo, soja, milho, feijão e arroz, sendo incapaz de atacar grãos íntegros ou não danificados (praga secundária) (Walter, 1990; Weston & Rattlingourd, 2000; Lorini, 2002; Altincicek *et al.*, 2008). *Tribolium castaneum* é um inseto cosmopolita, preferencialmente, encontrado em regiões tropicais e subtropicais (Bell, 2000), podendo também ser encontrado em regiões mais frias onde há ambientes com temperatura controlada (Tripathi *et al.*, 2001).

Tribolium castaneum é um inseto holometábolo (ovo, larva, pupa e adulto), possui curto ciclo de desenvolvimento, 26-30 dias (ovo-adulto), e alta taxa de fecundidade quando em condições ótimas de temperatura, umidade relativa do ar e fonte alimentar (Fig. 5) (Dhaliwal *et al.*, 2006).

Fabres *et al.* (2014), mostraram que a composição nutricional de diferentes dietas baseadas em farinhas de cotilédones de feijão (*Phaseolus vulgaris*), soja (*Glycine max*) e trigos (*Triticum spp.*) interferem nos níveis de triacilgliceróis, carboidratos e de enzimas digestivas de larvas de *T. castaneum*, retardando o crescimento larval, a formação de pupas e a emergência e sobrevivência de adultos.

Scharf *et al.* (2015), mostraram que a exposição de *T. castaneum* a dietas contendo extrato de levedura nas concentrações de 1 e 10% e a exposição desses

insetos a temperaturas de 26 e 34 °C são capazes de interferir no sucesso reprodutivo dos adultos, na incorporação de massa larval e nesses mesmos parâmetros para os descendentes, mostrando que as condições parentais são capazes de afetar as gerações.

Apesar do seu curto ciclo de desenvolvimento, os insetos adultos de *T. castaneum* podem sobreviver até 3 anos (Walter, 1990; Dhaliwal *et al.*, 2006) e todos os estágios (ovo, larva, pupa e adulto) são encontrados imersos no alimento, sendo a fase alimentar, os estágios de larva e adulto (Karunakaran *et al.*, 2004). A presença de todos os estágios na mesma fonte alimentar provoca a contaminação dos produtos com fezes, partes de insetos e secreções que alteram a coloração e o odor dos produtos reduzindo a qualidade e consumo dos mesmos (Bagheri-Zenouz, 1995; Pedrini *et al.*, 2015). Em alguns casos, as secreções contidas nos alimentos contaminados por *T. castaneum* são capazes de desenvolver respostas alérgicas, mas não são capazes de disseminar doenças (Alanko *et al.*, 2000).

Características como curto ciclo de desenvolvimento, alta taxa de fecundidade, adaptação a diferentes dietas e temperaturas facilitaram a utilização de *T. castaneum* em condições laboratoriais, tornando-o modelo para estudos em insetos praga, principalmente, a partir de 2008, quando *T. castaneum* foi o primeiro coleóptero com genoma sequenciado (Richards *et al.*, 2008), o que facilitou a utilização de ferramentas genéticas como mutações sítio dirigidas (Lorenzen *et al.*, 2007), DNAs satélites (Feliciello *et al.*, 2015), RNA de interferência, RNAi (Miller *et al.*, 2012; Perkin *et al.*, 2017) e mais recentemente, a CRISPR/Cas9 (Evans, 2017; Sun *et al.*, 2017) tornando-o modelo para estudos genéticos e ampliando a compreensão da funcionalidade de genes envolvidos tanto no desenvolvimento, evolução (Lee *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2017), quanto na expressão de proteínas intestinais, esta de crucial importância para a compreensão da relação inseto/ambiente (Morris *et al.*, 2009).

Atualmente, o principal método de controle do inseto *T. castaneum* é o controle químico, ocorrendo através da utilização de inseticidas e de fumigantes como DDT e fosfina, respectivamente (Liang *et al.*, 2017; Oppert *et al.*, 2015). No entanto, a utilização indiscriminada destes compostos tem ocasionado problemas ambientais afetando espécies não alvo e desenvolvido resistência em várias espécies de insetos como *T. castaneum*, *Rhyzopertha dominica* e *Cryptolestes*

ferrugineus (Nattudurai *et al.*, 2012; Opit *et al.*, 2012, Schlipalius *et al.*, 2012; Nayak *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015; Danga *et al.*, 2015). Desta forma, novas estratégias de controle devem ser elaboradas para minimizar os danos gerados pelo controle químico como a utilização de bioinseticidas que utilizem em suas formulações compostos provenientes de plantas, como os inibidores de proteases (PIs) (Carlini & Grossi de Sa, 2002).

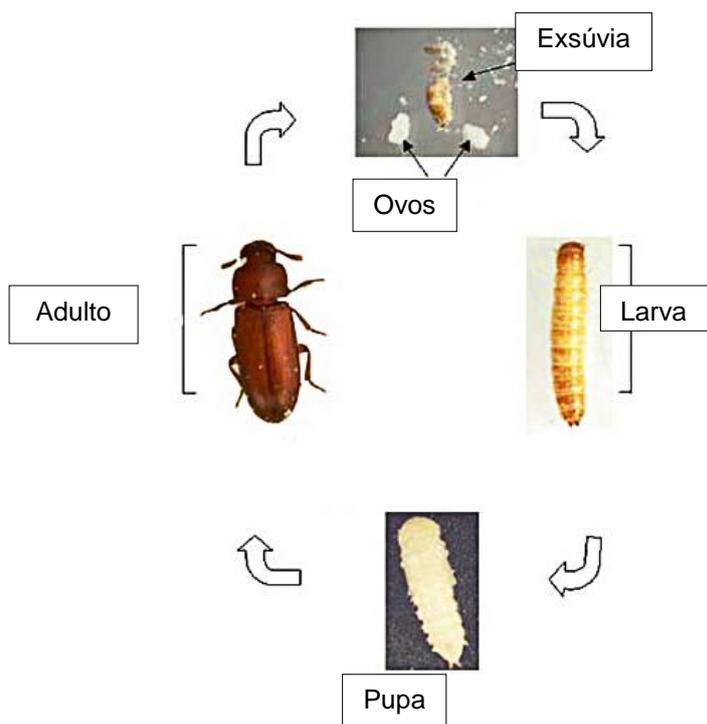


Figura 5 - Esquema representativo do ciclo de vida do inseto *T. castaneum*. Representação dos quatro estágios de desenvolvimento de *T. castaneum* (ovo, larva, pupa e adulto). Disponível em: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/urban/beetles/red_flour_beetle.htm Acessado em: 16/01/2018.

1.2.2 – *Tenebrio molitor*

Inseto pertencente à família Tenebrionidae que assim como *T. castaneum*, possui distribuição cosmopolita e é considerado uma praga de produtos estocados alimentando-se de farinhas e farelos, sendo incapaz de se alimentar de grãos íntegros (praga secundária) (Cotton, 1956; Ramos-Elorduy *et al.*, 2002). *Tenebrio molitor* também possui importância como aditivo alimentar para diversos animais como pássaros, peixes, répteis e até mesmo humanos devido ao seu alto valor proteico (Ress, 2004; Gomez *et al.*, 2013; Simmons *et al.*, 2013).

O ciclo de vida de *T. molitor*, assim como *T. castaneum*, possui desenvolvimento holometábolo (ovo, larva, pupa e adulto), mas diferencia-se deste em alguns parâmetros como: tamanho; ciclo de vida mais longo (16-88 semanas) e sobrevivência dos adultos (2-3 meses) (Tab. 3 e Fig. 6) (Howe, 1956; Ludwig & Fiore, 1960; Martynov *et al.*, 2015).

T. molitor é amplamente utilizado como modelo nas áreas de bioquímica, evolução, imunologia e fisiologia, porém pouco se sabe sobre a genética deste inseto (Park 2011; Dobson *et al.*, 2012; Liu & Wang, 2014; Jacobs *et al.*, 2017).

Tabela 3 - Características de ciclo de vida e desenvolvimento dos insetos *T. molitor* e *T. castaneum*. Adaptado de Martynov *et al.*, 2015.

Característica	<i>T. molitor</i>	<i>T. castaneum</i>
Tamanho	Larva em média 30 mm	Larva em média 6 mm
Período Larval	120-629 dias (21 instars ou mais)	22-100 dias (5-11 instars ou mais)
Ciclo de vida	16-88 semanas (adultos vivem de 2-3 meses)	4-12 semanas (adultos vivem de 1-3 anos)



Figura 6 - Insetos adultos de *Tenebrio molitor* e *Tribolium castaneum*. *Tenebrio molitor* (A) e *Tribolium castaneum* (B). Disponíveis em: <http://www.thewcg.org.uk/tenebrionidae/0228G.htm> (A); <https://www.uniprot.org/taxonomy/188756> (B). Acessado em: 23/03/2018.

Yang *et al.* (2015), mostraram que larvas de *T. molitor* são capazes de degradar poliestireno (Fig. 7), sem influenciar na sobrevivência larval (período avaliado, 30 dias), gerando biomassa através da biodegradação devido a presença da bactéria intestinal *Exiguobacterium* sp., linhagem YT2, que foi depositada no General Microbiological Culture Collection Center, na China (CGMCCC 10521),

possibilitando que ferramentas biotecnológicas sejam desenvolvidas no intuito de minimizar a contaminação ambiental.

McGonigle *et al.* (2016), utilizaram larvas de *T. molitor* como modelo de sistema imune inato para demonstrar que a bactéria *Staphylococcus aureus* JLA 513, é capaz de se manter viável, extracelularmente e intracelularmente, até 21 dias após a infecção, ampliando a janela de estudos de persistência da bactéria que era um pouco acima de 24 h. Assim, somando conhecimentos sobre infecções crônicas por *S. aureus* e possibilitando o desenvolvimento de novas estratégias de controle tanto para *S. aureus* como para outros modelos de patógenos letais.

T. molitor não possui genoma sequenciado (Oppert *et al.*, 2012), mas possui o sequenciamento completo do genoma mitocondrial (mitogenoma), que contribui significativamente, nas áreas de arquitetura de genes, genética de populações, desenho de primers e evolução molecular (Liu & Wang, 2014). *T. molitor* também possui vários transcriptomas envolvendo sua fisiologia digestiva (Gazara *et al.*, 2017; Oppert *et al.*, 2017) e também seu sistema imune inato (Zhu *et al.* 2013; Johnston, Makarova, Rolff, 2014).



Figura 7 - Larvas de *T. molitor* se alimentando de poliestireno. Obtido de Yang *et al.* (2015).

O controle de *T. molitor*, assim como de *T. castaneum*, é realizado predominantemente, através de inseticidas e fumigantes químicos como metil brometo e fosfina (Arthur, 1996). Porém, a crescente utilização destes compostos para o controle de pragas, principalmente, de insetos praga, tem gerado problemas ambientais e desenvolvido resistências em várias espécies de insetos (Shaaya *et al.*, 1997; Isman, 2006; Wang *et al.*, 2010). Assim, novos estudos estão sendo

conduzidos para o desenvolvimento de bioinseticidas utilizando compostos secundários de plantas (alcaloides, terpenos, compostos fenólicos) e inibidores de proteases (PIs), direcionados as principais vias metabólicas e proteases intestinais destes insetos (Ryan, 1990; Lu *et al.*, 1998; Cosimi *et al.*, 2009).

Wang *et al.* (2015), mostraram que óleos essenciais extraídos das folhas de *Citrus limonum* (Rutales: Rutaceae), *Cymbopogon citratus* (Ranales: Lauraceae), *Litsea cubeba* (Ranales: Lauraceae) e *Muristica fragrans* (Magnoliales: Myristicaceae) foram capazes de matar larvas de *T. molitor* (10^o instar) em 24 e 48 h, em testes de contato, também apresentaram ação repelente sobre as larvas e ação fumigante sobre as larvas e adultos de *T. molitor*. *L. cubeba* e *C. limonum* foram capazes de prolongar o desenvolvimento larval, em relação ao controle (52,9; 52,3 e 39,9 dias, respectivamente). *L. cubeba* e *C. limonum* reduziram o tamanho e o tempo de desenvolvimento das pupas formadas, em relação ao controle (6,2; 6,3 e 7,4 dias, respectivamente). *L. cubeba* (6,3 dias) foi capaz de prolongar o estágio de ovo, em relação ao controle (5,2 dias). Os adultos não apresentaram diferenças significativas em relação ao tempo de desenvolvimento quando comparados ao controle. As gerações tiveram seu desenvolvimento prolongado em relação ao controle (95,7 dias), *L. cubeba* (105,3 dias) e *C. limonum* (106,3 dias), mostrando mais uma vez que as condições parentais são capazes de afetar as gerações.

1.2.3 – *Callosobruchus maculatus*

Inseto pertencente ao filo Artrópoda, classe Insecta, ordem Coleóptera, família Crisomelidae, subfamília Bruchinae. *Callosobruchus maculatus* possui distribuição cosmopolita, é considerado um inseto praga de grãos estocados, alimentando-se diretamente dos grãos (praga primária) (Ress, 2004). O ataque dos grãos por *C. maculatus* afeta drasticamente o peso seco, a germinação, reduz o valor nutricional e o valor de mercado tornando-os impróprios para o consumo humano e a agricultura (plantio) (Oke & Akintude, 2013). A infestação por *C. maculatus* é capaz de ocasionar perda total dos grãos armazenados em torno de 3 a 6 meses (Gbay & Holloway, 2011; Tripathy, 2016). *C. maculatus* ataca várias leguminosas como feijões do gênero *Vigna* (*Vigna radiata*, *Vigna mungo*, *Vigna unguiculata*), soja (*Glycine max*), fabáceas como ervilha (*Cajanus cajan*), grão-de-

bico (*Cicer arietinum*) e outros grãos de importância agroeconômica (Ahmed *et al.*, 1989; Dongre *et al.*, 1993; Shaheen & Khaliq, 2005; Tuda *et al.*, 2005).

C. maculatus possui desenvolvimento holometábolo (Fig. 8) e a infestação inicia-se com a postura dos ovos pelas fêmeas sobre o tegumento dos grãos e, aproximadamente 6 dias após a oviposição (DAO), ocorre a eclosão dos ovos e a larva penetra no interior dos grãos deixando uma região mais fragilizada no tegumento (Fig. 9) por onde os adultos irão emergir (Devi & Devi, 2014). Os instars larvais, a formação de pupas e a emergência dos adultos ocorrem no interior dos grãos. As larvas constroem verdadeiras galerias no interior dos grãos antes de atingirem o estágio de pupa e por estas galerias que os adultos irão emergir (Brier, 2007). O ciclo de vida de *C. maculatus* dura em torno de 28-30 dias em condições de 30 °C e 70% de umidade relativa do ar (Cruz *et al.*, 2016). Os insetos adultos de *C. maculatus* sobrevivem em média 7 dias em condições laboratoriais, podendo chegar a 2 semanas. Os insetos adultos não se alimentam dos grãos, podendo se alimentar de pólen e néctar das flores, quando em campo, sendo seu sucesso reprodutivo definido pelas fontes nutricionais, as quais tiveram acesso durante o período larval (Brier, 2007; Guedes *et al.*, 2007).

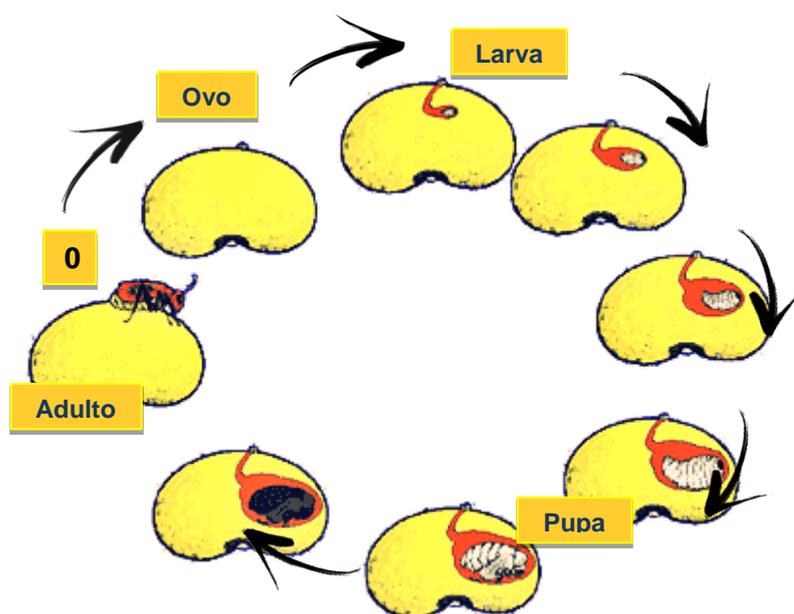


Figura 8 - Esquema do ciclo de vida do inseto *Callosobruchus maculatus*. Representação dos quatro estágios de desenvolvimento de *C. maculatus* (ovo, larva, pupa e adulto). Início do ciclo de vida com a postura dos ovos sobre o tegumento da semente (0). Disponível em: <http://bmdtran.net/cowpea/english/background.htm>. Acessado em: 16/01/2018.

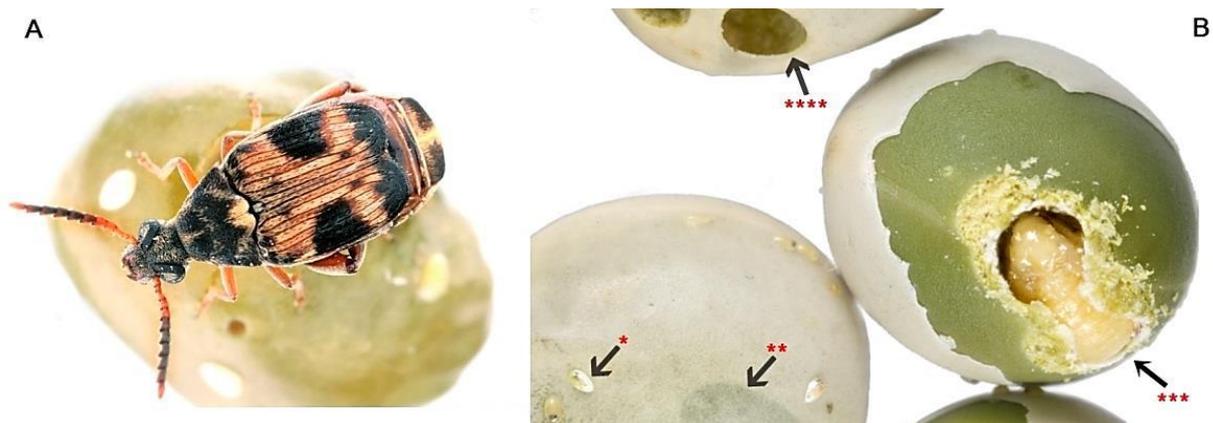


Figura 9 - Estágios de desenvolvimento e danos ocasionados aos grãos pelo inseto *Callosobruchus maculatus*. Inseto adulto *Callosobruchus maculatus* (A). Setas: Ovo (*) Região translúcida deixada pela penetração da larva (**) Larva no interior do tegumento (***) Dano ocasionado ao grão pela emergência do adulto (****) (B). Disponíveis em: <https://www.biolib.cz/en/image/id304537/>(A);<https://www.oekolandbau.de/erzeuger/pflanzenbau/allgemeiner-pflanzenbau/pflanzenschutz/schaderreger/vorratsschaedlinge/chinesischer-bohnenkaefer-vierfleckiger-bohnenkaefer-gattung-callosobruchus/> (B). Acessado em: 16/01/2018.

C. maculatus está emergindo como modelo para estudos na área de ecologia, evolução e fisiologia digestiva, porém como *T. molitor*, não tem genoma sequenciado possuindo transcriptomas que compreendem estágios de desenvolvimento como o estágio embrionário (Benton *et al.*, 2016); a sua fisiologia digestiva e o *De Novo* transcriptoma que é a montagem de sequências para a criação de transcriptomas sem o auxílio de um genoma de referência para estágios como larva, pupa e adulto (Pedra *et al.*, 2003; Chi *et al.*, 2009; Sayadi *et al.*, 2016).

Os métodos de controle empregados para *C. maculatus* não diferem dos métodos atualmente empregados para o controle de insetos pragas, ou seja, a utilização de inseticidas e fumigantes (Jackai & Adalla, 1997). Os danos e os custos gerados por estes métodos impulsionam pesquisas para a utilização de compostos provenientes de plantas (bioinseticidas) com ação direcionada as vias metabólicas essenciais destes insetos com o intuito de minimizar os danos gerados ao meio ambiente, à saúde, a persistência e a ressurgência de insetos pragas (Brent & Hollomon, 1998; Sivakumar *et al.*, 2010; Jaya *et al.*, 2014).

Pandey, Palni, Tripathi (2014), mostraram que o óleo essencial proveniente da planta *Chenopodium ambrosioides* L. (Família: Chenopodiaceae), erva-de-santa-maria, apresentou 100% de atividade repelente contra *C. maculatus* e *C. chinensis* quando comparado a outros 35 óleos essenciais de plantas, sendo uma alternativa viável, barata e “eco-friendly” para o controle destes e de outros insetos praga.

El-latif (2015), mostrou que o inibidor de cisteino protease presente nas sementes de cevada (*Hordeum vulgare*), variedade Giza 123, foi capaz de inibir a atividade da protease cisteínica digestiva de *C. maculatus* tanto *in vivo* quanto *in vitro*. *In vivo*, os efeitos da inibição prolongaram o tempo de desenvolvimento, reduziram a taxa de fecundidade, porém não afetaram a longevidade dos adultos e nem o seu peso seco.

1.3 – Sistema Digestivo de insetos

O canal alimentar de insetos é composto por três regiões: intestino anterior (Foregut), intestino médio (Midgut) e intestino posterior (Hindgut) (Fig. 10). O intestino anterior está relacionado com a absorção e condução do bolo alimentar para o intestino médio. O intestino médio é o principal sítio de digestão e absorção de nutrientes e o intestino posterior está relacionado com a excreção das secreções provenientes dos túbulos de Malpighi e os resíduos não digeridos provenientes do intestino médio (Chapman, 2013; Castagnola & Jurat-Fuentes, 2016).

O intestino médio, em alguns insetos, é revestido por uma camada acelular, denominada matriz peritrófica ou membrana peritrófica (MP), que é composta por fibrilas de quitina embebidas em uma matriz glicoproteica. A MP possui quatro funções importantes no processo digestivo de insetos que são: proteção contra danos mecânicos entre o epitélio digestivo e o bolo alimentar; compartimentalização de enzimas e/ou produtos da digestão; neutralização de toxinas e barreira de proteção contra a entrada de patógenos (Hegedus *et al.*, 2009).

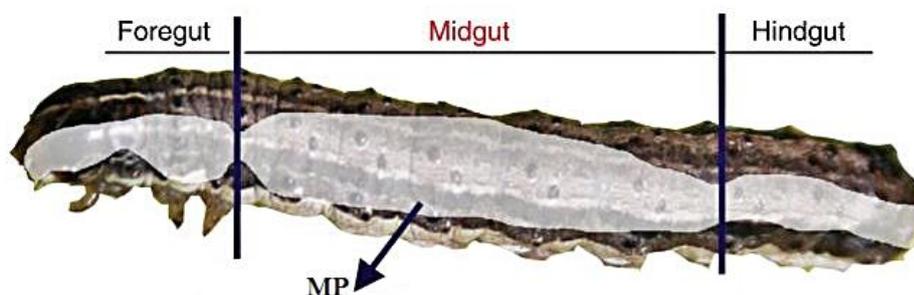


Figura 10 - Divisão geral do intestino de insetos. Principais regiões do intestino: anterior (Foregut), médio (Midgut) e posterior (Hindgut). Setas: MP (matrix peritrófica), localizada no intestino médio. Adaptado de Castagnola & Jurat-Fuentes, 2016.

A digestão em insetos ocorre em três fases: inicial, intermediária e final. Na fase inicial ocorre a redução da massa molecular dos polímeros através da ação de enzimas como α -amilases, celulasas e proteinases. Na fase intermediária estão presentes dímeros ou oligômeros como maltose, celobiose e dipeptídeos derivados da hidrólise do amido, celulose e proteínas, respectivamente. E na fase final os dímeros provenientes da fase intermediária são clivados por maltases, celobiasas e dipeptidases (Terra, 1988; Terra & Ferreira *et al.*, 1994; Chapman, 2013).

O conjunto de proteases e enzimas digestivas de insetos devem estar organizadas e compartimentalizadas em regiões específicas no interior do intestino médio onde possuam condições ótimas como de pH para a sua perfeita atividade (Dunse *et al.*, 2010). Dentre as principais proteases digestivas de insetos encontramos as proteases serínicas (como tripsina e quimotripsina), cisteínicas (como as catepsinas O, B, L, K e H), aspárticas (como a catepsina D) e metaloproteases (Tab. 4) (Bode & Huber, 1992; Terra & Cristofolletti, 1996; Prabhakar *et al.*, 2007).

No processo digestivo de insetos, as proteases cisteínicas estão envolvidas no processo digestivo, na degradação de vitelo e na metamorfose (Cristofolletti, Ribeiro, Terra, 2005). As proteases serínicas além de estarem envolvidas em processos digestivos também estão presentes na ecdise, metamorfose e processos imunológicos como melanização e expressão de peptídeos antimicrobianos (Broehan *et al.*, 2010).

Tabela 4 - Classes de proteases (Adaptado de Oliveira *et al.*, 2003).

Proteases	Aminoácido no sítio ativo	pH	Proteínas
Serino proteases	Ser; His	7-9	Tripsina, quimotripsina, elastase, catepsina G
Cisteino proteases	Cys	4-7	Papaína, Ficina, Bromelina, catepsinas B, C, H, K
Aspático proteases	Asp; Try	abaixo de 5	Catepsina D e E, Renina, pepsina
Metaloproteases	ion Metal	7-9	Carboxepeptidas A e B, aminopeptidases

Análises de transcriptomas e proteomas de intestino de insetos sugerem que vários genes que codificam proteases são reguladas positivamente ou negativamente em resposta as diferentes dietas (Zhu-Sazman *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2009; Perkin *et al.*, 2016).

Richards *et al.* (2008) mostraram através do sequenciamento do genoma de *T. castaneum* que os insetos pertencentes a família Tenedrionidae, como o próprio *T. castaneum* e *T. molitor*, possuem um complexo arsenal de proteases digestivas que englobam genes que codificam as catepsinas do tipo B, L, e serino proteases (tripsinas e quimotripsinas). Especificamente, *T. castaneum* possui genes que codificam catepsinas do tipo F, B, L e pela primeira vez descrito em insetos, as catepsinas do tipo O e K. Quando comparada a expressão de genes das principais classes de proteases digestivas (cisteínica, serínica e aspártica) entre *T. castaneum*, *Apis mellífera*, *Anopheles gambiae* e *Drosophila melanogaster*, *T. castaneum*, apresentou o maior índice de expressão de genes de proteases da classe cisteínica dentre os demais insetos (Fig. 11). Tal característica pode estar relacionada à eficiência de proteases cisteínicas na digestão de proteínas contidas nos grãos de cereais, uma das principais fontes alimentares de *T. castaneum* e também na adaptação frente ao grande número de inibidores de proteases serínicas contidas nos grãos de cereais (Goptar *et al.*, 2012).

Oppert *et al.* (2005), sugerem que *T. castaneum* possui a capacidade de modular a expressão de proteases digestivas das classes cisteínica e serínica de acordo com a presença de inibidores classe-específicos contidos na dieta. Oppert *et al.* (2010), mostraram através de microarray análise que larvas alimentadas com os inibidores, trans-Epoxisuccinil-L-leucilamido (4-guanidina) butano, E-64 (inibidor de proteases cisteínicas), SKTI (inibidor de protease serínica do tipo Kunitz de soja) e sua combinação foram capazes de regular positivamente e negativamente a expressão dos genes de proteases digestivas, confirmando a capacidade de *T. castaneum* em modular a expressão de suas proteases frente a inibidores.

Oppert *et al.* (2017) na busca por genes ortólogos entre *T. castaneum* e *T. molitor* localizaram vários genes codificantes de proteases e enzimas com função crítica no metabolismo digestivo e dentre eles a catepsina L (*T. castaneum*, Tc110001, e seu ortólogo, TmL13, em *T. molitor*), confirmando a funcionalidade e a ancestralidade deste gene, dado também evidenciado por Martynov *et al.* (2015). Richards *et al.* (2008) também na busca por genes ortólogos entre *T. castaneum* e *Drosophila melanogaster* localizaram vários genes com função no metabolismo digestivo (Tab. 5).

Proteases cisteínicas são ativas em pH levemente ácido e são inativadas irreversivelmente, em pH neutro (Turk *et al.*, 2012). O sistema digestivo (intestino médio) de *T. castaneum* e *T. molitor* são compartimentalizados em uma região anterior ácida, pH 5,6, que secreta a maior concentração de proteases cisteínicas e uma região posterior levemente alcalina, pH 7,9, onde estão concentradas as proteases serínicas (Terra & Cristofolletti, 1996; Prabhakar *et al.*, 2007; Vinokurov *et al.*, 2009).

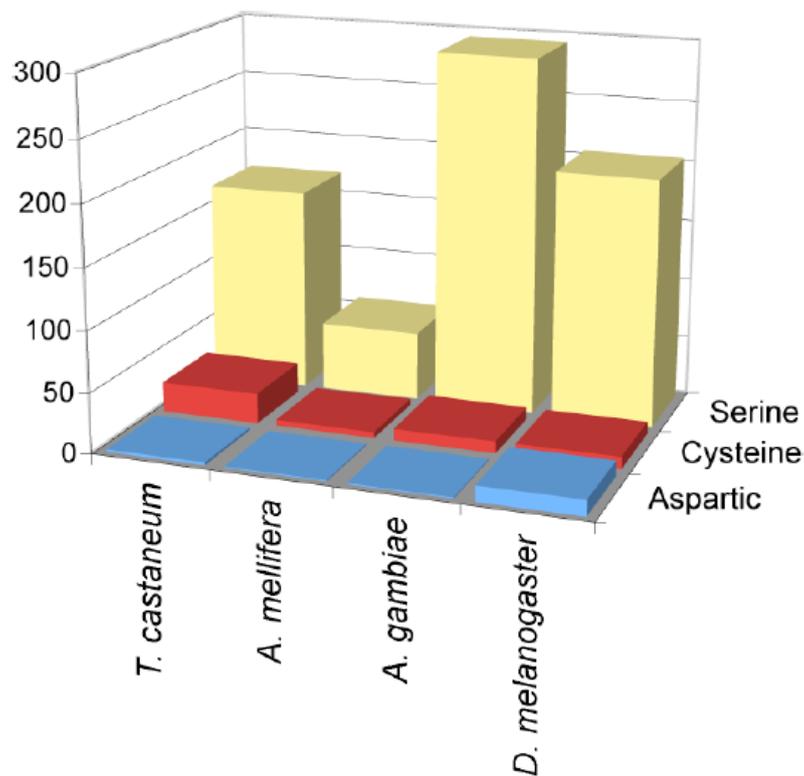


Figura 11 - Número total de proteases aspártica, cisteínica e serínica em diversas espécies de insetos. Obtido de Richards *et al.* (2008).

Tabela 5 - Genes mais expressos de proteases digestivas de *Tribolium castaneum* e seus ortólogos em *Drosophila melanogaster*. Adaptado de Richards *et al.* (2008); Martynov *et al.* (2015) e Perkin *et al.* (2016).

<i>Tribolium</i> gene	<i>Drosophila</i> ortólogo	Atividade
TC11001	CG6692-PC	Catepsina L
TC11000	TC07214	Catepsina L
TC02952	CG10992-PA	Catepsina B
TC02953	CG10992-PA	Catepsina B
TC07214	CG12163-PB	Catepsina O
TC13582	CG5367-PA	Catepsina K

Silva *et al.* (2001), mostraram que larvas de *C. maculatus* concentram grande quantidade de proteases cisteínicas em seu sistema digestivo em relação a larvas de *Zabrotes subfasciatus*. Essa diferenciação ocorre devido à adaptação de *C. maculatus* a alimentação rica em inibidores de serino proteases, sendo a utilização de proteases cisteínicas e aspárticas essenciais ao metabolismo digestivo deste inseto.

Estudos mostram que a concentração de proteases aspárticas no sistema digestivo de larvas de *C. maculatus* equivale a 10% da atividade do pool de proteases digestivas e que esta porcentagem pode aumentar diante dietas contendo concentrações elevadas de inibidores de proteases cisteínicas, sugerindo que as proteases aspárticas em *C. maculatus* possuem um papel protetivo/adaptativo frente a inibidores de cisteíno proteases contidos nas sementes (Zhu-Salzman *et al.*, 2003).

Armirusin *et al.*, 2007, mostraram que a combinação de inibidores de proteases cisteínica, aspártica e serínica (recombinante do inibidor de protease cisteínica de *G. max*, scN; inibidor de proteases aspártica, Pepstatina, e inibidor de protease serínica de *G. max*, Kunitz) possuem ação mais efetiva sobre o tempo de desenvolvimento das larvas de *C. maculatus* do que quando isolados.

Nogueira *et al.* (2012) mostraram que a ingestão do inibidor de protease cisteínica (cistatina, isolado do ovo de galinha) é capaz de aumentar o tempo de desenvolvimento das larvas, mas não afeta significativamente, a mortalidade, devido a adaptação do perfil de expressão de proteases como mostrado por Armirusin *et*

al. (2007). E que larvas alimentadas com a cistatina tiveram o proteoma do epitélio intestinal e de seu conteúdo (intestino médio) modificados diante o PI.

De Novo Transcriptoma de *C. maculatus* anotou mais de 40% dos genes com similaridade sequencial com *T. castaneum* (Fig. 12). Em larvas de *C. maculatus* genes relacionados à digestão enzimática foram os mais expressos, sendo o gene codificante da protease cisteínica, catepsina B-tipo 2, (TR55315|c3_g1_i2), um dos mais expressos e exclusivo do estágio larval. Este mesmo gene também possui altos níveis de expressão em larvas de *T. castaneum* (Sayadi *et al.*, 2016).

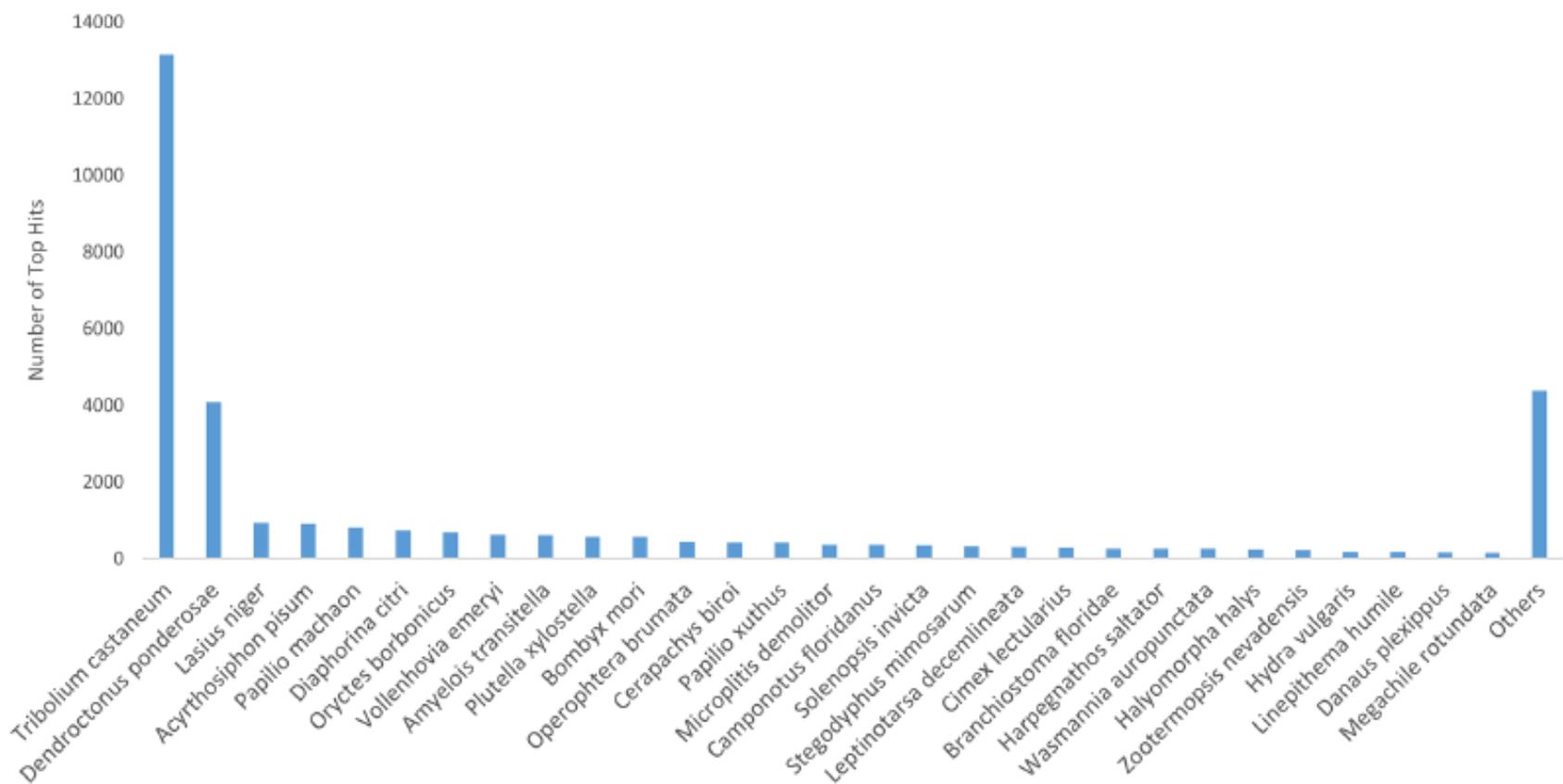


Figura 12 – Principais genes anotados de *Callosobruchus maculatus* avaliados através de BLAST do banco de dados não redundantes do National Center for Biotechnology Information (NCBI) e sua distribuição entre as espécies. Obtido de Sayadi *et al.* (2016).

2.0 - Objetivos

2.1 – Objetivo geral

Isolamento de inibidores de proteases de cotilédones de sementes de *Glycine max* e a avaliação dos seus efeitos sobre enzimas digestivas dos insetos *Tribolium castaneum*, *Tenebrio molitor* e *Callosobruchus maculatus*.

2.2 – Objetivos específicos

- Avaliar o desenvolvimento do inseto *T. castaneum* alimentado com a farinha de cotilédones de sementes de *G. max*;
- Avaliar as atividades das enzimas digestivas, cisteínica e serínica, das larvas após alimentação;
- Isolar e caracterizar inibidores de proteases de cotilédones de sementes de *G. max*;
- Avaliar os efeitos *in vitro* dos inibidores de proteases sobre as atividades das proteases cisteínicas e serínicas dos insetos e
- Analisar, *in silico*, as interações moleculares entre os inibidores de proteases de *G. max* com proteases digestivas do inseto *T. castaneum*.

3.0 – Materiais e Métodos

3.1 – Obtenção das sementes e farinha

3.1.1 – *Vigna unguiculata*, *Glycine max* e *Triticum spp.*

As sementes de feijão, *Vigna unguiculata* (cv fradinho), e de soja, *Glycine max*, assim como, a farinha de trigo branco, *Triticum spp.*, foram obtidas comercialmente. As sementes de *V. unguiculata* e *G. max* foram armazenadas a -20 °C por 3 dias antes da utilização. Posteriormente, as sementes de *V. unguiculata* foram mantidas a temperatura ambiente por 24 h e utilizadas como fonte alimentar pelos besouros *C. maculatus*. As sementes de *G. max* foram descascadas e os cotilédones trituradas e peneiradas até a obtenção de uma farinha. A farinha de trigo branco, *Triticum spp.* foi mantida a -70 °C por 24 h e subsequentemente, 24 h, em estufa a 60 °C, para esterilização. Antes da utilização a farinhas de *Triticum spp.* foi peneiradas em peneiras de 0,3 mm.

3.2 – Insetos

3.2.1 – *Callosobruchus maculatus*

Os insetos *C. maculatus* foram mantidos no insetário do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LQFPP/UENF) em BOD com temperatura de 28 °C, umidade relativa do ar, 60%, e período de 24 h escuro. Como fonte alimentar foi utilizada as sementes de feijão de corda, *Vigna unguiculata* (cv fradinho).

3.2.2 – *Tribolium castaneum* e *Tenebrio molitor*

Os insetos *T. castaneum* e *T. molitor* foram mantidos no insetário do Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (LQFPP/UENF), em BODs distintas, ambas com temperatura a 30 °C, umidade relativa do ar 70 % e período de 24 h escuro. Como fonte alimentar foi utilizada 100 % de farinha de trigo branco, *Triticum spp.*

3.3 – Efeito da farinha de cotilédones de *G. max* sobre os parâmetros de desenvolvimento (sobrevivência larval, tamanho larval, formação de pupas e adultos) do inseto *T. castaneum*

Para avaliação da influência da farinha de *G. max* sob os parâmetros de desenvolvimento, ovos de 0-24 h foram coletados e dispostos em potes individuais contendo farinha de trigo branco, *Triticum spp.* e farinha de *G. max*, na proporção de 10 ovos para 1 g de farinha (total 10 g de farinha). A sobrevivência larval foi avaliada com 11 e 17 dias após a eclosão (DAE) através da contagem das larvas vivas, a partir do número inicial de ovos (100 ovos). O parâmetro de tamanho larval, foi avaliado no mesmo intervalo, 11 e 17 DAE, através do programa ImageJ. O parâmetro de acompanhamento da formação de pupas foi iniciado com 18 DAE, sendo os dados coletados no intervalo de 4 em 4 dias. A avaliação do parâmetro de formação de adultos foi realizada simultaneamente a formação de pupas, iniciando em 18 DAE e se estendendo até o 58º DAE. O parâmetro de formação de adultos foi avaliado no mesmo período. As pupas e os adultos formados durante todo do experimento foram coletados e colocados em potes distintos (pupas, adultos) para prevenir o canibalismo larval sobre os demais estágios. Os experimentos foram realizados em triplicata experimental e biológica.

3.4 – Efeito da dieta contendo farinha de cotilédones de *G. max* sob a atividade das proteases digestivas de *T. castaneum*

3.4.1 – Atividade de protease cisteínica

Larvas de 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE alimentadas com as farinhas de trigo branco, *Triticum spp.* e *G. max* foram homogeneizadas em tampão citrato-fosfato (fosfato de sódio 100 mM, citrato fosfato 100 mM, Triton X-100 0,1 %, e DTT 1,5 mM), pH 5,6, na proporção de 0,6:110 (peso/volume), agitadas por 1 h a 4 °C, centrifugadas a 2.000 x g por 5 min e o sobrenadante coletado para a atividade enzimática. O ensaio foi realizado baseado na metodologia descrita por Michaud *et al.* (1996) utilizando uma curva padrão de papaína e azocaseína como substrato enzimático. O ensaio foi realizado utilizando 30 µL do extrato das larvas mais 80 µL da solução de azocaseína a 1% e 10 µL de tampão citrato-fosfato, pH 5,6, e, posteriormente, incubação em banho-maria por 1 h. Após, a incubação foi

acrescentado 300 µL de TCA 10% para precipitação de proteínas e em seguida, as amostras foram centrifugadas por 2 min a 3000 x *g*. Após a centrifugação foram coletados 350 µL do sobrenadante e misturados a 300 µL de NaOH 1 M. A leitura das amostras foi realizada no comprimento de onda de 440 nm.

3.4.2 – Atividade de protease serínica

Larvas de 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE alimentadas com as farinhas de trigo branco, *Triticum spp.* e *G. max* foram homogeneizadas em tampão Tris-HCl, pH 8,0, na proporção de 1:110 (peso/volume), agitadas por 1 h a 4 °C, centrifugadas a 2.000 x *g* por 5 min e o sobrenadante coletado para a atividade enzimática. O ensaio foi realizado baseado na metodologia descrita por Demartini *et al.* (2007) utilizando uma curva padrão de tripsina (Sigma-Aldrich/ MERCK) e BApNA como substrato enzimático. O ensaio foi realizado misturando-se 50 µL de cada extrato (*G. max* e larvas) e incubando-os por 1 h a 37 °C. A reação foi parada com 150 µL de ácido acético 30%. A leitura das amostras foi realizada no comprimento de onda de 440 nm.

3.5 – Efeito inibitório, in vitro, do extrato proteico de farinha de *G. max* sob a atividade de proteases cisteínicas e serínicas do intestino larval de *T. castaneum*

3.5.1 – Atividade Antipapainásica

Os intestinos de larvas 15 DAE, alimentadas com a farinha de trigo branco (Tr) foram dissecados e homogeneizados em tampão citrato-fosfato, pH 5,6, na proporção de 5 intestinos para 400 µL de tampão e agitados por 1 h a 4 °C e posteriormente, centrifugados a 2.000 x *g* por 5 min. A farinha de de soja, *G. max* (Gm) foi homogeneizada no tampão citrato-fosfato, pH 5,6, na proporção 1:10 (peso/volume), agitada e centrifugada como descrito para os intestinos. O ensaio de inibição foi realizado utilizando 20 µL do sobrenadante dos extratos dos intestinos ou 20 µL de papaína (10 µg), sendo incubados com 20 µL do extrato da farinha por 30 min a 37 °C. A atividade do intestino ou da papaína sem a adição do extrato da farinha foi considerada como 100 %. A atividade de protease cisteínica foi realizada como descrito no item 3.4.1.

3.5.2 – Atividade Antitriptica

Os intestinos de larvas 15 DAE, alimentadas com a farinha de trigo branco (Tr) foram dissecados e homogeneizado em tampão Tris-HCl, pH 8,0, na proporção de 10 intestinos para 400 µL de tampão, agitadas por 1 h a 4 °C e posteriormente, centrifugados a 2.000 x g por 5 min. A farinha de soja, *G. max* (Gm) foi homogeneizada no tampão Tris-HCl, pH 8,0, na proporção 1:10 (peso/volume), agitada e centrifugada como descrito para os intestinos. O ensaio de inibição foi realizado utilizando 20 µL do sobrenadante dos extratos dos intestinos ou 20 µL de tripsina (10 µg), sendo incubados com 20 µL do extrato das farinhas por 30 min a 37 °C. A atividade do intestino ou da tripsina sem a adição dos extratos das farinhas foi considerada como 100 %. A atividade de protease serínica foi realizada como descrito no item 3.4.2.

3.6 – Isolamento e caracterização de inibidores de proteases dos cotilédones de *G. max* através de cromatografia de afinidade

3.6.1 – Montagem da coluna de afinidade Sepharose 4B-papaína

A coluna de afinidade (Sepharose 4B-papaína) foi montada de acordo com Cuatrecasas (1970). Sepharose 4B ativada com brometo de cianogênio (2 g) foi embebida em tampão bicarbonato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM, pH 9,0 durante 16 h a 4 °C. Posteriormente, uma solução de 25 mg de papaína pura (Sigma-Aldrich/MERCK) dissolvida no tampão acima foi adicionada à matriz e deixada sob agitação lenta por 4 h a temperatura ambiente. A suspensão foi mantida a 4 °C por 16 h, para aumento da eficiência de ligação. Posteriormente, a resina foi agitada levemente com bicarbonato de sódio 100 mM, glicina 100 mM, pH 9,0, por 3 h, a temperatura ambiente e em seguida filtrada e lavada com ácido acético 100 mM, pH 3,0 e novamente filtrada. Após cada lavagem, os eluídos foram medidos e a concentração de proteínas nesses eluídos foi determinada por Bradford (1976). A quantidade de proteína eluída nas lavagens foi diminuída da quantidade inicial de proteínas na solução de papaína (Bradford, 1976) e pela diferença foi possível determinar a quantidade de proteína retida na coluna. A resina foi lavada exaustivamente com tampão bicarbonato de sódio 100 mM, NaCl 500 mM, pH 9,0, para o retorno ao pH alcalino e conservada a 4 °C.

3.6.2 – Isolamento dos inibidores de proteases de *G. max* por cromatografia de afinidade Sepharose 4B-papaína

Proteínas solúveis dos cotilédones de *G. max* foram extraídas usando bicarbonato de sódio 0,1 M, NaCl 0,1 M pH 9,0, sob agitação por 1 h a 4 °C. A mistura foi centrifugada a 10.000 x *g* por 20 min a 4 °C e o sobrenadante, incubado, por 1 h a temperatura ambiente com a resina de papaína- Sepharose 4B. Após a incubação a resina misturada ao extrato proteico foi montada em uma coluna de vidro para a eluição das frações não retidas e retidas. Após o empacotamento, a resina foi lavada exaustivamente com bicarbonato de sódio 0,1 M, NaCl 0,1 M pH 9,0 a um fluxo de 1,2 mL/min para a retirada das proteínas não retidas. As proteínas retidas foram eluídas com ácido acético 0,1 M pH 3,0 a um fluxo de 1,2 mL/min. As absorvâncias das frações não retidas e retidas foram lidas no comprimento de onda de 280 nm. O material retido foi dialisado contra água destilada (em membrana de diálise que exclui proteínas com massa molecular abaixo de 8.000 Da) durante 24 h a 4 °C e posteriormente, recuperado por liofilização.

3.6.3 – Visualização do perfil das proteínas retidas na coluna de afinidade Sepharose 4B-papaína

Proteínas retidas da coluna de afinidade à papaína foram ressuspendidas em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10% (peso/volume), glicerol 50% (v/v) e azul de bromofenol 0,01%) e submetidas a separação por SDS-PAGE 12%, de acordo com Laemmli (1970), com modificações. A corrida foi realizada a uma voltagem constante de 100V durante aproximadamente 3 h. Após a eletroforese o gel foi corado com uma solução corante (0,8 g de Azul Brilhante de Coomassie R, 320 mL de metanol, 80 mL de ácido acético e para o volume final de 400 mL de H₂O) e descorado por uma solução descorante (40% de metanol, 10% de ácido acético e 50% de H₂O).

3.6.4 – Caracterização das proteínas isoladas através de espectrometria de massas

As bandas proteicas que foram visualizadas no SDS-PAGE foram recortadas e submetidas a caracterização através de espectrometria de massas em

espectrômetro MALDI-TOF. Esses experimentos foram realizados no laboratório de Toxinologia da FIOCRUZ-RJ em colaboração com o Dr^o André Teixeira da Silva Ferreira e Dr^o Jonas Perales.

Os fragmentos de gel contendo as bandas foram descoloridos por lavagem com uma solução 1:1 (v/v) de tampão bicarbonato de amônia 50mM pH 8,0 e acetonitrila por 15 min. O gel foi desidratado com acetonitrila, seco por centrifugação a vácuo, reduzido com DTT (ditiotreitól), alquilado com iodoacetamida e desidratado novamente com acetonitrila. As proteínas foram tripsinizadas durante 16 h a 37 °C e os peptídeos resultantes foram dessalinizados em ziptip C18. Um volume de 0,3 µL de cada uma das soluções dos peptídeos foi usado para as análises dos espectros de massas no espectrômetro MALDI. Picos de massa com sinal de 20 ou acima (noise ratio) foram usados para pesquisa em bancos de dados (NCBI) usando-se o programa MASCOT versão 2.1 e 2.2. e o programa Scaffold. Os dados foram considerados válidos quando mostravam *score* superior a 40. Os peptídeos identificados de cada amostra foram submetidos a análise por BLAST para confirmar as similaridades.

3.7 – Efeito, *in vitro*, dos inibidores de proteases sob a atividade de proteases digestivas de larvas de *Tribolium castaneum*, *Callosobruchus maculatus* e *Tenebrio molitor*

Os ensaios de inibição das atividades de proteases intestinais das larvas dos insetos *T. castaneum*, *T. molitor* e *C. maculatus* foram realizados de acordo com a metodologia descrita nos itens 3.4.1 (cisteínicas) e 3.4.2 (serínicas), utilizando para isto, a fração retida da coluna cromatográfica que apresentou maior absorvância em 280 nm. Para a atividade de proteases cisteínicas a fração da coluna cromatográfica dialisada foi ressuspensa em tampão citrato-fosfato, pH 5,6 e para a atividade de proteases serínicas foi utilizado o tampão Tris-HCl, pH 8,0. As proteínas retidas correspondentes a uma corrida cromatográfica foram ressuspensas em 40 µL e metade desse volume foi utilizado em cada uma das replicatas do ensaio de inibição.

3.8 – Análise da inibição da atividade das enzimas papaína e tripsina pelo inibidores de proteases isolados na afinidade Sepharose 4B-papaína

A zimografia e/ou zimografia reversa foi utilizada para identificar a atividade proteolítica das enzimas e os efeitos dos inibidores, utilizando como base a degradação de um substrato copolimerizado ao gel de poliacrilamida. Para esse estudo foi empregado o substrato gelatina (Leber e Balkwill, 1997). O zimograma foi realizado submetendo-se a fração retida com maior absorbância a 280 nm, à eletroforese em gel de poliacrilamida 12 %, copolimerizado com gelatina 0,1%. A fração retida dialisada foi dissolvida em tampão de amostra (Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, SDS 10% (peso/volume), glicerol 50% (v/v) e azul de bromofenol 0,01%) e foi aplicada em duas raias do gel. Em seguida, a corrida eletroforética foi iniciada em 50 V e posteriormente, a 80 V até o final da corrida. Após a eletroforese, o gel foi lavado com solução renaturante (Triton X-100 2,5 %) duas vezes por 30 min cada. Após a lavagem, o gel foi cortado em tiras, separando as raias que continham as frações retidas. Posteriormente, as tiras foram incubadas separadamente por 2 h a 37 °C em uma solução contendo 10 µg de Tripsina em tampão Tris-HCl pH 8,0 ou uma solução contendo 10 µg de Papaína em tampão citrato-fosfato (fosfato de sódio 100 mM, citrato fosfato 100 mM, Triton X-100 0,1 % e DTT 1,5 mM) pH 5,6. Após a incubação, as tiras de gel foram lavadas em água destilada e coradas com solução contendo 0,8 g de Azul Brilhante de Coomassie R, 320 mL de metanol, 80 mL de ácido acético e volume final para 400 mL de H₂O. O gel foi descorado por uma solução descorante (40% de metanol e 10% de ácido acético e 50% de H₂O).

3.9 – Construção *in silico* dos modelos tridimensionais proteicos e os ensaios de *docking* proteína-proteína

Os experimentos de modelagem e docking foram realizados em colaboração com o Dr^o Evenilton Pessoa Costa (LBCT/CBB/UENF).

A construção dos modelos 3D para a cisteína (NP_001164001.1) e serino (EFA01278.1) proteases de *T. castaneum* assim como para os inibidores de cisteína (KRH58814.1) e serino (NP_001238611.2) protease de soja (*Glycine max*) foi realizada por modelagem por homologia e *ab initio* pelos programas: Modeller 9.19

(Sali e Blundell, 1993), Swiss-Model (Biasini *et al.*, 2014), RaptorX (Källberg *et al.*, 2012) e I-Tasser (Yang *et al.*, 2015). Tanto as proteases quanto os inibidores tiveram os seus peptídeos sinais removidos, além disso, ambas as proteases tiveram os seus peptídeos inibidores, localizados na região N-terminal, removidos. As análises sobre a qualidade estereoquímica global e local para todos os modelos preditos foram realizados pelos programas: Rampage (Lovell *et al.*, 2003), Verify3D (Eisenberg *et al.*, 1997), ProSA web (Wiederstein e Sippl, 2007), VoromQA (Olechnovič e Venclovas, 2017), ProQ3D (Uziela *et al.*, 2017), Qprob (Cao e Cheng, 2016), DeepQA (Cao *et al.*, 2016) e SVMQA (Manavalan e Lee, 2017). Em seguida, os melhores modelos foram refinados usando o programa ModRefiner (Xu e Zhang, 2011). Os ensaios de docking proteína-proteína foram realizados usando os programas: ClusProV2 (Comeau *et al.*, 2004), HADDOCK (Van Zundert *et al.*, 2016), SwarmDock (Torchala *et al.*, 2013), RosettaDock (Lyskov e Gray, 2008) e HDock (Yan *et al.*, 2017). Para selecionar os complexos de interação mais promissores e a eliminação dos falso-positivos foram realizadas extensivas análises com os programas: DockScore (Malhotra *et al.*, 2015), PPCheck (Sukhwai e Sowdhamini, 2015) e CCharPPI (Moal *et al.*, 2015). Após a seleção dos complexos proteicos com características de interação nativa, a predição da energia livre de ligação (ΔG) em kcal/mol e a constante de dissociação (K_d) em Molar do complexo proteína-proteína, assim como, a análise dos aminoácidos *hot-spot* situados na interface de interação, foram realizadas usando os programas: PRODIGY (Vangone e Bonvin, 2015; Xue *et al.*, 2016) e SpotOn (Moreira *et al.*, 2017), respectivamente. A análise estrutural para detalhar os contatos interatômicos bem como os tipos de interações mantidas na interface dos complexos proteína-proteína, foi realizada pelo programa PDBsum (Laskowski *et al.*, 2018). As imagens dos complexos nativos e suas interações foram produzidas pelo programa UCSF Chimera 1.11.2 (Pettersen *et al.*, 2004).

3.10 – Análises estatísticas

Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental, com exceção da inibição da atividade de proteases cisteínicas do intestino larval de *T. molitor* e de larvas de *C. maculatus* que foram realizados em triplicata experimental e duplicata biológica. As médias e os desvios padrão foram calculados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância One-Way (ANOVA) ou teste T, seguido do teste Tukey utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

4.0 - Resultados

4.1 – Efeitos da farinha de cotilédone de *G. max* sobre a sobrevivência larval, tamanho larval, formação de pupas e adultos do inseto *T. castaneum*

Desde o estágio de ovo, 0-24 h, os insetos *T. castaneum* foram submetidos à alimentação com farinhas de trigo branco (Tr) e de *G. max* (Gm) para a verificação de possíveis interferências em seu ciclo de desenvolvimento.

O parâmetro sobrevivência larval foi avaliado no período de 11 e 17 DAE. O cálculo da porcentagem foi realizado a partir do número inicial de ovos (n=100). Larvas, 11 DAE, alimentadas com Tr e Gm, não apresentaram diferenças significativas (Fig. 13A). Larvas, 17 DAE, alimentadas com farinha de Gm apresentaram redução de 21% na taxa de sobrevivência larval (Fig. 13B).

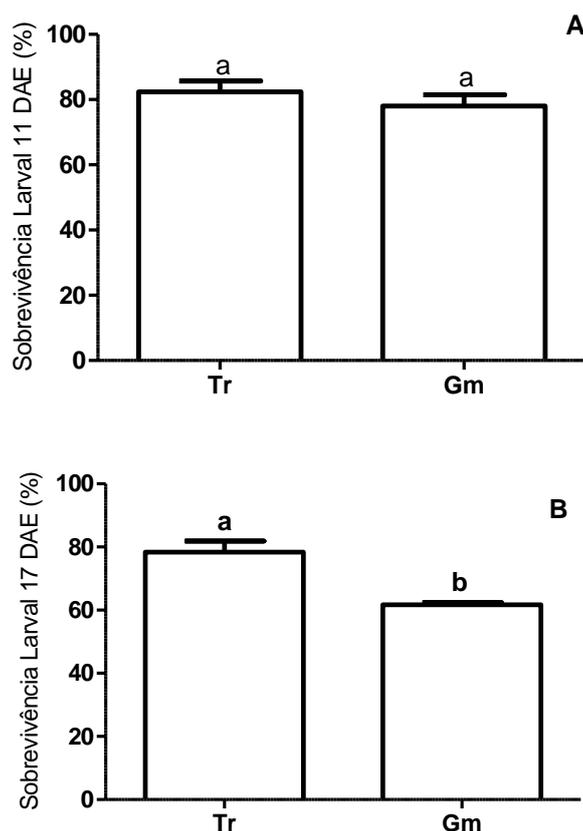


Figura 13 - Sobrevivência de larvas de *T. castaneum* alimentadas com farinhas de trigo (Tr) e de cotilédones de *G. max* (Gm). Sobrevivência larval 11 DAE (A) e 17 DAE (B). O cálculo da porcentagem foi realizado a partir do número inicial de ovos (n=100). Letras diferentes indicam diferenças estaticamente significativas, pelo teste t não paramétrico.

O parâmetro tamanho larval foi avaliado no mesmo período do parâmetro de sobrevivência larval. As larvas vivas, foram fotografadas e posteriormente, medidas utilizando o programa ImageJ. Larvas, 11 e 17 DAE, alimentadas com Gm apresentaram uma redução de aproximadamente 50 e 60%, respectivamente, se comparado ao tamanho das larvas alimentadas com Tr no mesmo período (Fig. 14A, B). A figura 14C representa ilustrativamente o tamanho das larvas alimentadas com Tr e Gm, 17 DAE.

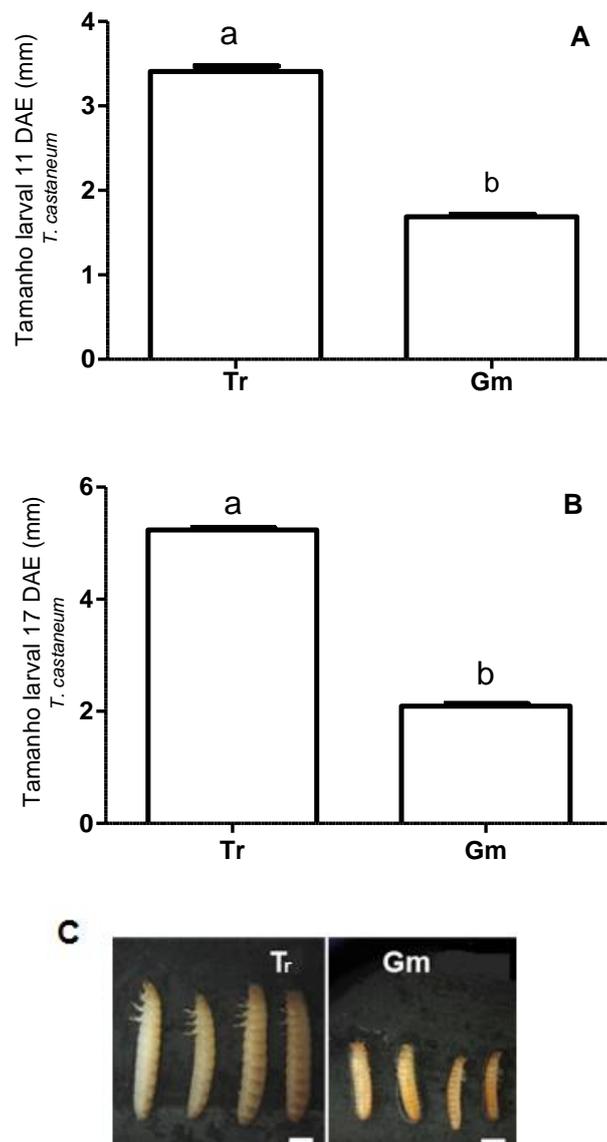


Figura 14 – Tamanho de larvas de *T. castaneum* alimentadas com farinhas de trigo (Tr) e de cotilédones de *G. max* (Gm). Tamanho larval 11 DAE (A) e 17 DAE (B). (C) Foto representativa de larvas 17 DAE, alimentadas com Tr e Gm (escala 1mm). Resultados foram expressos como média (\pm SEM) do número de larvas medidas (incluindo os três experimentos). 11 DAE (T1=178 e Gm =100) e 17 DAE (T1=169 e Gm=100). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, pelo teste t não paramétrico.

O parâmetro formação de pupas foi avaliado a partir do período de 18 DAE, a presença ou não e o número de pupas formadas foram avaliados no intervalo de 4 em 4 dias até 58 DAE. No período inicial de avaliação, 18 DAE, larvas alimentadas com Tr já apresentavam, aproximadamente, 15 % de pupas formadas. Somente a partir de 30 DAE ocorre um aumento na formação de pupas quando as larvas foram alimentadas com Gm. A partir de 38 DAE, não há diferença estatística entre a formação de pupas em Tr e Gm. Este fato ocorre devido a um número maior de pupas já ter sido formado em períodos de avaliações anteriores em Tr em relação a Gm, evidenciado o atraso no início da formação e no número total de pupas formadas quando as larvas foram alimentadas com Gm (Fig. 15).

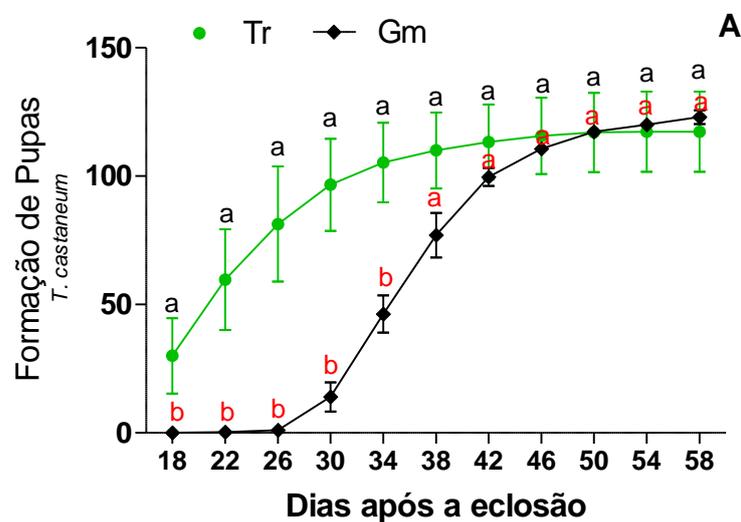


Figura 15 - Formação de pupas de *T. castaneum*. Formação de pupas a partir de larvas alimentadas com as farinhas de trigo (Tr) e de cotilédones de *G. max* (Gm). Período de avaliação com intervalo de avaliação de 4 em 4 dias. O parâmetro foi avaliado até 58 DAE. Resultados foram expressos como média (\pm SEM) de 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, pelo teste One-Way ANOVA.

O parâmetro emergência de adultos (Fig. 16) foi avaliado simultaneamente com o parâmetro de formação de pupas. Assim, foi seguido o período de avaliação de 18 a 58 DAE e o mesmo intervalo de 4 em 4 dias. Larvas alimentadas com Tr em 26 DAE, já apresentavam, aproximadamente, 46 % de adultos emergidos. Após a 42 DAE ocorre um platô, já que a maioria dos adultos havia emergido em períodos de avaliações anteriores. No entanto, as larvas que foram alimentadas com Gm tiveram

o início da emergência de adultos em 30 DAE. A partir de 34 DAE observa-se um aumento no número de adultos emergidos em Gm. O atraso no período inicial de emergência de adultos mostra que o ciclo de vida de *T. castaneum* é afetado durante vários estágios de desenvolvimento diante da alimentação com a farinha de cotilédones de *G. max* (Fig. 16).

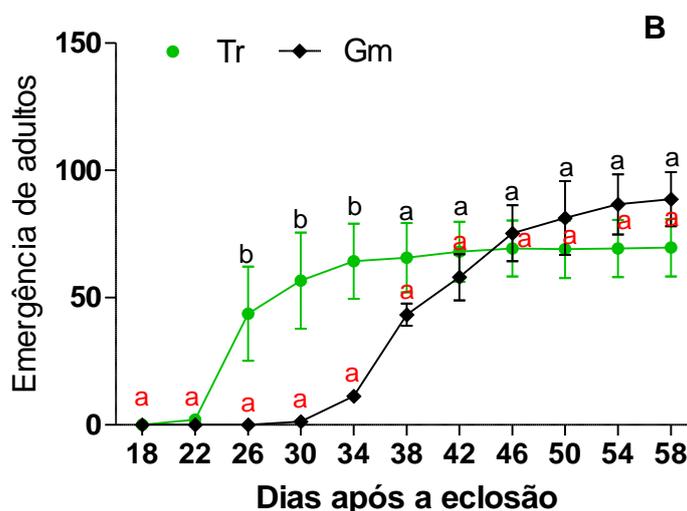


Figura 16 - Emergência de adultos de *T. castaneum*. Emergência de adultos a partir de larvas alimentadas com as farinhas de trigo (Tr) e de cotilédones de *G. max* (Gm). Período de avaliação com intervalo de avaliação de 4 em 4 dias. O parâmetro foi avaliado até 58 DAE. Resultados foram expressos como média (\pm SEM) de 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, pelo teste One-Way ANOVA.

4.2 – Efeito da farinha de cotilédones de *G. max* sobre a atividade das proteases digestivas de larvas de *T. castaneum*

As atividades das proteases digestivas cisteínicas e serínicas de larvas de *T. castaneum* foram avaliadas em 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE. As larvas foram submetidas à alimentação com farinha de trigo branco (Tr) e farinha de cotilédones de *G. max* (Gm). Larvas alimentadas com Gm apresentaram maior redução da atividade cisteínica em 9 DAE se comparado a Tr, no mesmo período. Durante todo o período de avaliação as larvas alimentadas com Gm apresentaram menor atividade de protease cisteínica quando comparado a Tr. Larvas alimentadas com Tr apresentaram um pico de atividade de protease cisteínica em 15 DAE (Fig. 17A). Larvas alimentadas com Gm apresentaram redução da atividade de protease

serínica entre o período de 9 a 13 DAE, quando comparado a Tr. Larvas alimentadas com Tr tiveram uma queda da atividade de protease serínica em 15 DAE. Larvas alimentadas com Gm, entre 15 e 19 DAE apresentaram um aumento da atividade de protease serínica (Fig. 17B). Entre os períodos de 15 a 21 DAE não houve diferença significativa entre a atividade de protease serínica entre as larvas alimentadas com Tr e Gm (Fig. 17B). Interessante salientar que ao comparar as atividades das proteases serínicas e cisteínicas, esta é pelo menos 10 vezes maior do que a atividade de protease serínica (Fig. 15A e B).

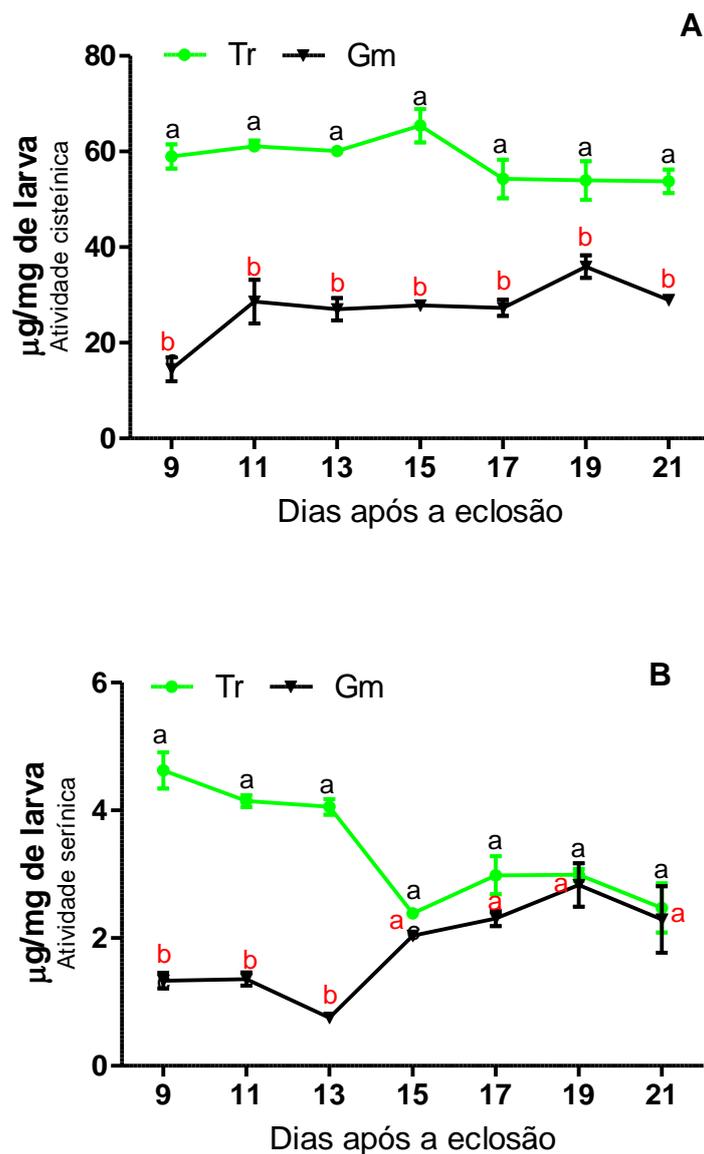


Figura 17 - Atividade das proteases cisteínica e serínica do intestino de larvas de *T. castaneum*. Larvas de 9, 11, 13, 15, 17, 19 e 21 DAE foram alimentadas com as farinhas de trigo (Tr) e de cotilédones de *G. max* (Gm). Atividade de proteases cisteínicas (A) Atividade de proteases serínicas (B). Resultados foram expressos como média de 3 experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas, pelo teste One-Way ANOVA.

4.3 – Efeito inibitório, *in vitro*, do extrato de farinha de *G. max* sobre as principais proteases intestinais de larvas de *T. castaneum*

Diante os resultados obtidos o ciclo de desenvolvimento das larvas alimentadas com farinha de cotilédones de *G. max* e as atividades das principais enzimas digestivas de larvas de *T. castaneum* (cisteínica e serínica) foram

nitidamente alteradas pela dieta com *G. max*. Esses dados indicam que a farinha de *G. max* pode ser uma possível fonte de inibidores de proteases. Assim, para verificarmos se o extrato da farinha de *G. max* era capaz de inibir as principais proteases intestinais de larvas de *T. castaneum* e também as enzimas puras (papaína e tripsina), incubamos o extrato de *G. max* (+Gm) com o intestino ou com as enzimas puras papaína e tripsina sendo, posteriormente, as atividades enzimáticas quantificadas (Fig. 18). As atividades das enzimas puras ou do intestino sem a adição do extrato da farinha de *G. max*, foram consideradas como 100 % (SA=100% de atividade). Para a inibição das proteases intestinais das larvas de *T. castaneum* foram utilizadas larvas de 15 DAE.

O extrato da farinha de *G. max* (+Gm) foi capaz de reduzir a atividade da enzima pura, papaína, em cerca de 90 %, e da atividade de proteases cisteínicas de larvas 15 DAE de *T. castaneum* em torno de 60 % (Fig. 18A). Já para a atividade de protease serínica, o extrato da farinha de *G. max* (+Gm) foi capaz de reduzir a atividade da enzima pura, tripsina, em cerca de 95 % e a atividade de proteases serínica de larvas 15 DAE em torno de 80 % (Fig. 18B).

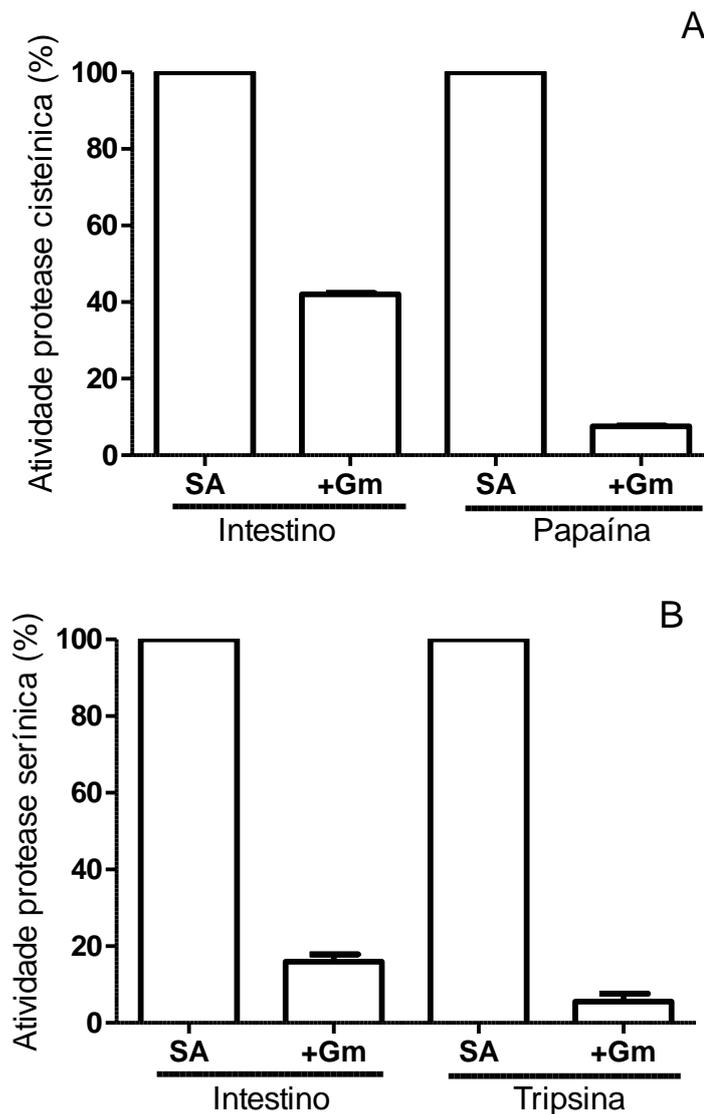


Figura 18 – Inibição da atividade das proteases cisteínica e serínica do intestino de larvas de *T. castaneum*. Atividade das enzimas pura (tripsina e papaína) e das proteases digestivas (cisteínica e serínica) incubados com o extrato da farinha de cotilédones de *G. max* (+Gm). **(A)** Atividade de proteases cisteínicas; **(B)** atividade de proteases serínicas. A porcentagem das atividades foi calculada em relação à atividade das proteases (papaína ou tripsina) ou à atividade presente somente no intestino (SA - sem adição do extrato e *G. max*). Resultados foram expressos como média (\pm SEM) de 3 experimentos independentes.

4.4 – Isolamento e caracterização de inibidores de proteases de cotilédones de *G. max*

Diante os resultados anteriormente apresentados passamos a propor a existência de inibidores de proteases das classes cisteínica e serínica nos

cotilédones de *G. max*. Para o isolamento e a caracterização destes possíveis inibidores foi utilizada a metodologia de cromatografia por afinidade em Sepharose-4B acoplada a enzima papaína. O perfil cromatográfico mostrou a presença de frações retidas que foram eluídas com uma solução de ácido acético 0,1 M, pH 3,0 (Fig. 19A). As frações que apresentaram maior absorvância a 280 nm foram dialisadas, liofilizadas e submetidas à eletroforese não desnaturante para a verificação do perfil proteico da fração retida (Fig. 19B). As bandas no lane fração retida (FR) apresentaram massas moleculares inferiores a 30kDa, o que é esperado para possíveis inibidores, pois estes possuem massa molecular em torno de 20-30, como os inibidores da família do tipo Kunitz que possuem massa molecular entre 18-20 kDa. As bandas destacadas em retângulos azuis (Fig. 19B) foram recortadas e enviadas para a caracterização por espectrometria de massas no laboratório de Toxinologia da FIOCRUZ-RJ. Os resultados de BLAST apresentaram similaridade de 100 % das bandas 1 e 2 ao inibidor de *G. max* do tipo Kunitz (inibidor de serino proteases) e a banda 3 apresentou similaridade à papaína, proveniente da eluição da coluna cromatográfica (Tab. 6). As bandas 1 e 2 originam os mesmos peptídeos e seus resíduos somados totalizam 29 aminoácidos dos 216 existentes na sequência completa do inibidor Kunitz, resultando em uma cobertura de 13% (Fig. 20).

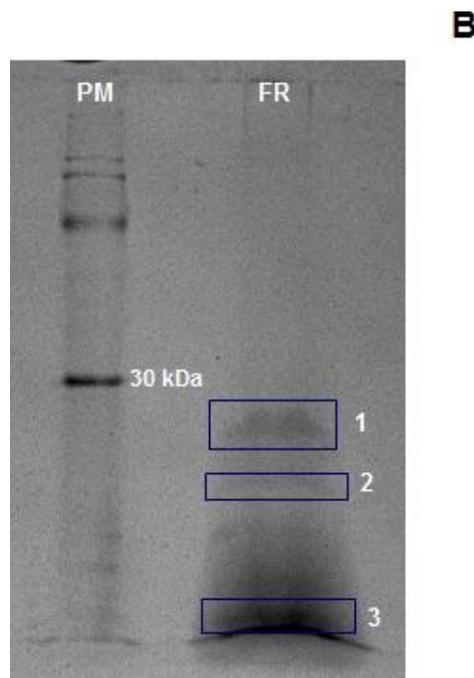
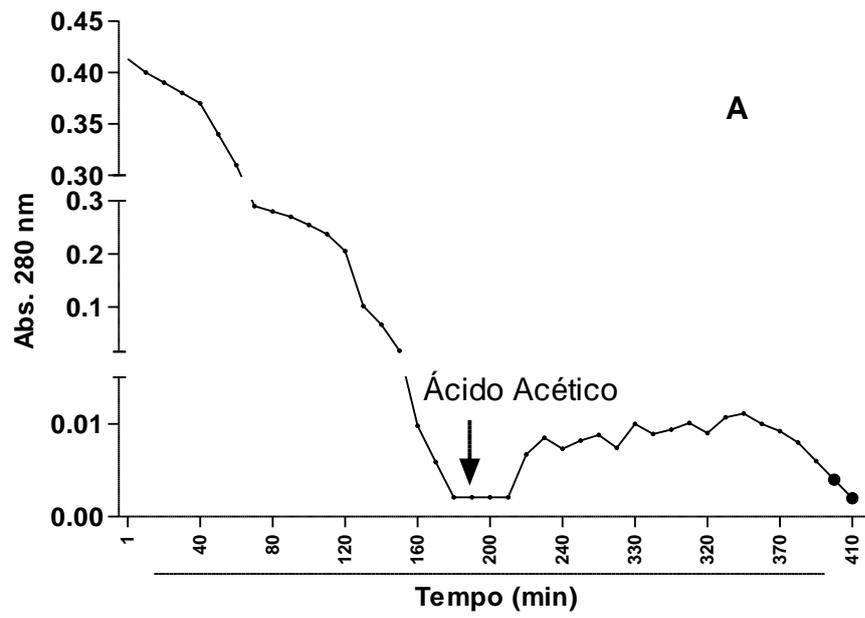


Figura 19 – Cromatograma e perfil proteico da fração retida da coluna de afinidade. Cromatograma (A); SDS-PAGE da fração retida (FR) (B). PM: peso molecular em kDa.

Tabela 6 – Identificação por espectrometria de massas das bandas 1, 2 e 3 (Figura 19B).

Banda proteica	Sequência do peptídeo	íon score	ID GenBank
Banda 1	NELDKGIGTISSPYR	126.8	gi 13375349
Banda 2	IGENKDAMDGWFR	108.7	gi 13375349
Banda 3	Papaína		

gi|13375349 (100%), 24.150,3 Da

Kunitz trypsin inhibitor [Glycine max]

2 exclusive unique peptides, 2 exclusive unique spectra, 2 total spectra, 29/216 amino acids (13% coverage)

```

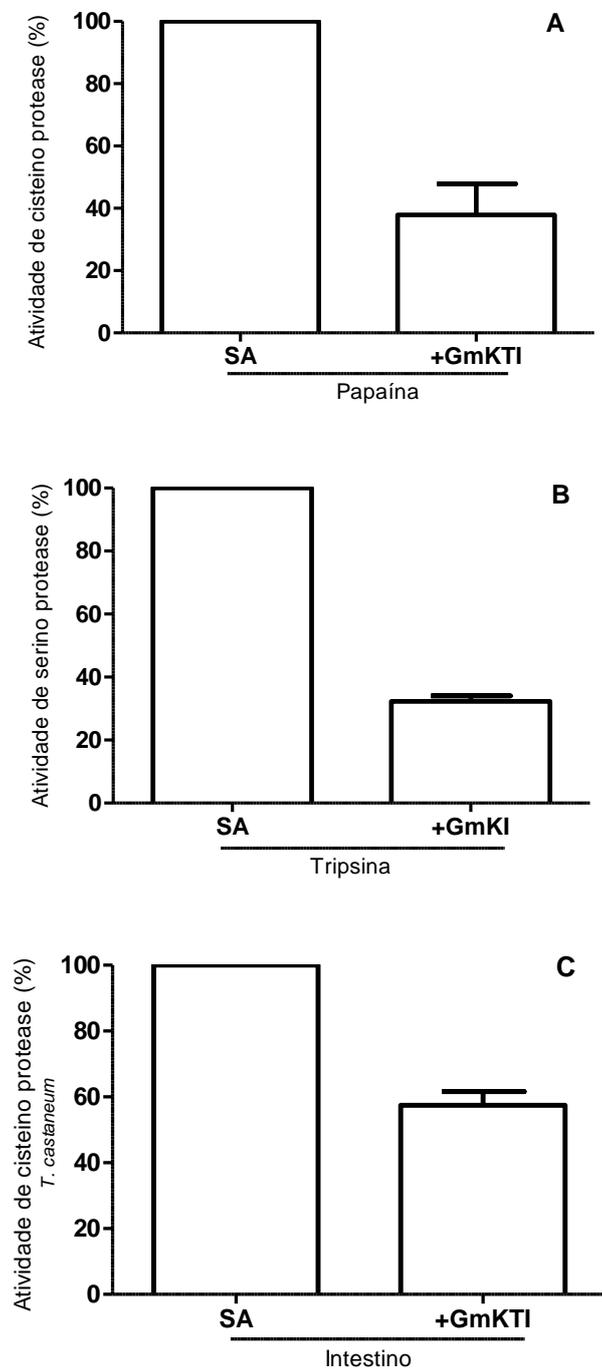
MKSTIFFALF LFCFTTSSYL PSAIADFVLD NEGNPLENGG TYYILSDITA
FGGIRAAPTG NERCPLTVVQ SRNELDKGIG TIISSPYRIR FIAEGHPLSL
KFDSFAVIML CGIPTWSVV EDLPEEHAVK IGENKDAMDG WFLERVSDD
EFNNYKLVFC PQQAEDDKCG DIGISIDHDD GTRRLVVFKN KPLVVQFQKL
DKESLAKKNH GLSRSE
    
```

Figura 20 – Sequência completa do inibidor do tipo Kunitz (gi| 13375349) de *G. max*, proveniente da fração retida da coluna cromatográfica (Figura 19B). Massa molecular 24,150,3 Da.

4.5 – Efeitos, *in vitro*, da fração retida na cromatografia Sepharose 4B-papaína sobre as atividades das principais proteases digestivas dos insetos praga *T. castaneum*, *T. molitor* e *C. maculatus*

Após a caracterização da presença de pelo menos um inibidor do tipo Kunitz na fração retida (+GmKTI), utilizamos esta fração para verificar a sua ação inibitória sobre as enzimas puras, papaína (cisteínica) e tripsina (serínica) e sobre as proteases digestivas de *T. castaneum* (cisteínica e serínica) e das proteases cisteínicas digestivas dos insetos *T. molitor* e *C. maculatus*. A fração retida foi incubada com os extratos das enzimas puras (papaína e/ou tripsina) e com os extratos de intestino de larvas de *T. castaneum* de 15 DAE; extrato de intestino de larvas de *T. molitor* e extrato de larvas de *C. maculatus*. As atividades das enzimas puras e do intestino sem a adição da fração (+GmKTI) foram consideradas como 100 % (SA=100% de atividade). A fração retida contendo o inibidor (+GmKTI) foi capaz de inibir ambas as proteases papaína e tripsina (Fig. 21). A atividade da papaína pura foi de 60 % (Fig. 21A) enquanto que a atividade da tripsina pura foi inibida em 65 % (Fig. 21B). A fração (+GmKTI) também foi capaz de inibir as proteases digestivas, cisteínicas e serínicas, do intestino de larvas de *T. castaneum*, em cerca de 40 e 65 %, respectivamente (Fig. 21C e D). A fração (+GmKTI) e ainda

foi capaz de inibir as proteases cisteínicas do intestino de *T. molitor* e do extrato de larvas de *C. maculatus*, em cerca de 50 e 60%, respectivamente (Fig. 21E e F).



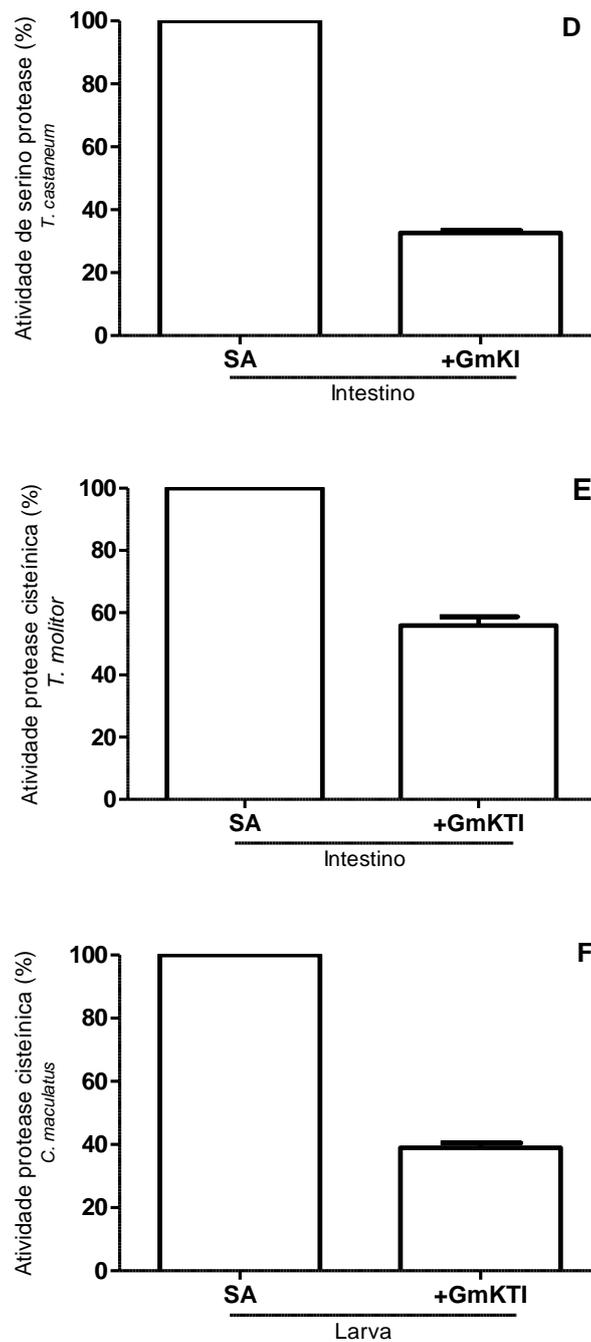


Figura 21 – Inibição das proteases cisteínicas e serínicas e das enzimas puras papaína e tripsina pela fração retida contendo o inibidor do tipo Kunitz de *G. max* (+GmKTI). Atividade das enzimas puras papaína (A) e tripsina (B) incubadas com a fração da coluna cromatográfica contendo o inibidor do tipo Kunitz (+GmKTI); Atividade das proteases cisteínicas (C) e serínicas (D) de *T. castaneum* incubadas com (+GmKTI) e atividade das proteases cisteínicas de *T. molitor* (E) e *C. maculatus* (F) incubadas com (+GmKTI). Resultados foram expressos como média (\pm SEM) de 3 experimentos independentes para as enzimas puras (papaína e tripsina) e *T. castaneum* e 2 experimentos independentes para *T. molitor* e *C. maculatus*.

4.6 – Análise da inibição da atividade de proteases serínicas e cisteínicas pelo método de zimografia reversa

Diante dos resultados inibitórios apresentados pela fração retida contendo o inibidor do tipo Kunitz (+GmKTI) foi possível observar que essa fração inibe tanto proteases cisteínica como serínicas. Esses dados foram mostrados pela inibição tanto das enzimas puras papaína (cisteínica) e tripsina (serínica) como pela inibição das proteases digestivas dos insetos *T. castaneum* (cisteínica e serínica), *T. molitor* (cisteínica) e *C. maculatus* (cisteínica). A partir disso, buscamos entender se essa dupla inibição era resultado unicamente do inibidor, Kunitz presente na fração ou se poderia existir outros inibidores atuando sobre as proteases cisteínicas. Embora a ação do inibidor do tipo Kunitz seja descrita contra serino proteases, uma atividade inibitória mínima sobre as proteases cisteínicas, também já foi descrita para alguns desses inibidores do tipo Kunitz (Heibges, Salamini, Gebhardt, 2003). Para verificarmos a presença de outros inibidores na fração retida realizamos o método denominado zimografia reversa como descrito no item 3.8. Os lanes 1 e 2 contendo a fração retida foram incubados com as soluções das enzimas puras tripsina ou papaína. Após a revelação, foi possível visualizar duas bandas com massas moleculares distintas, sendo possivelmente, inibidores também distintos presentes na fração retida (Fig. 22).

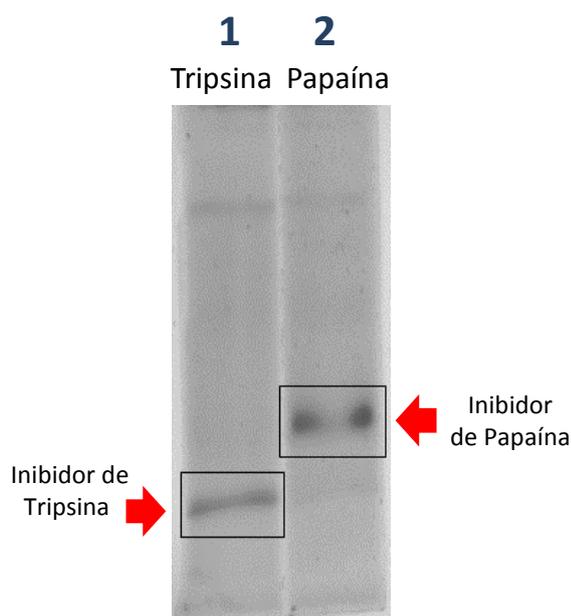


Figura 22 – Zimografia reversa. Inibição da atividade das enzimas tripsina e papaína pelos inibidores presentes na fração retida da coluna cromatográfica. A fração retida foi aplicada no lane 1 e 2, após a separação proteica o gel foi dividido em duas tiras distintas, 1 tira foi incubada com tripsina e a outra com papaína. Após a incubação e posterior, coloração, bandas proteicas distintas apresentaram-se com massas moleculares diferentes, possivelmente sendo inibidores distintos.

4.7 – Modelagem molecular *in silico* e docking dos inibidores de proteases serínicas e cisteínicas de *G. max* com as proteases cisteínicas e serínicas de *T. castaneum*

Os experimentos de modelagem e docking (proteína-proteína) foram realizados com a colaboração do Dr^o Evenilton Pessoa Costa – UENF. A construção dos modelos e as interações moleculares foram realizadas inicialmente para as proteases digestivas do inseto *T. castaneum*. Foram utilizadas as proteases cisteíno (NP_001164001.1) e serino (EFA01278.1) de *T. castaneum* e os inibidores de cotilédones de semente de *Glycine max*, sendo o inibidor de cisteíno proteases (KRH58814.1) e o inibidor de serino proteases (NP_001238611.2) (Tab. 7). Para as análises de docking (proteína-proteína) foram utilizados como controle positivo, os complexos: (PDB 1STF) Estefina B complexada com a protease cisteínica do mamão, papaína (interação inibidor cisteíno x protease), e (PDB 1AVW) tripsina pancreática de porco com o inibidor de serino protease de *G. max* (interação inibidor serínica x protease). Para gerar os modelos, análises de resíduos de aminoácidos e

tipos de ligações (pontes salinas, pontes de hidrogênio e contatos não ligados) foram comparados entre os modelos gerados (inibidores X proteases) e os modelos de interações já estabelecidas que foram utilizadas como controle positivo para o refinamento das estruturas (Tab. 8).

Os resultados do docking do modelo construído da protease cisteínica (NP_001164001.1) de *T. castaneum* e o inibidor de cisteino protease de *G. max* (KRH58814.1) mostraram que existem interações entre 30 resíduos de aminoácidos da protease com pelo menos 26 resíduos do inibidor (Figs. 23, 24 e 25). Essas interações ocorrem por pelo menos uma ponte salina (traços vermelhos), 20 ligações de hidrogênio (traços azuis) e pelo menos outros 202 contatos não ligados, como interações hidrofóbicas, interações de Van der Waals, etc (traços laranja). Os dados comparativos entre o modelo gerado da protease cisteínica de *T. castaneum* e o inibidor de cisteino protease de *G. max* com o modelo de controle positivo depositado no PDB são mostrados na tabela 9 onde destaca-se um valor de ΔG negativo (-15,3) indicando a espontaneidade do processo de formação do complexo.

Tabela 7 – Proteínas utilizadas para a modelagem e docking e seus acessos nos bancos de dados Phytozome e Beetlebase.

Proteína			Organismo	Atividade
KRH58814.1	Acesso Phytozome	GLYMA_05G149800	<i>Glycine max</i>	cisteínica
NP_001238611.2		GLYMA_08G341500		serínica
NP_001164001.1	Acesso Beetlebase	TC110001	<i>Tribolium castaneum</i>	cisteínica
EFA01278		TC002786		serínica

Tabela 8 – Código de acesso dos complexos protease-inibidor utilizados como controle positivo para a modelagem e docking.

Acesso PDB	Descrição	Atividade da protease complexada
1STF	Estefina B complexada com a protease cisteínica do mamão, papaína.	cisteínica
1AVW	Tripsina pancreática de porco com o inibidor de serino protease de <i>G. max</i> .	serínica

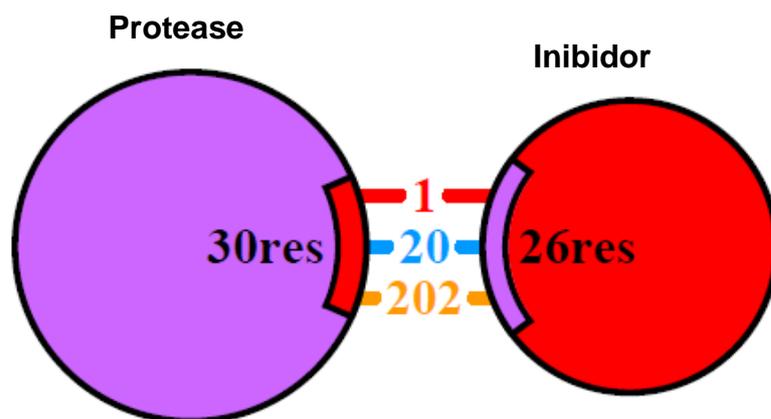


Figura 23 – Diagrama mostrando o número de resíduos, o tipo de ligações e a área de superfície de cada proteína. Dados gerados pelas análises do modelo construído da protease cisteínica (NP_001164001.1) de *T. castaneum* e o inibidor de cisteino protease de *G. max* (KRH58814.1). Traços interligando a protease e o inibidor são as interações: vermelho: ligações salinas; azul: ligações de H⁺ e laranja: contatos não ligados. Os números descritos entre as ligações referem-se ao número de cada tipo de ligação. No total 30 resíduos da protease interagem com 26 resíduos do inibidor.

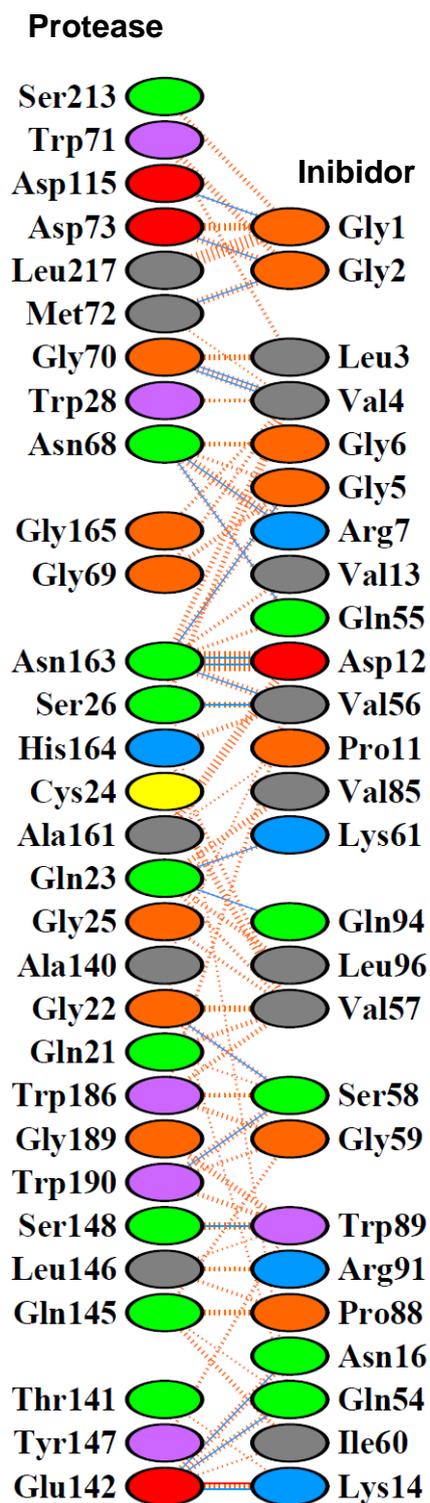


Figura 24 - Resíduos de aminoácidos que interagem entre a protease cisteínica de *T. castaneum* e o inibidor de cisteino protease de *G. max* do modelo gerado. Resíduos de aminoácidos que interagem ente protease e inibidor. Traços interligando os resíduos entre a protease e o inibidor são as interações: vermelho: ligações salinas; azul: ligações de H⁺ e laranja: contatos não ligados. Este como em maior quantidade é graduado pela largura da linha tracejada (cor laranja). Quanto maior a linha tracejada, maior o número de contatos atômicos.

Tabela 9 – Dados comparativos entre o modelo gerado da protease cisteínica de *T. castaneum* e o inibidor de cisteína protease de *G. max* com o modelo de controle positivo depositado no PDB. Dados estatísticos sumarizados da figura 23 e a análise de (ΔG) e (K_d).

Cadeia	Resíduos na Interface	Área da Interface (Å ²)	Pontes Salina	Pontes de H ⁺	Contatos não ligados	(ΔG)	(K_d) M
A	30	1221	1	20	202	-15,3	5.5e-12
B	26	1332					
1stf (A)	21	814	0	6	104	-13,4	1.5e-10
B	15	966					

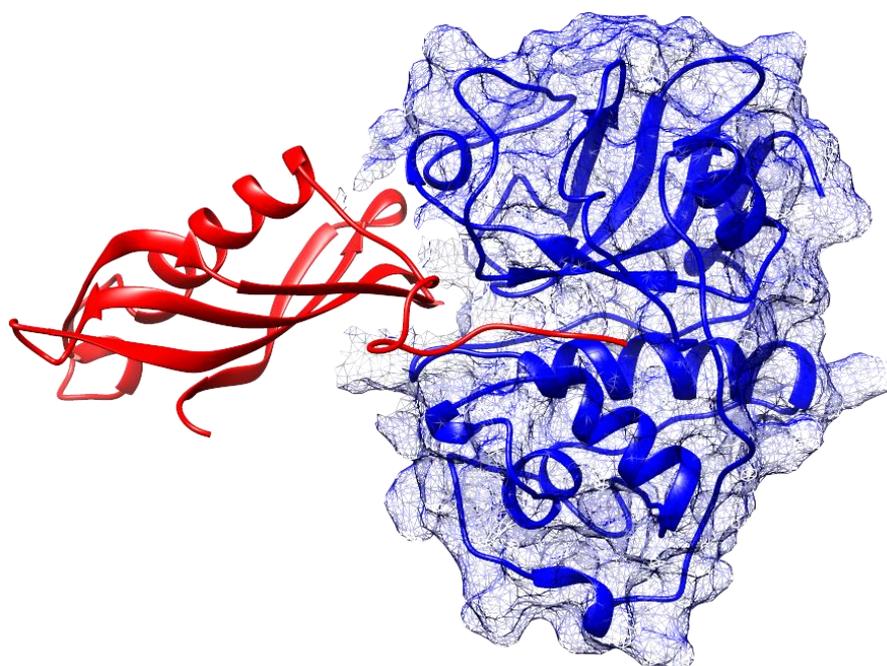
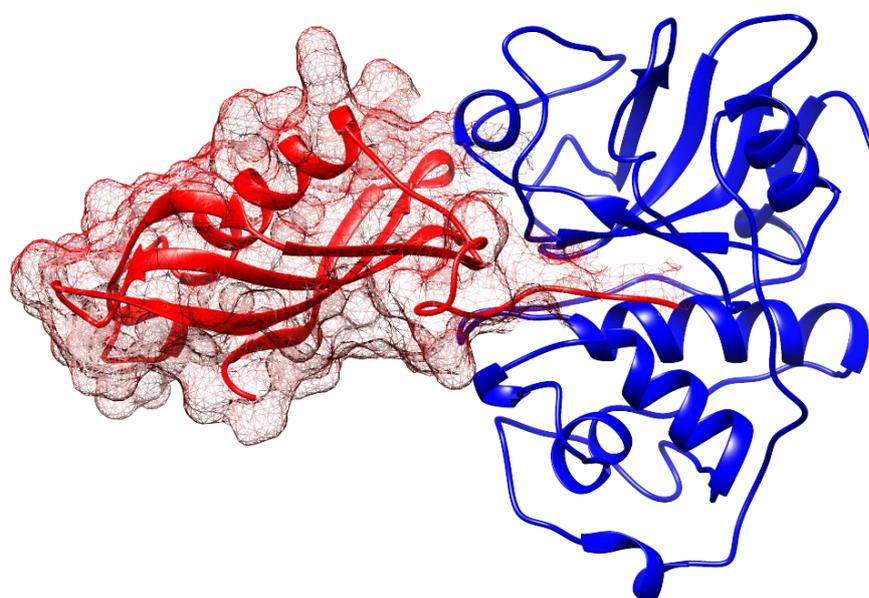
A**B**

Figura 25 - Modelo de interação, *in silico*, entre a protease cisteínica de *Tribolium castaneum* (NP_001164001.1) (cathepsin L-like) e o inibidor de protease cisteínica (KRH58814.1) (cistatina) de *Glycine max* (A e B). (A) Em vermelho: cistatina de *G. max* com sua estrutura em α -hélice e 5 folhas β antiparalelas e a projeção no N-terminal. Em azul: o modelo construído da protease cisteínica (cathepsina L) de *T. castaneum*. Na superfície da protease cisteínica de *T. castaneum* está a delimitação das ligações eletrostáticas. (B) Na superfície do inibidor de *G. max* está a delimitação das ligações eletrostáticas.

Os resultados das análises e modelo do docking entre a protease serínica (EFA01278) de *T. castaneum* e o inibidor de serino protease de *G. max* (NP_001238611.2) estão mostrados nas figuras 26, 27 e 28 e na tabela 10. Os resultados mostram que 41 resíduos de aminoácidos da protease interagem com pelo menos 21 resíduos de aminoácidos do inibidor (Figs. 26 e 27). Essas interações são através de 1 ponte salina (vermelho), 14 ligações de hidrogênios (azul) e outros 263 contatos não ligados (laranja). A variação de energia livre com valor negativo ($\Delta G = -14,5$) indica a espontaneidade da formação do complexo (Tab. 10).

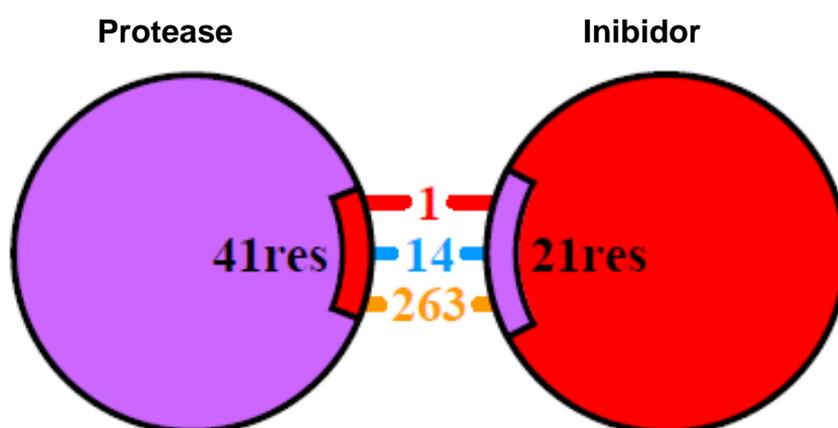


Figura 26 – Diagrama mostrando o número de resíduos, o tipo de ligações e a área de superfície de cada proteína. Dados gerados pelas análises do modelo construído da protease serínica (EFA01278) de *T. castaneum* e o inibidor de serino protease de *G. max* (NP_001238611.2). Traços interligando a protease e o inibidor são as interações: vermelho: ligações salinas; azul: ligações de H^+ e laranja: contatos não ligados. Os números descritos entre as ligações referem-se ao número de cada tipo de ligação. No total 41 resíduos da protease interagem com 21 resíduos do inibidor.

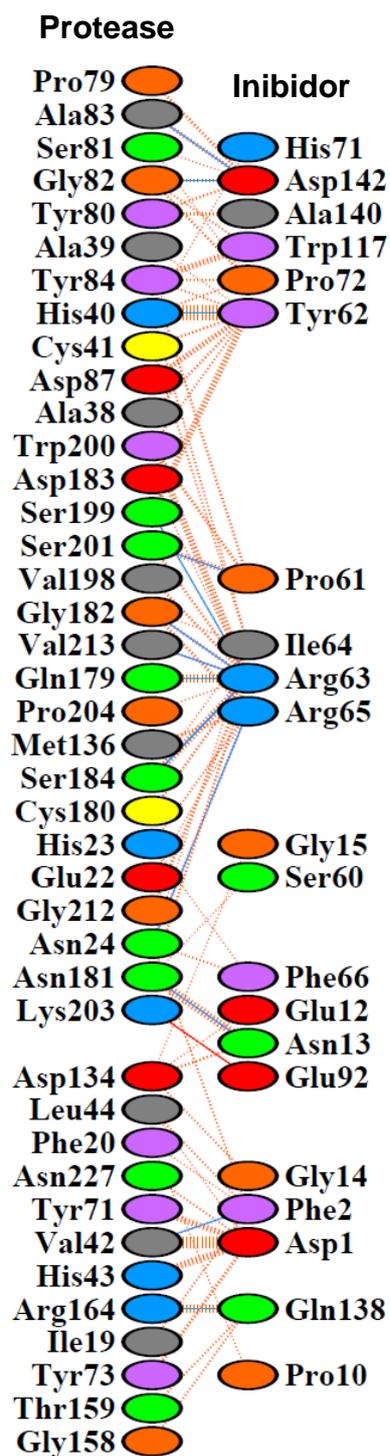
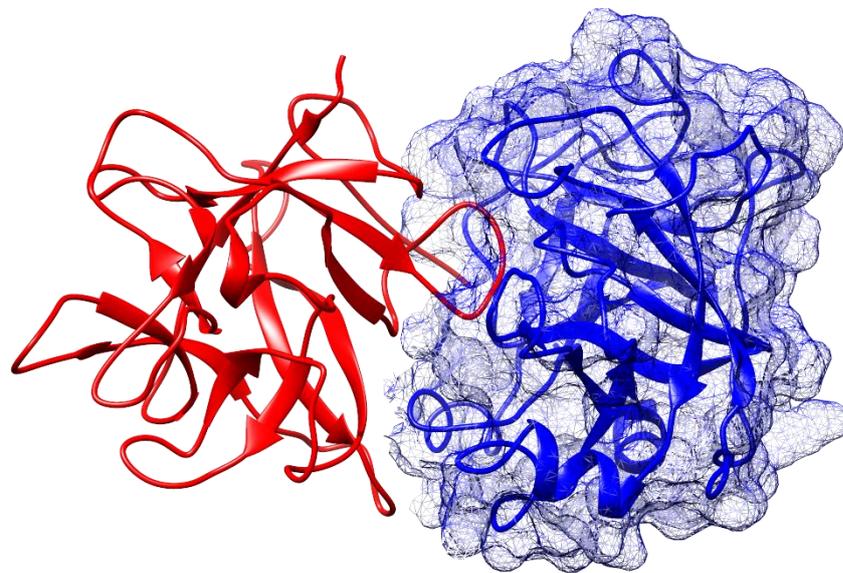


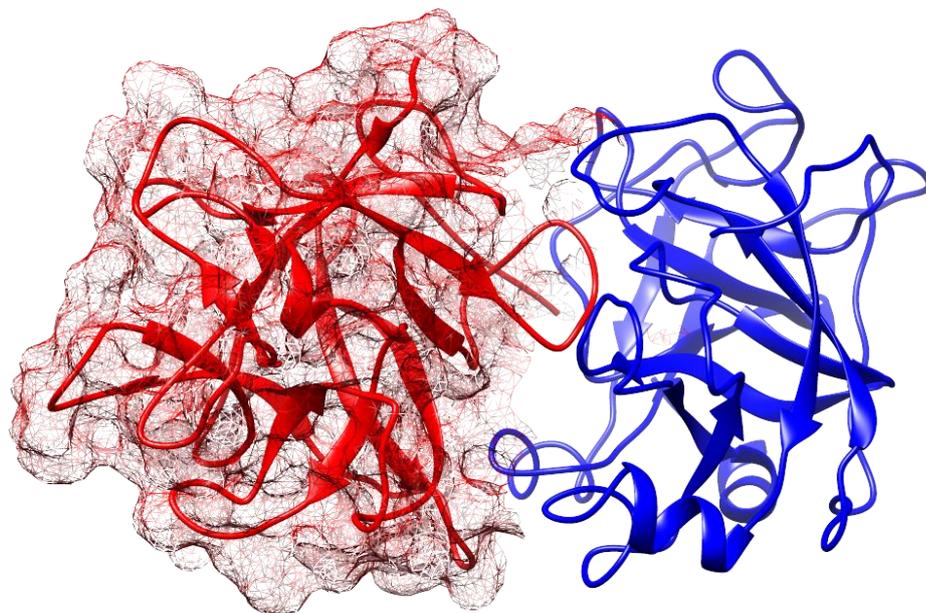
Figura 27 – Resíduos de aminoácidos que interagem entre a protease cisteínica de *T. castaneum* e o inibidor de cisteíno protease de *G. max* do modelo gerado. Resíduos de aminoácidos que interagem entre protease e inibidor. Traços interligando os resíduos entre a protease e o inibidor são as interações: vermelho: ligações salinas; azul: ligações de H⁺ e laranja: contatos não ligados. Este como em maior quantidade é graduado pela largura da linha tracejada (cor laranja). Quanto maior a linha tracejada, maior o número de contatos atômicos.

Tabela 10 – Dados comparativos entre o modelo gerado da protease serínica de *T. castaneum* e o inibidor de serino protease de *G. max* com o modelo de controle positivo depositado no PDB. Dados estatísticos sumarizados da figura 26 e a análise de (ΔG) e (K_d).

Cadeia	Resíduos na Interface	Área da Interface (Å ²)	Pontes Salina	Pontes de H ⁺	Contatos não ligados	(ΔG)	(K_d) M
A	41	1171	1	14	263	-14,5	2.3e-11
B	21	1531					
1avw (A)	24	804	0	14	135	-12,8	4.1e-10
B	14	937					



A



B

Figura 28 – Modelos de interação, *in silico*, entre a protease serínica (serino protease P41) de *Tribolium castaneum* e o inibidor de serino protease (Kunitz) de *Glycine max* (A e B). Em vermelho: Kunitz de *G. max* com sua estrutura em folhas β antiparalelas e sua alça canônica. Em azul: o modelo construído da protease serínica (serino protease P41) de *T. castaneum*. Na superfície da protease cisteínica de *T. castaneum* está a delimitação das ligações eletrostáticas. (B) Na superfície do inibidor de *G. max* está a delimitação das ligações eletrostáticas.

5.0 – Discussão

A soja, *Glycine max*, é uma das culturas mais importantes como fonte de óleos e proteínas destinados ao consumo humano e animal. Além de sua importância econômica, *G. max*, é amplamente utilizada como fonte de metabólitos secundários e inibidores de proteases (PIs) destinados ao controle natural de insetos praga (Migliolo, 2008). Em *G. max*, as principais famílias de PIs encontradas são Bowman-Birk (BBTI), Kunitz (KTI) e fitocistatinas que são exploradas como inibidores das principais proteases digestivas de insetos (Maranna *et al.*, 2016).

Tribolium castaneum, *Tenebrio molitor* e *Callosobruchus maculatus* são insetos praga causadores de grandes perdas econômicas principalmente, durante o processo de armazenamento de sementes e de seus subprodutos. *T. castaneum* e *T. molitor* são consideradas pragas secundárias, alimentando-se de farinhas e farelos e não atacam diretamente as sementes (Lorini, 2002; Altincicek *et al.*, 2007). Já *C. maculatus* é considerado uma praga primária alimentando-se diretamente das sementes (Ress, 2004).

O mecanismo de controle destes insetos é amplamente realizado através de inseticidas o que tem gerado danos ao meio ambiente, à saúde e desenvolvido resistência em várias espécies de insetos. Assim, a utilização de inibidores de proteases provenientes de plantas está sendo amplamente estudado como alternativa à utilização de inseticidas através do desenvolvimento de plantas resistentes e de bioinseticidas (Sivakumar *et al.*, 2010; Jaya *et al.*, 2014).

A compreensão anatômica, fisiológica e bioquímica do sistema digestivo de insetos é essencial para o desenvolvimento de estratégias efetivas para o controle de insetos praga. Os PIs são capazes de inativar a conversão de metabólitos essenciais ocasionando deplecionamento nutricional que resulta em morte (Chapman, 2013). Vários estudos mostram que a presença de PIs na alimentação de insetos é capaz de interferir negativamente no ciclo de desenvolvimento e na expressão de proteases digestivas (Macedo *et al.*, 2002; Oppert *et al.*, 2005; El-latif, 2015). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi isolar inibidores de proteases de cotilédones de sementes de *G. max* e avaliar seus efeitos sobre as proteases digestivas dos insetos praga *T. castaneum*, *T. molitor* e *C. maculatus*.

Inicialmente, para verificarmos possíveis interferências da dieta sobre o ciclo de desenvolvimento do inseto *T. castaneum*, ovos de 0-24h, foram colocados em

contato com farinhas de trigo (*Triticum spp.*) e soja (*G. max*) e todo o ciclo de desenvolvimento do inseto *T. castaneum* foi acompanhado até o 58 DAE. As análises dos parâmetros de desenvolvimento mostraram que larvas alimentadas com farinha de cotilédones de *G. max* apresentaram redução de 21% da taxa de sobrevivência em 17 DAE, o tamanho larval foi reduzido em 50 e 60%, em 11 e 17 DAE, respectivamente, a formação de pupas e emergência dos adultos apresentaram atraso em relação as larvas alimentadas com trigo (*Triticum spp.*). Além dos parâmetros de desenvolvimento, larvas alimentadas com *G. max* tiveram as atividades das proteases digestivas serínicas reduzidas até o 13 DAE e cisteínicas durante todo o período larval.

Estudos anteriores mostraram que proteases cisteínicas são essenciais ao metabolismo digestivo de insetos perfazendo cerca de 80% da atividade do pool de proteases digestivas e que estas possuem papel protetivo/adaptativo diante de alimentações ricas em inibidores de serino proteases. Insetos como *T. castaneum*, *T. molitor* e *C. maculatus* possuem elevada expressão de proteases cisteínicas que é considerada uma resposta adaptativa ao perfil de alimentação desses insetos que é proeminentemente, de leguminosas, ricas em serino proteases (Oppert *et al.*, 2005; Prabhakar *et al.*, 2007). Richards *et al.*, (2008) mostraram que larvas de *T. castaneum* possui 25 genes e 1 pseudogene, todos codificantes para proteases cisteínicas, e que estes genes são os mais transcritos no intestino de larvas de *T. castaneum*, equivalendo a cerca de 80% da atividade das proteases digestivas.

Trabalho anterior realizado pelo nosso grupo mostrou que a composição nutricional das dietas é capaz de interferir na atividade de enzimas digestivas de larvas de *T. castaneum*, principalmente, proteases cisténicas (Fabres *et al.*, 2014).

Para verificarmos se a interferência no desenvolvimento e a redução da atividade das proteases digestivas de *T. castaneum* estavam relacionadas à presença de possíveis inibidores contidos da farinha de cotilédones de *G. max*, o extrato desta farinha foi incubado com extratos de intestinos de larvas 15 DAE e com enzimas puras papaína (cisteínica) e tripsina (serínica). O extrato da farinha de *G. max* foi capaz de inibir tanto as duas enzimas puras (papaína e tripsina) quanto ambas as classes de proteases digestivas de larvas de *T. castaneum* (cisteínica e serínica).

Como já caracterizada a presença de inibidores das classes serínicas (Bowman-Birk e Kunitz), e cisteínicas (fitocistatinas) nas sementes de *G. max* (Messina, 1999; Carlini & Grossi de Sá, 2002), foi investigada a presença de inibidores de proteases cisteínica. Para esta finalidade, usamos papaína acoplada à resina Sepharose-4B. As frações retidas com maior absorbância em 280 nm tiveram seu perfil proteico visualizado através de SDS-PAGE e as bandas mais proeminentes foram sequenciadas por espectrometria de massas. As bandas 1 e 2 apresentaram similaridade de 100% com o inibidor já caracterizado do tipo Kunitz (Kunitz, 1947a) e a banda 3 apresentou similaridade à papaína, proveniente da coluna. Após a caracterização, a fração retida, foi testada como inibidor das enzimas puras (papaína e tripsina), das proteases cisteínicas e serínicas de *T. castaneum* e das proteases cisteínicas de *T. molitor* e *C. maculatus*. Como o extrato da farinha de cotilédones de *G. max* já havia apresentado ação inibitória sobre as proteases serínicas e cisteínicas, nossa expectativa era a mesma para a fração retida obtida da coluna de afinidade e como o esperado, a fração retida foi capaz de inibir tanto as proteínas puras, papaína e tripsina, quanto as proteases digestivas (cisteínica e serínica) de larvas de *T. castaneum*, 15 DAE, e as proteases cisteínicas de *T. molitor* e *C. maculatus*.

As proteases estão envolvidas em diversos processos fisiológicos durante o desenvolvimento de insetos, podendo atuar em vias de sinalização, defesa e principalmente nos processos de digestão (Fürstenberg-Hagg *et al.*, 2013)

Ao longo dos anos, a produção de trabalhos mostrando efeitos de inibidores de proteases (PIs) contra insetos foi crescente. A superexpressão de Inibidores de tripsina em *Nicotiana attenuata* foi capaz de inibir proteases serínicas do intestino de larvas e atenuar o desenvolvimento do inseto *Manduca sexta* (Zavala *et al.*, 2008). Um inibidor de tripsina de sementes de soja reduziu o crescimento do inseto *Helicoverpa armigera* (Johnston *et al.*, 1993) e um inibidor do tipo Kunitz reduziu a massa das larvas de *Mamestra brassicae* (Chougule *et al.*, 2008). Um inibidor de tripsina de *Adenantha pavonina* afetou a massa e a sobrevivência das larvas de *Ephestia kuehniella* (Macedo *et al.*, 2010). Larvas de *Anthonomus grandis* foram drasticamente afetadas por um inibidor de proteases serínicas de sementes de *V. unguiculata* (Franco *et al.*, 2003). Aguiar *et al.*, (2006) mostraram que uma cistatina recombinante de *V. unguiculata* foi capaz de diminuir a massa e a sobrevivência de

larvas dos insetos *Acanthocelides obtectus* e *Zabrotes subfasciatus*. Todos esses trabalhos reforçam que os inibidores de proteases provenientes de plantas podem ser utilizados como ferramenta de alto potencial para o controle de pragas.

Embora os processos de coevolução entre plantas e insetos tenham permitido as plantas a desenvolver mecanismos de defesa, como a produção de PIs, os insetos também são capazes de responder a essas defesas (Habib e Fazili, 2007; Chen, 2008). Estudos mostram que os insetos são capazes de desenvolver mecanismos de resposta contra os inibidores de proteases de plantas (PIs) de varias formas: modulando a expressão de proteases digestivas, aumentando as quantidades das isoformas de proteases ou induzindo a síntese de outras proteases não-alvo (Ahnn *et al.*, 2004; Briosci *et al.*, 2007). Oppert *et al.*, (2010) mostraram que larvas de *T. castaneum* alimentadas com E-64 (inibidor sintético de protease cisteínica) reduziram a transcrição de proteases cisteínicas e aumentaram a expressão de proteases serínicas e quando foram submetidas a dietas contendo inibidores de serino proteases (STI) aumentaram a transcrição das cisteino proteases.

Como o inibidor do tipo Kunitz é descrito como um inibidor de proteases serínicas e a fração retida a qual ele estava presente mostrou atividade inibitória sobre ambas as classes proteicas (serínicas e cisteínicas), realizamos a metodologia de zimografia reversa, para verificarmos se havia uma mistura de inibidores diferentes na fração ou se o inibidor do tipo Kunitz presente na fração retida era o responsável por inibir ambas as proteases. Os resultados mostraram duas bandas com massas moleculares diferentes e atividades de inibição distintas, mostrando a presença de dois inibidores diferentes na fração retida. Embora exista inibidores do tipo Kunitz já descritos na literatura com atividade inibitória sobre ambas as classes de proteases, serínicas e cisteínicas (Heibges *et al.*, 2003), na fração isolada de soja a inibição de ambas as proteases é desempenhada por inibidores diferentes.

A crescente busca por compostos naturais provenientes de plantas tem mostrado a grande utilização de PIs com ação direta sobre as principais classes de proteases digestivas de insetos já que estas estão diretamente relacionadas a disponibilização de nutrientes. Porém, para a utilização de PIs com aplicabilidade biotecnológicas também se faz necessário a compreensão da interação entre PIs e proteínas-alvo, para o estabelecimento do melhor mecanismo de ação e se há ou

não relação espécie-específica entre inibidor e protease. Tudo isso para tornar o biocontrole um mecanismo tão atraente quanto os inseticidas químicos (Migliolo, 2008; Cândido *et al.*, 2011).

Desta forma, avaliamos o mecanismo de interação das proteases cisteínica e serínica de *T. castaneum* com os inibidores de proteases de *G. max*, respectivamente, através de modelagem por homologia e docking, *in silico*. Definimos como modelo para o entendimento das interações proteína-proteína os inibidores contidos em cotilédones de *G. max* e as proteases digestivas de *T. castaneum* e utilizamos como controle positivo estruturas já resolvidas e depositadas no bando de dados Protein Data Bank (PDB). Análises como número de interações, tipo de interações e parâmetros como ΔG e K_d foram avaliados e o modelo construído para as interações entre as proteases de *T. castaneum* e os inibidores de *G. max*, apresentaram ΔG mais negativo quando comparado aos complexos já resolvidos. Assim, mostrando que a interação entre os inibidores de *G. max* e as proteases digestivas de *T. castaneum* ocorrem de forma espontânea. Análises mais refinadas ainda serão realizadas e as proteases dos demais insetos, *T. molitor* e *C. maculatus* também serão modeladas.

Estudos de transcriptomas, proteomas, técnicas de silenciamento gênico (CRISPR/CAS9) e pós-transcricional (RNAi) estão fornecendo dados que somados ao estudos bioquímicos e fisiológicos do metabolismo digestivo de insetos auxiliam e aprofundam o entendimento da relação inseto/ambiente e proporcionam bases de dados sólidos para o desenvolvimento e a aplicabilidade de compostos naturais como os PIs com perspectiva de controle natural de insetos praga (Martynov *et al.*, 2015; Evans, 2017; Perkin *et al.*, 2017).

6.0 – Conclusão

- A farinha de cotilédones de *G. max* interferiu negativamente nos parâmetros de sobrevivência e tamanho larval, formação de pupas e emergência de adultos do inseto praga *Tribolium castaneum*;
- Larvas alimentadas com *G. max* tiveram as atividades das proteases digestivas serínicas e cisteínicas reduzidas;
- Uma fração contendo inibidores de proteases isolada de cotilédones de *G. max* foi capaz de inibir a atividade das enzimas puras papaína e tripsina e das proteases digestivas serínicas e cisteínicas de *T. castaneum* e a atividade cisteínica de *T. molitor* e *C. maculatus*;
- Bandas proteicas provenientes da fração retida da cromatografia de afinidade foram identificadas como um inibidor de proteases serínicas do tipo Kunitz;
- A visualização da atividade de inibição de proteases em gel de gelatina mostrou inibição da tripsina e papaína por bandas proteicas distintas, indicando a presença de inibidores para ambas as classes de proteases;
- Os modelos de interação (docking) entre as proteases digestivas serínicas e cisteínicas de *T. castaneum* e os inibidores das respectivas proteases de *G. max* apresentaram energia livre de Gibbs (ΔG) negativa, mostrando que as interações ocorrem de forma espontânea.

7.0 - Referências

- Abe, K.; Kondo, H.; Arai, S. (1987). Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. *Agric Biol Chem*. Vol. 51, pp. 2763-2768.
- Aguiar, J. M.; Franco, O. L.; Rigden, D. J.; Bloch, C. Jr.; Monteiro, A. C.; Flores, V. M.; Jacinto, T.; Xavier-Filho, J.; Oliveira, A. E.; Grossi-de-Sá, M. F.; Fernandes, K. V. (2006). Molecular modeling and inhibitory activity of cowpea cystatin against bean bruchid pests. *Proteins*. Vol. 15, pp.662-70.
- Ahmed, K.; Khalique, F.; Afzal, M.; Tahir, M.; Malik, B. A.; (1989). Variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.) genotypes for resistance to *Callosobruchus maculatus* F. (Bruchidae). *J Stored Prod Res*. Vol. 25, pp. 97-99.
- Ahn, J. E.; Salzman, R. A.; Braunagel, S. C.; Koiwa, H.; Zhu-Salzman, K. (2004). Functional roles of specific bruchid protease isoforms in adaptation to a soybean protease inhibitor. *Insect Biochem Mol Biol*. Vol. 13, pp.649-657.
- Alanko, K.; Tuomi, T.; Vanhanen, M.; Pajari-Backas, M.; Kanerva, L.; Havu, K.; Bruynzeel, D. P. (2000). Occupational IgE-mediated allergy to *Tribolium confusum* (confused flour beetle). *Allergy*. Vol. 55, pp. 879-882.
- Altincicek, B.; Knorr, E.; Vilcinskas, A. (2008). Beetle immunity: Identification of immune-inducible genes from the model insect *Tribolium castaneum*. *Dev Comp Immunol* Vol. 32, pp. 585-595.
- Amirhusin, B.; Shade, R. E.; Koiwa, H.; Hasegawa, P. M.; Bressan, R. A.; Murdock, L. L. Zhu-Salzman, K. (2007). Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. *J Insect Physiol*. Vol. 53, pp. 734-740.
- Arthur, F. H. (1996). Grain protectants: Current status and prospects for the future. *J. Stored prod Res*. Vol. 32, pp. 293-302.
- Bagheri-Zenouz, E. (1995). Pests of stored products and their control methods (injurious coleoptera of food and industrial products). Vol. 1. Sepehre Publishing. Tehran, p. 309.
- Bell, C. H. Fumigation in the 21st century (2000). *Crop Protection*. Vol.19, pp.563-569.

- Benton, A. M.; Kenny, N. J.; Conrads, K. H.; Roth, S. Lynch, J. A. (2016). Deep, staged transcriptomic resources for the novel coleopteran models *Atrachya menetriesi* and *Callosobruchus maculatus*. PLoS ONE. Vol. 11, e0167431.
- Bhattacharyya, A.; Leighton, S. M.; Babu, C. R. (2007). Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. Comp Biochem Physiol. Vol. 145, pp. 669-677.
- Biasini, M.; Bienert, S.; Waterhouse, A.; Arnold, K.; Studer, G.; Schmidt, T.; Kiefer, F.; Cassarino, T.G.; Bertoni, M.; Bordoli, L.; Schwede, T. (2014). SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. Nucleic Acids Res. Vol. 42, pp. 252-258.
- Birk, Y., (1985) The Bowman–Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans. Int J Pept Protein Res. Vol. 25, pp. 113–131.
- Birk, Y.; Gertler, A.; Khalef, S. (1963). A pure trypsin inhibitor from soya beans. Biochem J. Vol. 87, pp. 281-284.
- Blanco-Labra, A.; Martinez-Gallardo, N. A.; Sandoval-Cardoso, L.; Delano-Frier, J. (1996). Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* larvae (Herbst). Insect Biochem Mol Biol. Vol. 26, pp. 95-100.
- Bode, W. & Hube, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. Eur J Biochem. Vol. 204, pp. 433-451.
- Brent, K. J. & Hollomon, D. W. (1998). Fungicide resistance: the assessment of risk. Monograph no. 2. Frac Global Crop Protection Federation, Brussels.
- Brier, H. (2007). “Pulses-summer (including peanuts),” in Pests of Field Crops and Pastures: Identification and Control, ed. T. P. Bailey (Oxford: CSIRO Publishing), pp. 214–216.
- Brioschi, D.; Nadalini, L. D.; Bengtson, M. H.; Sogayar, M. C.; Moura, D. S.; Silva-Filho, M. C. (2007). General up regulation of *Spodoptera frugiperda* trypsins and chymotrypsins allow its adaptation to soybean proteinase inhibitor. Insect Biochem Mol Biol. Vol. 37, pp.1283-1290.

- Broehan, G.; Arakane, Y.; Beeman, W. R.; Kramer, J. K.; Muthukrishnan, S.; Merzendorfer, H. (2010). A role in molting revealed by RNA interference. *Insect Biochem Mol Biol.* Vol. 40, pp. 274-283.
- Cândido, S. E.; Pinto, S. F. M.; Pelegrini, B. P.; Lima, B. T.; Silva, N. O.; Pogue, R.; Grossi-de-Sá, F. M.; Franco, L. O. (2011). Plant storage proteins with antimicrobial activity: novel insights into plant defense mechanisms. *FASEB J.* Vol. 25, pp. 3290-3302.
- Cao, R.; Bhattacharya, D.; Hou, J.; Cheng, J. (2016). DeepQA: improving the estimation of single protein model quality with deep belief networks. *BMC Bioinformatics.* Vol.17, p.495.
- Cao, R.; Cheng, J. (2016). Protein single-model quality assessment by feature-based probability density functions. *Sci Rep.* Vol.6, p. 23990.
- Carlini, C. R. & Grossi de Sa, M. F. (2002). Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. *Toxicon.* Vol. 40, pp. 1515-1539.
- Castagnola, A. & Jurat-Fuentes, J. L. (2016). Intestinal regeneration as an insect resistance mechanism to entomopathogenic bacteria. *Curr Opin Insect Sci.* Vol. 15, pp. 104-110.
- Chapman, R. F. (2013). *The insects: structure and function.* 5ª Edição. Cambridge University Press, New York. ISBN 978-0-521-11389-2.
- Chen, M. S. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores. *J Insect Sci.* Vol. 15, pp.101-114.
- Chen, Z.; Schlipalius, D.; Opit, G.; Subramanyam, B.; Phillips, T. W. (2015). Diagnostic Molecular Markers for Phosphine Resistance in U.S. Populations of *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica*. *PLoS ONE.* Vol. 10, e0121343.
- Chi, Y. H.; Salzman, R. A.; Balfes, S.; Ahn, J-E.; Sun, W.; Moon, J.; Yun, D-J.; Lee, S. Y.; Higgins, T. J. V.; Pittendrigh, B.; Murdock, L. L.; Zhu-Salzman, K. (2009). Cowpea bruchid midgut transcriptome response to a soybean cystatin – costs and benefits of counter-defence. *Insect Mol Biol.* Vol. 18, pp. 97-110.
- Chougule, N.P.; Doyle, E.; Fitches, E.; Gatehouse, J.A. (2008). Biochemical characterization of midgut digestive proteases from *Mamestra brassicae*

(cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assay. *Journal of Insect Physiology*. Vol. 54, pp.563–572.

Comeau, S.R.; Gatchell, D. W.; Vajda, S., Camacho, C. J. (2004). ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*. Vol. 20, pp. 45-50.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento (2017). Acompanhamento de Safra Brasileira de Grãos. Brasília. n.6, Sexto levantamento, mar. 2017. Vol. 4. Safra 2016/2017.

Cosimi, S.; Rossi, E.; Cioni, P. L.; Canale, A. (2009). Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pests: Evaluation of repellency against *Sitophilus zeamais* Motschulsky, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Tenebrio molitor* (L.). *J Stored Prod Res*. Vol. 45, pp. 125-132.

Cotton, R. T. 1956. *Pests of Stored Grain and Grain Products*. Burgess Publishing, Minneapolis, MN.

Cristofolletti, P. T.; Ribeiro, A. F.; Terra, W. R. (2005). The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: Sequence. Properties, immunocytochemical localization and function. *Insect Biochem. Mol Biol*. Vol. 35, pp. 883-901.

Cruz, L. P.; De Sa, L. F. R.; Santos, L. A., Gravina, G. A.; Carvalho, A. O.; Fernandes, K.V.S.; Freire-Filho, F.R.; Gomes, V.M.; Oliveira, A.E.A. (2016). Evaluation of resistance in different cowpea cultivars to *Callosobruchus maculatus* infestation. *J Pest Sci*. Vol. 89, pp. 117–128.

Danga, S. P. Y.; Nukenine, E. N.; Yonoussa, L.; Alder, C.; Esimone, C. O. (2015). Efficacy of *Plectranthus glandulosus* (Lamiaceae) and *Callistemon rigidus* (Myrtaceae) leaf extract fractions to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *J Insect Sci*. Vol. 12, p. 139.

Délano-Frier J. P.; Castro-Guillén J. L.; Blanco-Labra, A. (2008). Recent findings on the multifaceted functionality of enzyme inhibition by natural compounds: A review. *Curr Enzym Inhib*. Vol. 4, pp. 121–152.

Demartini, D. R.; Wlodaver, A.; Carlini, C. R. (2007). A comparative study of the expression of serine proteinases in quiescent seeds and in developing *Canavalia ensiformis* plants. *J Exp Bot*. Vol. 58, pp. 521–532.

- Devi, M. B. & Devi, N. V. (2014). Biology and morphometric measurement of cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* Fab. (Coleoptera: Chrysomelidae) in green gram. *J Entomol Zool Stud.* Vol. 2, pp. 74–76.
- Dhaliwal, G. S.; Ram, S.; Chhillar, B. S. (2006). Store grain pest. Issue in *Essentials of Agricultural Entomology*.
- Dobson, A. J.; Johnston, P. R.; Vilcinskas, A.; Rolff, J. (2012). Identification of immunological expressed sequence tags in the mealworm beetle *Tenebrio molitor*. *J Insect Physiol.* Vol. 58, pp. 1556-1561.
- Dongre, T. K.; Pawar, S. E.; Harmalkar, M. R. (1993). Resistance to *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) and other *Cajanus* species. *J Stored Prod Res.* Vol. 29, pp. 319-322.
- Dunse, K. M.; Kaas, Q.; Guarino, R. F.; Barton, P. A.; Craik, D. J. Anderson, M. A. (2010). Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor. *Pro. Natl Acad Sci. U. S. A.* Vol 107, pp. 15016-15021.
- Eisenberg, D.; Lüthy, R.; Bowie, J. U. (1997). VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. *Methods Enzymol.* Vol. 277, pp. 396-404.
- El-latif, A. O. A. (2015). Isolation and purification of a papain inhibitor from Egyptian genotypes of barley seeds and its in vitro and in vivo effects on the cowpea bruchid, *Callosobruchus maculatus* (F.). *Pestic Biochem Physiol.* Vol. 118, pp. 26-32.
- Evans, T. A. (2017). CRISPR-based gene replacement reveals evolutionarily conserved axon guidance functions of *Drosophila* Robo3 and *Tribolium* Robo2/3. *EvoDevo.* Vol. 8, pp. 1-10.
- Fabres, A.; Campos Macedo Da Silva, J.; Fernandes, K. V. S.; Xavier –Filho, José; REZENDE, Gustavo Lazzaro; OLIVEIRA, Antonia Elenir Amancio (2014). Comparative performance of the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) on different plant diets. *J Pest Sci,* Vol. 87, pp. 495-506.
- Feliciello, I.; Akrap, I.; Ugarković, Đ. (2015). Satellite DNA Modulates Gene Expression in the Beetle *Tribolium castaneum* after Heat Stress. *PLoS Genet.* Vol. 11, e1005466.

- Franco, O.L.; Santos, R.C.; Batista, J.A.N.; Mendes, A.C.M.; Araujo, M.A.M.; Monnerat, R.G.; Grossi-de-As, M.F.; Freitas, S.M. (2003). Effects of black-eyed pea trypsin/ chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. *Phytochemistry*. Vol. 63, pp.343-349.
- Fürstenberg-Hagg, J.; Zagrobelny, M.; Bak, S. (2013). Plant defense against insect herbivores. *Internacional Journal of Molecular Sciences*. Vol. 14(5), pp.10242-10297.
- Gazara, R. K.; Cardoso, C.; Bellieny-Rabelo, D.; Ferreira, C.; Terra, W. R.; Venância, T. M. (2017). *De novo* transcriptome sequencing and comparative analysis of midgut tissues of four non-model insects pertaining to Hemiptera, Coleoptera, Diptera and Lepidoptera. *Gene*. Vol. 627, pp. 85-93.
- Gbay, O. A.; Holloway, G. J. (2011). Varietal effects of cowpea, *Vigna unguiculata*, on tolerance to malathion in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *J Stored Prod Res*. Vol. 47, pp. 8-12.
- Gomes, C. E. M.; Barbosa, E. A. D.; Macedo, L. I. P.; Pitanga, J. C. M.; Moura, F. T.; Oliveira, A. S.; Moura, R. M.; Queiros, A. F. S.; Macedo, F. P.; Andrade, L. B. S.; Vidal, M. S.; Sales, M. P. effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). *Plant Physiol Biochem*. Vol. 46, pp. 1095-1102.
- Gomez, A.; Cardoso, C.; Genta, F. A.; Terra, W. R.; Ferreira, C. (2013). Active site characterization and molecular cloning of *Tenebrio molitor* midgut trehalase and comments on their insect homologs. *Insect Biochem Mol Biol*. Vol. 43, pp. 768-780.
- Goptar, I.; Semashko, T.; Danilenko, S.; Lysogorskaya, E.; Oksenoit, E.; Zhuzhikov, D.; Belozersky, M.; Dunaevsky, Y.; Oppert, B.; Filippova, I. Y. (2012). Cysteine digestive peptidases function as post-glutamine cleaving enzymes in tenebrionid stored-products pests. *Comp Biochem Physiol Part B*. Vol. 161, pp. 148-154.
- Grütter, M. G.; Fendrich, G.; Huber, R.; Bode, W. (1998). *EMBO J*. Vol. 7, pp. 345-351.
- Guedes, R. N. C.; Guedes, N. M. P.; Smith, R. H. (2007). Larval competition within seeds: from the behavior process to the ecological outcome in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *Aust Ecol*. Vol. 32, pp. 697–707.

- Habib, H.; Fazili, K. M. (2007). Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. *Am J Mol Biol*. Vol. 2 (3), pp. 068-085.
- Harrigan, G. G.; Culler, A. H.; Culler, M.; Breese, M. L.; Berman, K. H.; Halls, S. C. e Harrison, J. M. (2013). Investigation of Biochemical diversity in a soybean lineage representing 35 years of breeding. *J Agric Food Chem*. Vol. 61, pp. 10807-10815.
- Hegedus, D.; Erlandson, M.; Gillott, C.; Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annu Rev Entomol*. Vol. 54, pp. 285-302.
- Heibges, A., Salamini, F.; Gebhardt, C. (2003). Functional comparison of homologous membranes of three groups of Kinitz-type enzyme inhibitors from potato tuber (*Solanun tuberosum* L.). *Mol Genet Genomics*. Vol. 269, pp.535-541.
- Howe, R. W. (1956). The effect of temperature and humidity on the rate of development and mortality of *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera, Tenebrionidae). *Ann Appl Biol*. Vol. 44, pp. 356–368.
- Hymowitz, T. (1970). On the domestication of the soybean. *Econ Bot*. Vol. 24, pp. 408-421.
- Isman, M. B. (1996). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annu Rev Entomol*. Vol. 51, pp. 45-66.
- Jackai, L. & Adalla, C. B. (1997). Pest management practices in cowpea: a review. In: Singh BB, Mohan Raj DR, Dashiell KE, Jackai LEN (eds) *Advances in cowpea research*. IITA/JIRCAS, Ibadan, Nigeria, pp. 240–258.
- Jacobs, C. G. C.; Gallagher, J. D.; Evison, S. E. F.; Heckel, D. G.; Vilcinskis, A.; Vogel, H. (2017). Endogenous egg immune defenses in the yellow mealworm beetle (*Tenebrio molitor*). *Dev Comp Immunol*. Vol. 70, pp.1-8.
- Jaya, S. P.; Prakash, B.; Dubey, N. K. (2014). Insecticidal activity of *Ageratum conyzoides* L., *Coleus aromaticus* Benth. and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit essential oils as fumigant against storage grain insect *Tribolium castaneum* Herbst. *J Food Sci Technol*. Vol. 51, pp. 2210–2215.

- Johnston, P. R.; Makarova, O.; Rolff, J. (2014). Inducible defenses stay up late: temporal patterns of immune gene expression in *Tenebrio molitor*. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, Vol. 4, pp. 947–955.
- Källberg, M.; Wang, H.; Wang, S.; Peng, J.; Wang, Z.; Lu, H.; Xu, J. (2012). Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat Protoc*. Vol.7, pp. 1511-22.
- Karunakaran, C.; Jayas, D. S.; White, N. D. G. (2004). Identification of wheat kernels damaged by the red flour beetle using X-ray image. *Biosys. Engin*. Vol. 87, pp. 267-274.
- Kim, M-J.; Kim, J. K.; Kim, H. J; Pak, J. H.. Lee, J-H.; Kim, D-H.; et al. (2012). Genetic modification of the soybean to enhance the β -carotene content through seed-specific expression. *PLoS ONE*. Vol. 7, e48287.
- Koiwa, H.; Shade, R. E.; Zhu-Salzman, K.; Subramanian, L.; Murdock, L. L.; Nielsen, S. S.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. (1998). Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. *Plant Journal* 14, 371–379.
- Krauchenco, S.; Pando, S. C.; Marangoni, S.; Polikarpov, I. (2003). Crystal structure of the Kunitz (STI)-Type inhibitor from *Delonix regia* seeds. Vol. 312, pp. 1303-1308.
- Kuar, K.; Kansal, R.; Mirsha, A.; Koundal, K.R. and Gupta, V.K. (2012). Cloning, characterization and expression analysis of a novel gene encoding Kunitz-type protease inhibitor from *Dolichos biflorus*. 3 . *Biotech*. Vol. 2, pp.199–209.
- Kunitz M, Northrop JH (1936) Isolation from beef pancreas of crystalline trypsinogen, trypsin, a trypsin inhibitor, and an inhibitor-trypsin compound. *The J Gen Physiol*. Vol. 9, pp. 991–1007.
- Kunitz, M. (1947a). Crystalline soybean trypsin inhibitor. *J Gen Physiol*. Vol. 30, pp. 291-310.
- Kunitz, M. (1947b). Isolation of a crystalline protein compound of trypsin and soybean trypsin inhibitor. *J Gen Physiol*. Vol. 30, pp. 311-320.
- Laemmli UK, 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 . *Nature*. Vol. 227, pp. 680 – 685.

- Laskowski, R. A.; Jablonska, J.; Pravda, L.; Vareková, R. S.; Thornton, J. M. (2018). PDBsum: Structural summaries of PDB entries. *Protein Sci.* Vol. 2, pp. 129-134.
- Leber, T.M.; Balkwill, F.R. (1997) Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. *Analytical biochemistry.* Vol. 249, pp. 24-28.
- Lee, A. K.; Sze, C. C.; Kim, E. R.; Suzuki, Y. (2013). Developmental coupling of larval and adult stages in a complex life cycle: insights from limb regeneration in the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *EvoDevo.* Vol. 4, p. 20.
- Liang, J-Y.; Wang, W-T.; Zheng, Y-F.; Zhang, D.; Wang, J-L.; Guo, S-S.; Zhang, W-J.; Du, S-S.; Zhang, J. (2017). Bioactivities and chemical constituents of essential oil extracted from *Artemisia anethoides* against two stored product insects. *J. Oleo Sci.* Vol. 66, pp. 71-76.
- Li-Byarlay, H.; Pittendrigh, B. R.; Murdock, L. L. (2016). Plant defense inhibitors affect the structures of midgut cells in *Drosophila melanogaster* and *Callosobruchus maculatus*. *Int J Trop Insect Sci.* Vol. 8, pp. 71-79.
- Liu, L-N. & Wang, C-Y. (2014). Complete mitochondrial genome of yellow meal worm (*Tenebrio molitor*). *Zoological Research.* Vol. 35, pp. 537-545.
- Lorenzen, M. D.; Kimzey, T.; Shippy, T. D.; Brown, S. J.; Dannel, R. E. & Beeman, R. W. (2007). piggyBac-based insertional mutagenesis in *Tribolium castaneum* using donor/helper hybrids. *Insect Mol Biol* Vol. 16, pp. 265-275.
- Lorini, I.; Lincon, H. M.; Vildes, M. S. (2002). Armazenamento de Grãos. IBG, Campinas, SP.
- Lovell, S. C.; Davis, I. W.; A, W. B.; Iii, De Bakker P. I. W.; Word, J. M.; Prisant, M. G.; Richardson, J. S.; Richardson, D. C. (2003). Structure validation by C alpha geometry: phi,psi and C beta deviation. *Proteins.* Vol. 50, pp. 437–450.
- Lu, X. F.; Xia, Y. X.; Pei, Y. (1998). Roles of plant proteinase inhibitors in the resistance of plant against insects and pathogens. *Arch Biochem Biophys.* Vol. 25, pp. 328-333.
- Ludwig, D. & Fiore, C. (1960). Further studies on the relationship between parental age and the life cycle of the mealworm, *Tenebrio molitor*. *Ann Entomol Soc Am.* Vol. 53, pp. 595–600.

- Lyskov, S.; Gray, J. J. (2008). The RosettaDock server for local protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* Vol. 36, pp 233-238.
- Macedo, M. L. R.; Oliveira, C. F. R.; Costa, P. M.; castelhano, E. C.; Silva-Filho, M. C. (2015). Adaptative mechanisms of insect pests against plant protease inhibitors and future prospects related to crop protection: a review. *Protein Pept Lett.* Vol. 22, pp. 149-163.
- Macedo, M.L.; Durigan, R.A.; da Silva, D.S.; Marangoni, S.; Freire, M.G.; Parra, J.R. (2010). *Adenantha pavonina* trypsin inhibitor retard growth of *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). *Arch Insect Biochem Physiol.* Vol. 73, pp.213-231.
- Machado, R. J. A.; Monteiro, N. K. V.; Migliolo, L.; Silva, O.N.; Pinto, M.F.S. et al. (2013) Characterization and pharmacological properties of a novel multifunctional Kunitz inhibitor from *Erythrina velutina* Seeds. *PLoS ONE* Vol. 8, e63571.
- Malhotra, S.; Mathew, O. K.; Sowdhamini, R. (2015). DOCKSCORE: a webserver for ranking protein-protein docked poses. *BMC Bioinformatics.* Vol.16, p.127.
- Manavalan, B.; Lee, J. (2017). SVMQA: support-vector-machine-based protein single-model quality assessment. *Bioinformatics.* Vol. 33, pp. 2496-2503.
- Maranna, S.; Verma, K.; Talukdar, A.; Lal, S. K.; Kumar, A.; Mukherjee, K. (2016). Introgression of null allele of Kunitz trypsin inhibitor through marker-assisted backcross breeding in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *BMC Genetics.* Vol. 17, p. 106.
- Martynov, H.; Elpidina, E. N.; Perkin, I.; Oppert, B. (2015). Functional analysis of C1 family cysteine peptidases in the larval gut of *Tenebrio molitor* and *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics.* Vol. 16, p. 75.
- McGonigle, J. E.; Purves, J.; Rolff, J. (2016). Intracellular survival of *Staphylococcus aureus* during persistent infection in the insect *Tenebrio molitor*. *Dev Comp Immunol.* Vol. 59, pp. 34-38.
- Messina, M. J. (1999). Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr.* Vol. 70, pp. 439-450.
- Michaud, D.; Nguyen-Quoc, B.; Vrain, T. C.; Fong, D.; Yelle, S. (1996). Response of digestive cysteine proteinases from the colorado potato beetle (*Leptinotarsa*

decemlineata) and the black vine weevil (*Otiorynchus sulcatus*) to a recombinant form of human stefin A. *Comp Biochem Physiol.* Vol. 31, pp. 451–464.

Migliolo, L. (2008). Construção de modelos de interação in silico e in vivo do inibidor do tipo Kunitz de *Adenathera pavonina* L. para as enzimas cisteínicas e serínicas. Natal, RN: UFRN. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

Miller, S. C.; Miyata, K.; Brown, S. J.; Tomoyasu, Y. (2012). Dissecting Systemic RNA Interference in the Red Flour Beetle *Tribolium castaneum*: Parameters Affecting the Efficiency of RNAi. *PLoS ONE.* Vol. 7, e47431.

Misaka, T.; Kuroda, M.; Iwabuchi, K.; Abe, K.; Arai, S. (1996) Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. *Eur J Biochem.* Vol. 240, pp. 614-690.

Moal, I. H.; Jiménez-García, B.; Fernández-Recio, J. (2015). CCharPPI web server: computational characterization of protein-protein interactions from structure. *Bioinformatics.* Vol. 31, pp.123-125.

Moreira, I. S.; Koukos, P. I.; Melo, R.; Almeida, J. G.; Preto, A. J.; Schaarschmidt, J.; Trellet, M.; Gümüş, Z. H.; Costa, J.; Bonvin, A. M. J. J. (2017). SpotOn: High Accuracy Identification of Protein-Protein Interface Hot-Spots. *Sci Rep.* Vol.7, p. 8007.

Morris, K.; Lorenzen, M. D.; Hiromasa, Y.; Tomich, J. M.; Oppert, C.; Elpidina, E. N.; Vinokurov, K.; Jurat-Fuentes, J. L.; Fabrick, J.; Oppert, B. (2009). *Tribolium castaneum* larval gut transcriptome and proteome: a resource for the study of the coleopteran gut. *J Proteome Res.* Vol. 8, pp.3889–3898.

Nattudurai, G.; Paulraj, G.; Ignacimuthu, S. (2012). Fumigant toxicity of volatile synthetic compounds and natural oils against red flour beetle. *Journal of King Saud University – Science.* Vol.24, pp.153–159.

Nayak, M. K.; Holloway, J. C.; Emery, R. N.; Pavic, H.; Bartlet, J.; Collins, P. J. (2013). Strong resistance to phosphine in the rusty grain beetle, *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) (Coleoptera: Laemophoeidae): its characterization, a rapid assay for diagnosis and its distribution in Australia. *Pest Manage Sci.* Vol. 69, pp. 48-53.

- Nogueira, F. C. S.; Silva, C. P., Alexandre, D.; Samuels, R. I.; Soares, E. L.; Aragão, F. J. L.; Palmisano, G.; Domont, G. B.; Roepstorff, P.; Campos, A. P. (2012). Global proteome changes in larvae of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) following ingestion of cysteine proteinase inhibitor. *Proteomics*, Vol. 12, pp. 2704-2715.
- Oke, O. A. & Akintunde, E. M. (2013). Reduction of the nutritional values of cowpea infested with *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: bruchidae). *Int J Agri Sci*. Vol. 3, pp. 30–36.
- Olechnovic, K.; Venclovas, C. (2017). VoroMQA: Assessment of protein structure quality using interatomic contact areas. *Proteins*. Vol. 85, pp. 1131-1145.
- Oliveira, A. S.; Xavier-Filho, J.; Sales, M. P. (2003). Cysteine proteinases and cystatins. *Braz arch biol technol*. Vol. 46, pp. 91-104.
- Opit, G. P.; Phillips, T. W.; Aikins, M. J.; Hansan, M. M. (2012). Phosphine resistance in *Tribolium castaneum* and *Rhyzopertha dominica* from Stored Wheat in Oklahoma. *J Econ Entomol*. Vol. 105, pp. 1107-1114.
- Oppert, B.; Dowd, S. E.; Bouffard, P.; Li, L.; Conesa, A.; Lorenzen, M. D.; Toutges, M.; Marshall, J.; Huestis, D. L.; Fabrick, J.; Oppert, C.; Jurat-Fuentes, J. L.; Palli, S. R. (2012). Transcriptome profiling of the intoxication response of *Tenebrio molitor* larvae to *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin. *PLoS One*. Vol. 7, e34624.
- Oppert, B.; Elpidina, E. N.; Toutges, M.; Mazumdar-Leighton, S. (2010). Microarray analysis reveals strategies of *Tribolium castaneum* larvae to compensate for cysteine and serine protease inhibitors. *Comp Biochem Physiol*. Vol. 5, pp. 280-287.
- Oppert, B.; Guedes, R. N.; Aikins, M. J. et al. (2015). Genes related to mitochondrial functions are differentially expressed in phosphine-resistant and -susceptible *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics*. Vol. 16, p. 968.
- Oppert, B.; Perkin, L.; Martynov, A.; Elpidina, E. N. (2017). Cross-species comparison of the gut: Differential gene expression sheds light on biological differences in closely related tenebrionids. *J Insect Physiol*. In Press.
- Oppert, B.; Morgan, T. D.; Hartzler, K.; Kramer, K. J. (2005). Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp Biochem Physiol*. Vol. 140, pp. 53-58.

- Pandey, A. K.; Palni, U. T.; Tripathi, N. N. (2014). Repellent activity of some essential oils against two stored product beetles *Callosobruchus chinensis* L. and *C. maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae) with reference to *Chenopodium ambrosioides* L. oil for the safety of pigeon pea seeds. *J Food Sci Technol*. Vol. 52, pp. 4066-4071.
- Park, S.H.; Jiang, R.; Piao, S.; Zhang, B.; Kim, E.H.; Kwon, H.M.; Jin, X.L.; Lee, B.L.; Ha, N.C. (2011). Structural and functional characterization of a highly specific serpin in the insect innate immunity. *J Biol Chem*. Vol. 286, pp. 1567–1575.
- Pedra, J. H. F.; Brandt, A.; Westerman, R.; Lobo, N.; Li, H-M.; Severson-Romero; Murdock, L. L.; Pittendrigh, B. R. (2003). Transcriptome analysis of the cowpea weevil bruchid: identification of putative proteinases and α -amylases associated with food breakdown. *Insect Mol Biol*. Vol. 12, pp. 405-412.
- Pedrini, N.; Ortiz-Urquiza, A.; Huarte-Bonnet, C.; Fan, Y.; Juárez, M. P.; Keyhani, N. O. (2015). Tenebrionid secretions and a fungal benzoquinone oxidoreductase form competing components of an arms race between a host and pathogen. *PNAS*. Vol. 112, pp. 3651–3660.
- Perkin, L. C.; Elpidina, E. N. & Oppert, B. (2017). RNA interference and dietary inhibitors induce a similar compensation response in *Tribolium castaneum* larvae. *Insect Mol Biol*. Vol. 26, pp. 35-45.
- Perkin, L.; Elpidina, E. N.; Oppert, B. (2016). Expression patterns of cysteine peptidase genes across the *Tribolium castaneum* life cycle provide clues to biological function. *PeerJ*. Vol. 4, e1581.
- Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. Vol. 25, pp. 1605-12.
- Prabhakar, S.; Chen, M. S.; Elpinina, E. N.; Vinokurov, K. S.; Smith, C. M.; Oppert, B. (2007). Molecular characterization of digestive proteinases nad sequence analysis of midgut cDNA transcripts of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor*. *Insect Mol Biol*. Vol. 16, pp. 455-468.
- Qiu, L. J. & Chang, R. Z. (2010). The origin and history os soybean. In: G. Singh (Ed.), *The Soybean: Botany, Production an Uses*. Oxford, UK: CABI Publishing, pp. 1-494.

- Ramos-Elorduy, J.; Gonzalez, E. A.; Hernandez, A. R.; & Pino, J. M. (2002). Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *J Econ Entomol*. Vol. 95, pp. 214–220.
- Rees, D. (2004). *Insects of Stored Products*, pp. 112-113. Manson Publishing, London.
- Ribeiro, L.; Tobias-Santos, V.; Santos, D.; Antunes, F.; Feltran, G.; de Souza Menezes, J., et al. (2017) Evolution and multiple roles of the Pancrustacea specific transcription factor *zelda* in insects. *PLoS Genet*. Vol. 13, e1006868.
- Richards, S.; Gibbs, R. A.; Weinstock, G. M.; Brown, S. J.; Denell, R. et al. (2008) *Tribolium* genome sequencing consortium. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*. Vol. 452, pp. 949-955.
- Ryan, C. A. (1990). Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol*. Vol. 28, pp. 515-522.
- Sali, A.; Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*. Vol. 234, pp. 779-815.
- Sayadi, A.; Immonen, E.; Bayram, H.; Arnvist, G. (2016). The De Novo transcriptome and its functional annotation in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *PLoS ONE*. Vol. 11, e0158565.
- Schart, I.; Braf, H.; Ifrach, N.; Rosenstein, S.; Subach, A. (2015). The effects of temperature and diet during development, adulthood, and mating on reproduction in the red flour beetle. *PLoS ONE*. Vol. 10, e0136924.
- Schlupalius, D. I.; Valmas, N.; Tuck, A. G.; Jagadeesan, R.; Ma, L.; Kaur, R., et al. (2012). A core metabolic enzyme mediates resistance to phosphine gas. *Science*. Vol. 338, pp. 807-810.
- Shaaya, E.; Kostjukovski, M.; Eilberg, J.; Sukprakarn, C. (1997). Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. *J Stored Prod Res*. Vol. 33, pp. 7-15.
- Shaheen, F. A.; Khaliq, A. (2005). Management of pulse beetle, *Callosobruchus chinensis* L. (coleoptera: bruchidae) in stored chickpea using ashes, red soil powder and turpentine oil. *Pak Entomol*. Vol.27, pp. 19-24.

- Sharma, H. C. (2005). *Heliothis/Helicoverpa* management: emerging Trends and Strategies for Future research. New Delhi: Oxford and IBH Publ, 469.
- Silva, C. P.; Terra, W. R.; Xavier-Filho, J.; De Sá, M. F. G.; Isejima, E. M.; Damatta, R. A.; Miguens, F.C.; Bifano, T. D. (2001). Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -amylases in response to different diets. *Insect Biochem Molec Biol.* Vol. 31, pp. 41-50.
- Simmons, R; Baranya, E.; Braun, M.; Fábíán, I.; Tóthmérész, B. (2013). Elemental concentration in mealworm beetle (*Tenebrio molitor* L.) during metamorphosis. *Biol Trace Elem Res.*, Vol. 154, pp. 81-87.
- Sivakumar, C.; Chandrasekaran, S.; Vijayaraghavan, C.; Selvaraj, S. (2010). Fumigant toxicity of essential oils against pulse beetle, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). *J Biopestic.* Vol. 3, pp. 317–319.
- Srinivasan, A.; Giri, P. A.; Harsulkar, A. M.; Gatehouse, J. A.; Gupta, V. S. (2005). A Kunitz trypsin inhibitor from chickpea (*Cicer arietinum* L.) that exerts anti-metabolic effect on podborer (*Helicoverpa armigera*) larvae. *Plant Mol Biol.* Vol. 57, pp. 359–374.
- Sukhwai, A.; Sowdhamini, R. (2015). PPCheck: A Webserver for the Quantitative Analysis of Protein-Protein Interfaces and Prediction of Residue Hotspots. *Bioinform Biol Insights.* Vol.9, pp. 141-51.
- Sun, D.; Guo, Z.; Liu, Y. & Zhang, Y. (2017). Progress and Prospects of CRISPR/Cas Systems in Insects and Other Arthropods. *Frontiers in Physiology*, Vol. 8, pp. 1-22.
- Swathi, M.; Mishra, P. K.; Lokya, V.; Swaroop, V.; Mallikarjuna, N.; Dutta-Gupta, A.; Padmasree, K. (2016). Purification and partial characterization of trypsin-specific proteinase inhibitors from pigeonpea wild relative *Cajanus platycarpus* L. (Fabaceae) Active against gut proteases of lepidopteran pest *Helicoverpa armigera*. *Front Physiol.* Vol. 7, p. 388.
- Terra, W. R. & Cristofolletti, P. T. (1996). Midgut proteinases in three divergent species of coleoptera. *Comp Biochem Physiol.* Vol. 109(B), pp. 1-62.
- Terra, W. R. & Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp Biochem Physiol.* Vol. 109, pp. 1-62.

- Terra, W. R. (1988). Physiology and biochemistry of insect digestion: an evolutionary perspective. *Brazilian J Med Biol Res*. Vol. 21, pp. 675-734.
- Torchala, M.; Moal, I. H.; Chaleil, R. A.; Fernandez-Recio, J.; Bates, P. A. (2013). SwarmDock: a server for flexible protein-protein docking. *Bioinformatics*. Vol. 29, pp.807-809.
- Tripathi, A. K.; Prajapati, V.; Aggarwal, K. K.; Kumar S. (2001). Toxicity, feeding deterrence, and effect of activity of 1,8,-Cineole from *Artemisia annua* on progeny production of *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Econ Entomol*. Vol. 94, pp. 979-983.
- Tripathy, S. K. (2016). Bruchid resistance in food legumes-an overview. *Res J Biotechnol*. Vol. 7, pp. 98–105.
- Tuda, M.; Chou, L-Y.; Niyomdham, C.; Buranapanichpan, S.; Tateishi, Y. (2005). Ecological factors associated with pest status in *Callosobruchus* (Coleoptera: Bruchidae): high host specificity of non-pests to *Cajaninae* (Fabaceae). *J Stored Prod Res*. Vol. 41, pp. 31-45.
- Turk, V.; Stoka, V.; Vasiljeva, O.; Renko, M.; Sun, T.; Turk, B.; Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta*. Vol. 1824, pp. 68-88.
- USDA - United States Department of Agriculture (2018). Oilseeds: World Markets and Trade. World Production, Markets, and Trade Reports.
- Uziela, K.; Menéndez Hurtado, D.; Shu, N.; Wallner, B.; Elofsson, A. (2017). ProQ3D: improved model quality assessments using deep learning. *Bioinformatics*. Vol. 33, pp. 1578-1580.
- van Zundert, G. C. P.; Rodrigues, J. P. G. L. M.; Trellet, M.; Schmitz, C.; Kastiris, P. L.; Karaca, E.; Melquiond, A. S. J.; van Dijk, M.; de Vries, S. J.; Bonvin, A. M. J. J. (2016). The HADDOCK2.2 Web Server: User-Friendly Integrative Modeling of Biomolecular Complexes. *J Mol Biol*. Vol. 428, pp. 720-725.
- Vangone, A.; Bonvin, A. M. (2015). Contacts-based prediction of binding affinity in protein-protein complexes. *Elife*. Vol.4, e07454.
- Vinokurov, K. S.; Elpidina, E. N.; Zhuzhikov, D. P.; Oppert, B.; Kodrik, D.; Sehnal, F. (2009). Digestive proteolysis organization in two closely related Tenebrionid

beetles: red flour beetle (*Tribolium castaneum*) and confused flour beetle (*Tribolium confusum*). Arch Insect Biochem Physiol. Vol. 70, pp. 254-279.

Walter, V. E. (1990). Stored product pests. In Handbook of Pest Control Story K, Moreland D. (editors). Franzak & Foster Co., Cleveland, OH. pp. 526-529.

Wang, X.; Hao, Q.; Chen, Y.; Jiang, S.; Yang, Q.; Li, Q. (2015). The Effect of Chemical Composition and Bioactivity of Several Essential Oils on *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). Vol. 15, p. 116.

Wang, X-G.; Wei, X-Y.; Tian, Y-Q.; Shen, L-T.; Xu, H-H. (2010). Antifungal Flavonoids from *Ficus sarmentosa* var. *henryi* (King) Corner. Agric Sci China. Vol. 9, pp. 690-694.

Weston, P. A. & Rattlingourd, P. L. (2000). Progeny production by *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Oryzaephilus surinamensis* (Coleoptera: Silvanidae) on maize previously infested by *Sitotroga cerealla* (Lepidoptera: Gelechiidae). J Econ Entomol. Vol. 93, pp. 533-536.

Wiederstein, M.; Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. Nucleic Acids Res. Vol.35, pp.407–410.

Xu, D.; Zhang, Y. (2011). Improving the Physical Realism and Structural Accuracy of Protein Models by a Two-Step Atomic-Level Energy Minimization. Biophys J. Vol.101, pp.2525–2534.

Xue, L. C.; Rodrigues, J. P.; Kastritis, P. L.; Bonvin, A. M.; Vangone, A. (2016). PRODIGY: a web server for predicting the binding affinity of protein-protein complexes. Bioinformatics. Vol.32, pp.3676-3678.

Yan, Y.; Zhang, D.; Zhou, P.; Li, B.; Huang, S. Y. (2017). HDock: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. Nucleic Acids Res. Vol.45, pp.365-373.

Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nat Methods. Vol.12, pp.7-8.

Yang, Y.; Yang, J.; Wu, W-M.; Zhao, J.; Song, Y.; Gao, L.; Yang, R.; Jiang, L. (2015). Biodegradation and mineralization of Polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 2. Role of gut microorganisms. Environ Sci Technol. Vol. 49, pp. 12087-12093.

- Zavala, J.A.; Giri, A.P., Jongsma, M.A, Baldwin, I.T. (2008). Digestive duet: midgut digestive proteinases of *Manduca sexta* ingesting *Nicotiana attenuata* with manipulated trypsin proteinase inhibitor expression. PLOS ONE. Vol. 3(4), pp. e2008.
- Zhu, J-Y.; Yang, P.; Zhang, Z.; Wu, G-X.; Yang, B. (2013). Transcriptomic Immune response of *Tenebrio molitor* pupae to parasitization by *Scleroderma guani*. PLoS ONE. Vol. 8, e54411.
- Zhu-Salzman, K.; Hoiwa, K.; Salzman, R. A.; Shade, R. E.; Ahn, J-E. (2003). Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cuysteine proteinase inhibitor. Insect Mol Biol. Vol 5, pp. 135-145.