

“AÇÃO BIOINSETICIDA DE CISTATINAS ISOLADAS DE  
SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard”

DAYANNI DE SOUZA PADUA

Orientadora: Kátia Valevski Sales Fernandes

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES-RJ

ABRIL - 2015

“AÇÃO BIOINSETICIDA DE CISTATINAS ISOLADAS DE  
SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard”

DAYANNI DE SOUZA PADUA

Orientadora: Kátia Valevski Sales Fernandes

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

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Química e Função de  
Proteínas e Peptídeos - LQFPP, do Centro de Biotecnologia e Biociências-CBB

Campos dos Goytacazes - RJ

Abril - 2015

“AÇÃO BIOINSETICIDA DE CISTATINAS ISOLADAS DE  
SEMENTES DE *Clitoria fairchildiana* R.A. Howard”

DAYANNI DE SOUZA PADUA

Orientadora: Kátia Valevski Sales Fernandes

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

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Comissão Examinadora:

---

Dr. Rodrigo Maciel Lima (Instituto Federal Fluminense-IFF)

---

Dr. Marilvia Dansa de Alencar (LQFPP-CBB-UENF)

---

Dr. Aline Chaves Intorne (LFBM-CBB-UENF)

---

Orientadora: Dr. Kátia Valevski Sales Fernandes (LQFPP- CBB - UENF)

Dedico a Deus: minha fonte de luz e força! Obrigada por não deixar desistir dos meus sonhos, por me ajudar a entender que os obstáculos fazem parte do caminho e também fazem parte do aprendizado da vida!

A minha mãe, que fez mais do que poderia por mim, meu maior exemplo de ser humano!

A meu pai, por acreditar sempre em mim!

A minha querida sobrinha e afilhada Alice, por tudo que representa para mim, por me impulsionar em cada momento em que pensei em desistir, seus pequenos gestos mudaram minhas expectativas!

## AGRADECIMENTOS

À professora Kátia pela orientação tão dedicada, pela atenção, pela paciência, e principalmente pela confiança para realizar este trabalho! Obrigada mesmo!

Aos técnicos do laboratório: Cristóvão, Jucélia e Isabela por se disponibilizarem a me ajudar quando precisei!

À professora Dr. Elenir, pelas dicas nos experimentos realizados em seu laboratório e pela colaboração neste trabalho. Muito obrigada!

À professora Dr. Valdirene, pela colaboração deste trabalho. Agradeço muito!

À professora Dr. Olga, pela disponibilidade de seu laboratório sempre que precisei. Muito obrigada!

À FAPERJ e a CAPES pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF e ao Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos – LQFPP.

A todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho!

SUMÁRIO	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
ABREVIATURAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1- INTRODUÇÃO	1
1.1- A superfamília das cistatinas	1
1.2- As cistatinas de plantas	2
1.3 - Papeis fisiológicos de cistatinas de plantas	5
1.3.1- Regulação endógena	5
1.3.2- Regulação exógena	7
1.3.3- Potencial biotecnológico de fitocistatinas	8
1.4- <i>Callosobrucus maculatus</i>	10
1.5- <i>Clitoria fairchildiana</i> R.A Howard	11
2- Objetivo geral	13
2.1- Objetivos específicos	13
3- MATERIAS	14
3.1- Materiais vegetais	14
3.2- Insetos	14
4- METODOS	14
4.1- Purificação de cistatinas de <i>Clitoria fairchildiana</i> R.A. Howard	14
4.1.1- Extração de proteínas das sementes secas	14
4.1.2- Cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephadex G100	15
4.1.3- Cromatografia de afinidade em CnBr-Sepharose 4B CM-papaína	16
4.1.4- Determinação da concentração de proteínas	16
4.1.5- Atividade de proteases cisteínicas	17
4.1.6- Ensaio de atividade de inibição da papaína	17

4.1.7- Visualização de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS	18
4.1.8- Visualização de proteínas por eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE	18
4.1.9- Eletrotransferência de proteínas do gel para membrana de PVDF	19
4.2- Atividade inseticida de cistatina de <i>Clitoria fairchildiana</i> R.A Howard	19
4.2.1- Atividade inibitória <i>in vivo</i> da cistatina contra <i>Callosobruchus maculatus</i>	19
4.2.2- Preparação dos extratos de homogenatos intestinais de <i>Callosobruchus maculatus</i>	20
4.2.3- Visualização de atividades de proteinases cisteínicas dos insetos por zimografia	20
5-RESULTADOS	21
5.1- Purificação de cistatinas <i>Clitoria fairchildiana</i> R.A.Howard	21
5.1.1- Avaliação eletroforética do processo de extração proteica de cotilédones de <i>Clitoria fairchildiana</i>	21
5.1.2- Perfil cromatográfico de EBF submetido à cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephadex G100	22
5.1.3 - Cromatografia de afinidade CnBr-Sepharose 4B CM-papaína usando o P3 da exclusão molecular	25
5.1.4 - Visualização eletroforética das proteínas do extrato bruto (EB), dos picos obtidos nas cromatografias de exclusão molecular em Sephadex G100 (P1, P2 e P3) e na cromatografia de afinidade CnBr-Sepharose 4B CM-papaína (NR e R).	26
5.1.5 - Acompanhamento das etapas de purificação de inibidor de proteases cisteínicas de <i>Clitoria fairchildiana</i>	29
5.2- Atividade inseticida de cistatinas de cotilédones de <i>Clitoria fairchildiana</i> contra <i>Callosobruchus maculatus</i> .	31
5.2.1- Atividade inibitória <i>in vivo</i> do extrato bruto fervido (EBF) e fração R sobre o desenvolvimento larval de <i>Callosobruchus maculatus</i>	31
5.2.2 – Visualização das atividades de proteases cisteínicas dos insetos por zimografia	35
6- DISCUSSÃO	37
7- CONCLUSÃO	47
8-REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1-</b> Diagrama de Molscript (Kraulis, 1991) do modelo da interação da papaína complexada com a cistatina isolada de <i>Vigna unguiculata</i> (CCPI) (Aguiar <i>et al.</i> , 2006).	5
<b>Figura 2-</b> Inseto peste do feijão-de-corda ( <i>Vigna unguiculata</i> ), <i>Callosobruchus maculatus</i> . <a href="http://agrolink.com.br/culturas/soja/carunchu">http://agrolink.com.br/culturas/soja/carunchu</a>	10
<b>Figura 3-</b> Árvore da espécie <i>Clitoria fairchildiana</i> R. A. Howard (a); suas flores (b); os frutos (c) e sua semente (d).	12
<b>Figura 4-</b> Visualização dos perfis proteicos do extrato bruto por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%).	22
<b>Figura 5-</b> Perfil da cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephadex G100 de separação das proteínas albumina sérica bovina (66 KDa), ovoalbumina (45 KDa), inibidor de tripsina (23 KDa), lisozima (14KDa).	24
<b>Figura 6-</b> Perfil da cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephadex G100 do EBF de <i>Clitoria fairchildiana</i> .	24
<b>Figura 7-</b> Cromatografia de afinidade em CnBr-Sepharose 4B CM-papaína da fração P3.	25
<b>Figura 8 -</b> Visualização das frações proteicas obtidas ao longo do processo de purificação por eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE.	27
<b>Figura 9 -</b> Visualização da fração Retida da cromatografia de afinidade CnBr Sepharose 4B CM-Papaína em gel de Tricina-SDS-PAGE.	28
<b>Figura 10 -</b> Efeito do Extrato Bruto Fervido (EBF) nas larvas com 20 dias de desenvolvimento.	32
<b>Figura 11 -</b> Visualização das larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i> alimentadas com crescentes concentrações da fração R da cromatografia de afinidade CnBr Sepharose 4B CM-Papaina.	33
<b>Figura 12-</b> Efeito da fração Retida (R) obtida da cromatografia de afinidade CnBr-Sepharose 4B CM-papaína nas larvas com 20 dias de desenvolvimento.	34
<b>Figura 13-</b> Perfis proteicos de homogenatos intestinais de larvas de <i>Callosobrucus maculatus</i> visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS e de SDS contendo gelatina 0,1 %.	36

## ÍNDICE DE TABELA

	Pág.
<b>Tabela 1-</b> Cistatinas isoladas e identificadas de plantas	3
<b>Tabela 2-</b> Acompanhamento da purificação de cistatina de sementes de <i>Clitoria fairchildiana</i>	30

## ABREVIATURAS

AcCYs - Cistatina do abacaxi

AtCYSs - Gene de cistatina de *Arabidopsis thaliana*

BCA - Ácido Bicinconinico

BSA - Albumina sérica bovina

CCPI - Inibidor de protease cisteinica do feijão

CM-papaína - Papaína carboximetilada

CnBr- Brometo de cianogênio

DTT- 1,4- Dithiothreitol

EB - Extrato Bruto

EBF - Extrato bruto fervido

EDTA- Acido etilenodiamino tetra-acético

NaCl- Cloreto de Sódio

NaOH - Hidróxido de Sódio

NR - Não retido

OpTi - Gene de um inibidor de tripsina

PVDF- Fluoreto de polivinilideno

P1 - Pico 1 (Sephadex G100)

P2 - Pico 2 (Sephadex G100)

P2 - Pico 3 (Sephadex G100)

PBS- Tampão fosfato salina

R- Fração retida (cromatografia de afinidade CnBr Sepharose 4B CM-papaína)

ScN- Inibidor de protease cisteinica de soja

SDS- Dodecil sulfato de sódio

TCA- Acido tricloroacético

TEMED- N'N'N'N' tetrametiletlenodiamino

Tris -Tris-hidroximetil amino etano

UI - Unidade inibitória

UAI - Unidade de atividade inibitória

## RESUMO

Cistatinas são inibidores de proteinases cisteínicas, que inibem especificamente proteinases das classes da papaína e catepsinas B, L e H. Essas proteínas são encontradas em animais e plantas. São capazes de inibir a digestão de insetos fitófagos, sugerindo potencial bioinseticida. Este trabalho teve como objetivo principal isolar cistatinas de sementes da espécie leguminosa *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard e avaliar seu potencial inibitório contra insetos praga do feijão de corda (*Vigna unguiculata*), o bruquídeo *Callosobruchus maculatus*. Farinha de cotilédones de *C. fairchildiana* foi submetida à extração de proteínas e o extrato bruto foi fervido a 100° C por 10 min. O EBF (extrato bruto fervido) apresentou uma maior taxa de atividade inibitória de papaína do que o EB (extrato bruto sem ferver), tendo sido, portanto, selecionado para a próxima etapa de purificação, uma cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100. Na separação de EBF, obtiveram-se três frações, denominadas P1, P2 e P3. Essas frações foram submetidas a ensaios de atividade de inibição da papaína, observando-se que o pico 3 apresentou a maior taxa de atividade inibitória da papaína e foi, então, submetido a uma cromatografia de afinidade CnBr Sepharose 4B CM-papaína. Desta, obteve-se uma fração majoritária não retida (NR) e uma pequena fração, eluída com pH 11,5 (fração R). As frações foram testadas quanto à sua atividade inibitória de papaína e R apresentou maior taxa de atividade específica que as demais frações obtidas ao longo do processo de purificação. Visualizada por eletroforese em gel de tricina-SDS-PAGE, a fração R apresentou bandas proteicas com massa molecular na faixa entre 10 e 14 kDa, Para verificarmos a atividade inseticida do EBF e da fração R, foram realizados ensaios *in vivo* utilizando o método de sementes artificiais. Larvas de *C. maculatus* foram alimentadas com sementes artificiais, contendo concentrações crescentes do EBF e da fração R e o efeito da dieta foi avaliado através da pesagem das larvas, 20 dias após o início da infestação. Homogenatos intestinais destas larvas foram também preparados para a visualização da atividade de proteases digestivas por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e gelatina. O EBF causou redução na massa das larvas e aumento na sua mortalidade, enquanto a fração R também

foi capaz de alterar o desenvolvimento das larvas dos bruquídeos gerando um decréscimo da massa das larvas. Utilizando crescentes concentrações (0,05%, 0,1%, 0,5%, 1% e 2%) do EBF na dieta artificial de *C. maculatus*, as larvas alimentadas com 0,05% EBF tiveram reduções de 35 % em sua massa, e as larvas alimentadas com 0,1%, 0,5%, 1% e 2% do EBF tiveram 100% de mortalidade. Quando foram incorporadas as mesmas concentrações da fração R na dieta artificial dos insetos, foi observado que as larvas alimentadas com 0,05%, 0,1% e 0,5% da fração R tiveram reduções de 14 %, 38 % e 69 % em sua massa, respectivamente. Os dados demonstram a eficácia das proteínas retinas na cromatografia de afinidade à papaína em inibirem o desenvolvimento de *C. maculatus*, bem como demonstram que o EBF, por apresentar maior toxicidade a este inseto, deve conter outras categorias de proteínas que interferem negativamente com o desenvolvimento larval do bruquídeo.

Palavras-chave: Fitocistatinas, *Bioinseticida*, *Clitoria fairchildiana*

## ABSTRACT

Cystatins are inhibitors of cysteine proteinases that specifically inhibit the proteases classes of papain and cathepsins B, L and H. These proteins are found in plants and animals and are capable of inhibiting the digestion of phytophagous insects, suggesting biopesticide potential. This work aimed at the isolation of seed cystatins from the legume *Clitoria fairchildiana* RA Howard and at the evaluation of their inhibitory potential against the cowpea (*Vigna unguiculata*) insect pest, the bruchid *Callosobruchus maculatus*. Flour made from *C. fairchildiana* cotyledons was submitted to protein extraction and the crude extract was boiled at 100 C for 10 min. The CBE (crude boiled extract) showed higher inhibitory activity rate of papain than CE (crude extract without boiling) and was therefore selected for the next stage of purification, a molecular exclusion chromatography on Sephadex G-100. The process separation of the EBF produced three fractions, designated P1, P2 and P3. These fractions were subjected to papain inhibitory activity assays, and peak 3 was seen to contain the highest rate of papain inhibitory activity and was then subjected to an affinity chromatography on CNBr Sepharose 4B CM-papain. From this, a majoritary non-retained fraction (NR) and a secondary fraction eluted with pH 11.5 (R fraction) were obtained. Both fractions were tested for their papain inhibitory activity and R showed the one with the highest specific activity than NR and than any other fraction obtained during the purification process. By gel electrophoresis tricine-SDS-PAGE visualization, the fraction R showed protein bands with molecular masses ranging from 10 to 14 kDa. In order to verify the insecticidal activity of the CBE and R fractions, *in vivo* assays were performed using the method of artificial seeds. *C. maculatus* larvae were fed with artificial seeds containing increasing concentrations of the EBF and R fractions, and the diet effect was assessed by weighing the larvae 20 days after the onset of infestation. These larvae intestinal homogenates were prepared for the visualization of digestive protease activities on polyacrylamide gels run in the presence of SDS and gelatin. The BCE led to larval weight decreases and mortality while R fraction was also capable of interfere with the development of the bruchid larvae, causing a decrease in the larval. By using increasing concentrations (0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% and 2%) of

CBE in an artificial diet for *C. maculatus*, the larvae fed with 0.05% had 35% a of mass reductions larvae fed with 0.1%, 0.5%, 1% and 2% CBE had 100% mortality. When we incorporated the same concentrations of the R fraction in the artificial insect diet, it was observed that the larvae fed with 0.05%, 0.1% and 0.5 % of the fraction R had 14%, 38 % and 69 % of mass reductions, respectively. The data reveal the efficacy of the proteins retained at the papain affinity chromatography in the inhibition of the *C. maculatus* development, and also demonstrate that the BCE, since it showed a higher toxicity to this insect, may contain other protein categories which negatively interfere with the bruchid larval development.

Keywords: Phytocystatins, Biopesticide, *Clitoria fairchildiana*.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1- A superfamília das cistatinas

As cistatinas são proteínas que inibem proteases cisteínicas da classe da papaína e catepsinas B, L e H (Barrett *et al.*, 1987). As proteases alvo são inibidas devido à formação de firmes e reversíveis complexos equimolares, nos quais o sítio ativo da enzima fica inativo. A cistatina da clara de ovo de galinha foi a primeira cistatina com sua estrutura caracterizada, daí a origem da denominação (“cisto=ovo”) (Barrett 1981).

Em revisão do tema, Turk e Bode (1991), baseando-se em dados originários de análises de raios-X de interações entre cistatinas e suas enzimas-alvo, explicaram a presença de três pontos de interação entre inibidores e proteases. Um desses pontos é formado por uma alça em forma de grampo com um domínio (QVVAG) conservado, comum a todas as cistatinas. O segundo ponto é também uma alça de ligação que apresenta um aminoácido triptofano (Rawlings e Barrett, 1990). O terceiro ponto é composto por resíduos de aminoácidos altamente conservados encontrados na extremidade da região N-terminal da cistatina (Turk e Bode, 1991). Estes três pontos são expostos na superfície da proteína, formando um “gancho” hidrofóbico, que se encaixa eficientemente no sítio ativo da enzima alvo.

Segundo Turk *et al.* (2008), os inibidores de proteases cisteínicas estão divididos em quatro grupos:

- Cistatina do tipo 1 (Estefinas): são intracelulares e estão presentes no citosol de muitos tipos celulares. As estefinas são polipeptídios de cadeia única de cerca de 100 resíduos de aminoácidos, que não possuem pontes dissulfeto nem glicosilações.
- Cistatina do tipo 2 (Cistatinas): são principalmente polipeptídios extracelulares secretados, ácidos, que possuem quatro resíduos conservados de cisteínas, formando duas pontes dissulfeto e encontradas na maioria dos fluidos corporais de animais. Elas podem ser glicosiladas e fosforiladas, sendo sintetizadas com um peptídeo sinal de 19 a 28 resíduos de aminoácidos.
- Cistatina do tipo 3 (Cininogênios): são proteínas glicosiladas de multidomínios. Normalmente, os cininogênios possuem massas moleculares

elevadas (80 kDa), e resultam de duplicação gênica de domínios de cistatinas do tipo 2.

- Cistatinas não classificadas: compreendem proteínas cistatinas-símile, encontradas em diversos organismos, como: as fitocistatinas de plantas; fetuínas de mamíferos, cistatinas de insetos e uma cistatina de veneno de serpente, que inibe metaloproteases da família M12 de peptidases. Incluem-se ainda, neste grupo, um número de cistatinas-símile reportadas como não detentoras do potencial inibitório de proteases.

A superfamília dos inibidores de proteases cisteínicas possui em sua estrutura o domínio conservado (QxVxG) na região central da cadeia polipeptídica, os resíduos de aminoácidos Pro-Trp (ou Pro-Leu-Trp) no C-terminal, e um resíduo de Gly na região N-terminal (Barrett *et al.*, 1986; Turk e Bode, 1991).

## 1.2- As cistatinas de plantas – Fitocistatinas

Em plantas, a primeira cistatina isolada e caracterizada foi de sementes de arroz, denominada orizacistatina I, que possui estrutura semelhante à cistatina da clara de ovo de galinha (Abe *et al.*, 1987). As cistatinas de plantas, além dos domínios conservados da superfamília, possuem outra seqüência de aminoácidos (Leu-Ala-Arg-[Phe ou Tye] – Ala- [Val ou Ile]- x-x-x- Asn), conservada na região N-terminal (Margis *et al.*, 1989).

A maioria das fitocistatinas isoladas apresenta entre 12-16 kDa, não possui pontes dissulfeto ou glicosilações, como as orizacistatinas e apresentam alta homologia com a cistatina da clara de ovo de galinha (Abe *et al.*, 1987). No entanto, fitocistatinas de 23 kDa já foram relatadas, e proteínas semelhantes aos cininogênios, com cerca de 80 KDa com 8 domínios, foram encontradas em tubérculos de *Solanum tuberosum* (Walsh e Strickland, 1993), em folhas de *Solanum lycopersicum* (Jacinto *et al.*, 1998) e de *Vigna unguiculata* (Diop *et al.*, 2004), e em sementes de *Helianthus annuus* (Kouzuma *et al.*, 2000). A tabela 1 mostra alguns exemplos de cistatinas isoladas de espécies vegetais.

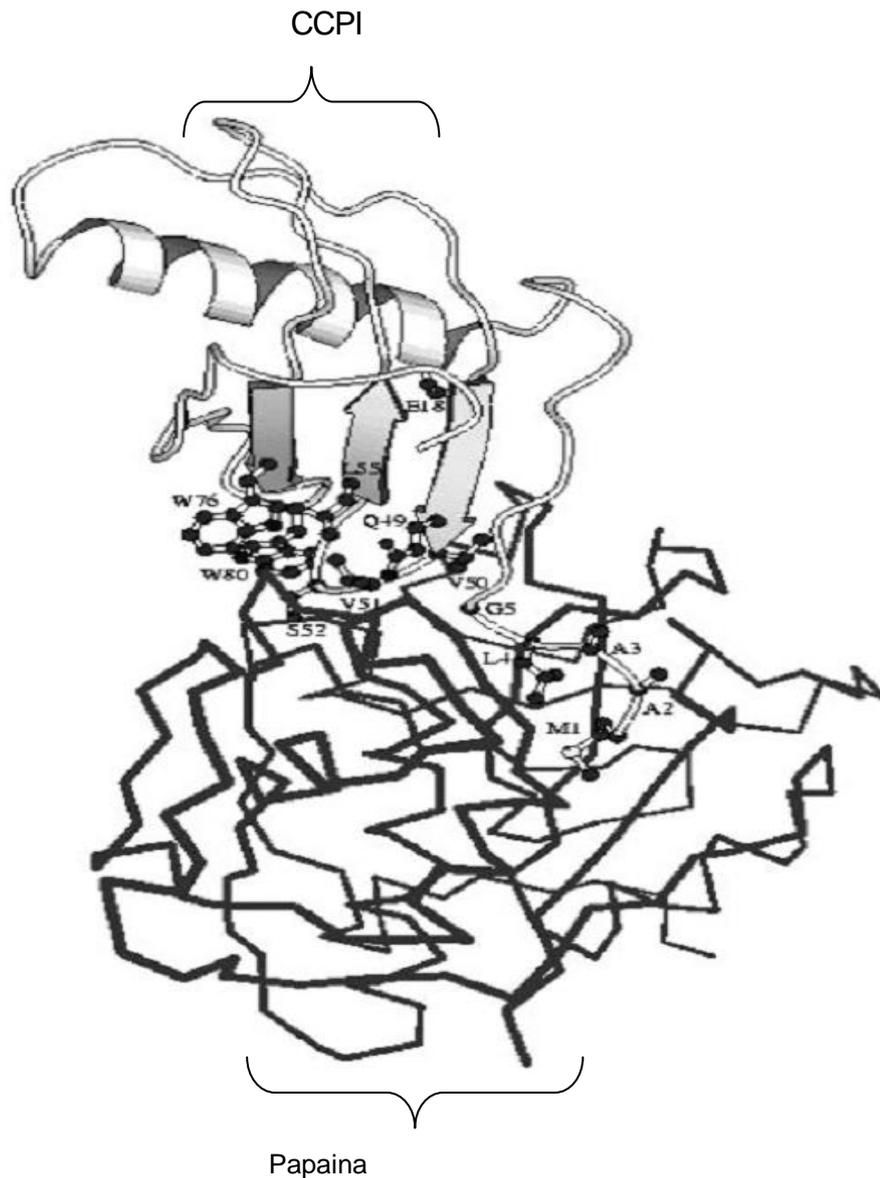
**Tabela 1:** Cistatinas isoladas e identificadas de plantas.

<b>Espécie vegetal</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Referências</b>
<i>Oryza sativa</i> L. ssp <i>japonica</i>	Sementes	Abe <i>et al.</i> , 1987; Kondo <i>et al.</i> , 1991
<i>Zea mays</i> L	Sementes	Abe e Whitaker, 1988; Abe e Arai, 1991; Abe <i>et al.</i> , 1996; Irie <i>et al.</i> , 1996
<i>Solanum tuberosum</i>	Tubérculos	Rowan <i>et al.</i> , 1990; Waldron <i>et al.</i> , 1993; Orr <i>et al.</i> , 1994; Walsh e Strickland 1993
<i>Vigna unguiculata</i>	Sementes	Fernandes <i>et al.</i> , 1993
<i>Persea americana</i>	Frutos	Kimura <i>et al.</i> , 1995
<i>Brassica campestris</i>	Botões florais	Lim <i>et al.</i> , 1996
<i>Glycine max</i>	Sementes	Hines <i>et al.</i> , 1991; Misaka <i>et al.</i> , 1996
<i>Carica papaya</i>	Sementes	Song <i>et al.</i> , 1995
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Sementes	Santino <i>et al.</i> , 1998; Brzin <i>et al.</i> , 1998
<i>Triticum</i> spp.	Sementes	Corre-Menguy <i>et al.</i> , 2002
<i>Sesamum indicum</i>	Sementes	Shyu <i>et al.</i> , 2004 <sup>a</sup>
<i>Ananas comosus</i>	Frutos	Shyu <i>et al.</i> , 2004 <sup>b</sup>
<i>Hordeum vulgare</i>	Sementes	Martinez <i>et al.</i> , 2005 <sup>a</sup>
<i>Fragaria ananassa</i> cv. <i>Elsanta</i>	Folhas, raízes, aquênios	Martinez <i>et al.</i> , 2005
<i>Colocasia esculenta</i>	Tubérculo	Yang <i>et al.</i> , 2005
<i>Saccharum officinarum</i>	Colmo	Gianotti <i>et al.</i> , 2006
<i>Phaseolus mungo</i>	Sementes	Sharma <i>et al.</i> , 2006
<i>Vigna vexillata</i>	Sementes	Cunha <i>et al.</i> , 2007
<i>Colocassia esculenta</i>	Tubérculo	Wang <i>et al.</i> , 2008
<i>Solanum tuberosum</i>	Folha	Goulet <i>et al.</i> , 2008
<i>Cakile marítima</i>	Folha	Megdiche <i>et al.</i> , 2009
<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Folhas, sementes	Valdes - Rodriguez <i>et al.</i> , 2010
<i>Catharanthus roseus</i> ,	Sementes	Sharma <i>et al.</i> , 2011
<i>Hevea brasiliensis</i>	Látex, folha, sementes	Bangrak e Chotigeat 2011
<i>Brassica rapa</i>	Brotos florais	J. K. Hong <i>et al.</i> , 2012

Muitos trabalhos vêm estudando a interação da papaína complexada com a cistatina. No trabalho de Aguiar *et al.* (2006), foi descrita a modelagem molecular de uma cistatina recombinante isolada de sementes de feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). Para construção de um modelo do complexo papaína-CCPI (cistatina isolada do feijão) (Figura 1), observaram-se dados estruturais de duas cistatinas, estefina B humana e cistatina de clara de ovo de galinha. Nesse trabalho foi visto que as interações de CCPI com a enzima alvo estão restritas, principalmente, a três regiões: ao N-terminal, a uma região de consenso (resíduos 49-53, seqüência QVVSG em CCPI), e a uma segunda alça junto com a fita  $\beta$  precedente. Na região N-terminal, 35 das 56 interações hidrofóbicas envolvem resíduos que se encontram entre Met 1 a Gly 5. Resultados deste trabalho mostram que são particularmente importantes as interações que envolvem os resíduos Met 1 e Leu 216, que contribuem para 20 e 11 interações, respectivamente (Figura 1).

Estudos de análises estruturais de outras cistatinas também foram relatados no trabalho de Dutt *et al.* (2010). Neste trabalho, foram comparadas as seis cistatinas do trigo (*Triticum spp*) (WCs) com as seqüências de doze cistatinas de arroz (*Oryza sativa*), sete de cevada (*Hordeum vulgare*), uma de sorgo e dez de milho (*Zea mays*), com o apoio de diversas ferramentas de bioinformática. Foram identificadas seqüências altamente conservadas da superfamília das cistatinas na interação de WCs com a papaína, e os dados dos autores reforçam que diversidade funcional é consequência da existência de diferentes seqüências de aminoácidos altamente conservados e concomitantes variações, as quais mantêm as diferentes funções nesta família de proteínas (Dutt *et al.*, 2010).

Irene *et al.* (2012) determinaram a estrutura de uma cistatina recombinante de abacaxi (*Ananas comosus*) através de NMR, e foi demonstrada a existência de um compacto domínio inibitório, constituído de quatro fitas em folhas  $\beta$ -antiparalelas ao redor de uma  $\alpha$ -hélice central. Os resíduos 45 a 48 nas regiões de alça e os resíduos 89 a 91 (QVV) da cistatina de abacaxi estão envolvidos na ligação com a papaína, coerente com os estudos de outros membros da família das cistatinas. Porém, diferentemente do observado em outros modelos estudados, o resíduo conservado W120 não aparece envolvido na ligação com a papaína.



**Figura 1:** Diagrama de Molscript (Kraulis, 1991) do modelo da interação da papaína complexada com a cistatina isolada de *Vigna unguiculata* (CCPI) (Aguiar *et al.*, 2006).

### 1.3- Papéis fisiológicos de cistatinas de plantas

#### 1.3.1- Regulação endógena

Os inibidores de proteases cisteínicas estão envolvidos na regulação endógena de proteases, em tecidos vegetais. Em sementes de feijão-de-corda, proteases cisteínicas e inibidores de papaína são expressos de forma

coordenada durante o desenvolvimento das sementes (Fernandes *et al.*, 1991). Também foi visto que, em sementes de arroz, orizacistatina II inibe proteases cisteínicas durante a germinação (Abe *et al.*, 1987; Watanabe *et al.*, 1991; Hosoyama *et al.*, 1994; Ojima *et al.*, 1997).

Trabalhos realizados com a planta modelo *Arabidopsis thaliana* mostraram que sementes transgênicas expressando cistatina de *Brassica rapa* sofreram redução na atividade de proteases cisteínicas e retardo em seu desenvolvimento (Hong *et al.*, 2007). No trabalho de Hwang *et al.* (2009) foram relatados experimentos de germinação de sementes selvagens de *A. thaliana* e também sementes transgênicas superexpressando a cistatina AtCYS6, sendo observado que a superexpressão retardou a germinação e o crescimento de mudas. Também foi constatada a ação das fitocistatinas como regulador endógeno, diante da inibição da atividade de proteases cisteínicas endógenas da semente (Hwang *et al.*, 2009).

Hwang *et al.* (2010) encontraram sete isoformas de fitocistatinas (AtCYSs – cistatina de *Arabidopsis thaliana*) e dois destes genes, *AtCYS1* e *AtCYS2*, foram localizados em clusters gênicos distantes, apresentando diferentes padrões de expressão durante o desenvolvimento normal da planta. Enquanto *AtCYS1* é preferencialmente expresso no tecido vascular dos órgãos, *AtCYS2* é expresso em células guarda de folhas jovens, raízes e regiões contendo anteras imaturas. Altas temperaturas e o aumento do estresse induzem a expressão de ambos os genes em tempos diferentes. Isto sugere que estes genes possuem diferentes funções no desenvolvimento da planta e em sua resposta a estresses abióticos.

A ação regulatória endógena de fitocistatinas durante o desenvolvimento e germinação de sementes também foi relatada no trabalho de Szewinska *et al.* (2012). Os autores demonstraram que os níveis de expressão de um inibidor de protease cisteínica (TrCC-4) estão relacionados a uma característica de maior resistência a germinação precoce, em cultivares do cereal triticale, um híbrido entre trigo e centeio. A germinação precoce é uma condição indesejável observada em algumas espécies, em que a germinação dos grãos ocorre antes da colheita, ainda na espiga.

### 1.3.2- Regulação exógena

Muitos trabalhos revelam que as cistatinas podem estar envolvidas em diversas funções fisiológicas das plantas, entre estas, a de reguladores exógenos com habilidade de inibirem proteases cisteínicas secretadas por patógenos microbianos e predadores herbívoros específicos como fungos fitopatogênicos, nematóides e insetos-pestes (Benchabane *et al.*, 2010). O papel inibitório de fitocistatinas contra proteases de diversos grupos de organismos vivos tem sido demonstrado por testes de atividades biológicas contra insetos (Carlini & Grossi-de-Sá, 2002; Lalitha *et al.*, 2005), nematóides (Urwin *et al.*, 2003), moluscos (Walker *et al.*, 1999), afídeos (Ashouri *et al.* 2001), fungos (Joshi *et al.*, 1998; Pernas *et al.*, 1999; Siqueira-Júnior *et al.*, 2002., Soares-Costa *et al.*, 2002; Martinez *et al.*, 2005., Christoya *et al.*, 2006; Santiago *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2014) e vírus (Arai *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2004).

O papel de defesa de cistatinas contra insetos, em especial coleópteros e hemípteros, tem sido reportado em diversos trabalhos, tais como os de Murdock *et al.* (1987), Hines *et al.* (1991), Chen *et al.* (1992), Michaud *et al.* (1994), Orr *et al.* (1994), Irie *et al.* (1996), Kuroda *et al.* (1996), Lim *et al.* (1996), Zhao *et al.* (1996); Koiwa *et al.* (1998; 2000), Carlini & Grossi-de-Sá (2002) e Lalitha *et al.* (2005).

No trabalho de Aguiar *et al.* (2006), foi relatada uma alta atividade inibitória da cistatina recombinante de *Vigna unguiculada* (Flores *et al.*, 2001) sobre proteases digestivas de dois insetos bruquídeos, *Zabrotes subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*, quando incorporando, em sua dieta, baixas concentrações de cistatina (CCPI). Através de uma dieta artificial, no desenvolvimento de larvas dos bruquídeos, a adição de 0,025 %, provocou alto índice de mortalidade desses insetos adultos (79% no caso de *A. obtectus* e 67% para *Z. subfasciatus*) e diminuiu em mais da metade do peso das larvas nas duas espécies. Quando se aumentou a concentração de CCPI para 0,05%, a mortalidade de *A. obtectus* foi em torno de 100 %, enquanto que a mortalidade de *Z. subfasciatus* foi próximo de 90%.

Amirhusin *et al.* (2007) exploraram a possibilidade de combinação de três inibidores de proteases antimetabólicos aos insetos bruquídeos *Callosobruchus maculatus*, sendo estes uma cistatina de soja (scN), um

inibidor de protease aspártica (pepstatina A) e um inibidor de tripsina do tipo Kunitz de soja (KI). Quando combinados na dieta dos bruquídeos, o efeito dos inibidores foi sinérgico, e a toxicidade foi nitidamente maior para a mistura de scN com pepstatina A. O inibidor de tripsina do tipo Kunitz (KI) sozinho não teve nenhum efeito no desenvolvimento do inseto, mesmo incorporado na dieta em altas concentrações, porém ação antimetabólica foi destacada quando atuando em conjunto com a scN e a pepstatina A. Adicionando o KI ao extrato intestinal, observou-se uma degradação parcial deste inibidor pelas enzimas digestivas do bruquídeo. Porém esta degradação proteolítica foi inibida por scN ou pepstatina A.

Trabalhos recentes mostram mudanças proteômicas no trato intestinal de larvas de *Callosobruchus maculatus* após serem alimentadas com cistatina de ovo (Nogueira *et al.*, 2012). A dieta com a cistatina em uma concentração de 0,7% levou a um retardo no desenvolvimento de larvas de quarto instar, porém a mortalidade foi baixa. Isto sugere que o inseto é capaz de se adaptar a este inibidor de protease cisteínica. Com a estratégia de análise proteômica, foi possível observarem-se 752 e 550 grupos de proteínas presentes no epitélio intestinal e no conteúdo intestinal, respectivamente. Destas 752, 127 grupos de proteínas foram superexpressos ou derivados exclusivamente de larvas alimentadas com 0,7% de cistatina na dieta, tais como hidrolases da família das endo- $\beta$ -1,4-mananases e poligalacturonases, enquanto que 41 foram reprimidas ou estavam presentes somente em larvas criadas na dieta controle.

### **1.3.3 - Potencial biotecnológico de fitocistatinas**

Devido aos diversos registros de interações entre cistatinas e organismos específicos, a expressão destes inibidores em plantas transgênicas tem sido sugerida como uma alternativa para protegê-las de seus predadores. No entanto, novas estratégias devem ser desenvolvidas para assegurar a durabilidade da resistência dessas plantas (Ferry *et al.*, 2006).

O uso de inibidores de proteases é visto como alvo para a produção de culturas de plantas transgênicas buscando a resistência a pragas agrícolas. Isto se deve à alta especificidade destes inibidores a uma classe de enzimas presente no sistema digestivo dos insetos de relevância agrônômica. Como exemplo, temos espécies de insetos das ordens Lepidopterae, Dipterae e

Coleopterae, as quais possuem majoritariamente, em seu sistema digestivo, proteases serínicas e cisteínicas (Ussuf *et al.*, 2001). Proteases da classe cisteínica estão presentes no processo de digestão de larvas de insetos que atacam espécies leguminosas importantes, sendo essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal de larvas, tais como do coleóptero bruquídeo *C. maculatus*, peste do feijão de corda (Fernandes *et al.*, 1993).

A primeira planta transgênica resistente a pragas utilizando cistatina de origem vegetal foi o tabaco. Neste caso, a expressão do transgene CpTI (que codifica um inibidor de tripsina) isolado de feijão de corda conferiu maior resistência ao lepidóptero *Manduca sexta* (Hilder *et al.*, 1987). Mais recentemente, Ishimoto *et al.* (2012) avaliaram a atividade inseticida de soja transgênica, superexpressando um inibidor de proteases cisteínica exógeno. A expressão heteróloga desta cistatina do milho em sementes de soja inibiu proteases cisteínicas digestivas de um importante inseto peste que ataca as plantações de soja, *Riptortus clavatus* (percevejo do feijão). No entanto, o crescimento do inseto não foi inibido.

Uma grande questão a se levar em consideração é a co-evolução das plantas e seus predadores específicos, já que ambos podem apresentar estratégias de adaptação e defesas. Salzman *et al.* (2003) relataram que o inseto peste do feijão de corda utiliza de uma estratégia para sobrepor a atividade inibitória de uma cistatina de soja. Neste trabalho, a fitocistatina retardou o crescimento durante os estágios iniciais de desenvolvimento larval do inseto depois de introduzida em sua dieta, porém, passado um período, a larva normalizou sua alimentação e crescimento.

Outra questão é a possibilidade de interferência metabólica indesejada em proteólises endógenas, o que poderia eventualmente alterar importantes funções celulares da planta transformada (Munger *et al.*, 2012). Então, essas questões reforçam a necessidade do entendimento do papel fisiológico dos inibidores de proteases cisteínicas em sementes, bem como do mecanismo de ação dessas proteínas e seu papel de defesa nas plantas.

#### 1.4- *Callosobruchus maculatus*

O inseto *Callosobruchus maculatus* (figura 2), conhecido popularmente como caruncho ou gorgulho do feijão, faz parte da família Bruchidae, ordem Coleoptera, e representa uma relevante praga de grãos de feijões armazenados de *Vigna unguiculata* (feijão-de-corda). Estes insetos medem aproximadamente 3 mm de comprimento, possuem cabeça preta e tórax preto com pubescências douradas, apresentando manchas amarronzadas nos élitros (Quintela *et al.*, 1991). As fêmeas desses bruquídeos fazem a postura no exterior da semente, ficando o ovo inicialmente aderido no tegumento da semente. O ovo, com 0,5 a 0,3 mm, apresenta cor branca e após a eclosão, expõe larvas na cor branca (Southgate, 1979; Credland e Dendy, 1992). Dentro das sementes transformam-se em pupas na cor marrom e no final dos estágios apresentam vestígios de asas, patas e olhos (Bastos, 1991). O ciclo de vida é dividido em sete estágios: 1<sup>o</sup> instar (primeiros 8 dias do ciclo), 2<sup>o</sup> instar (11 dias), 3<sup>o</sup> instar (13 dias), 4<sup>o</sup> instar (17 dias), pré-pupa (19 dias), pupa (24 dias) e adulto. O inseto completa seu desenvolvimento em cerca de 30 dias. E os machos são menores do que as fêmeas (Quintela *et al.*, 1991).



**Figura 2:** Inseto peste do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), *Callosobruchus maculatus*.[http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/caruncho\\_1920.html](http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/caruncho_1920.html)

O trato digestivo é dividido em três partes: intestino anterior, intestino médio e intestino posterior (Chapman, 1998). O intestino médio compreende o tecido mais importante para a digestão dos alimentos (Billingsley e Lehane, 1996). As células epiteliais do intestino médio produzem as enzimas digestivas e estas são segregadas no lúmen, onde o bolo alimentar passa (Terra e Ferreira, 1994).

### 1.5 - *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard

*Clitoria fairchildiana* R. A. Howard é uma planta arbórea nativa do Brasil, pertencente à Classe Eurosidaeae, ordem Fabales, família Fabaceae ou Leguminosae, subfamília Faboideae. Conhecida popularmente como sombreiro, palheteira, sobreiro e sombra de vaca. É uma árvore que mede de 6 a 12 metros de altura, com inflorescência em racemos terminais, de flores azuis-violeta e frutos do tipo vagens achatadas e deiscentes. O florescimento ocorre durante o verão e, em algumas regiões, estende-se até abril e maio, e seus frutos amadurecem em maio e julho no início da queda das folhas (Lorenzi, 2002). A dispersão das sementes ocorre através da abertura espontânea das vagens.

Tem ocorrência principal no Amazonas, Pará, Maranhão e Tocantins, na floresta amazônica de terra firme. Tem preferência por solos férteis e úmidos. É ótima para a arborização urbana e também rural, como já vem sendo amplamente utilizada nas regiões sudeste e norte do Brasil (Lorenzi 2002).

A figura 3 mostra algumas imagens da espécie *Clitoria fairchildiana* - em (a), um indivíduo adulto; em (b), suas flores; em (c), os frutos do tipo vagem; e em (d), sua semente.

A partir de observações diretas e pela quase total ausência de dados na literatura sobre predadores naturais de *C. fairchildiana*, levantamos a hipótese de que esta espécie apresente um arsenal químico de defesas poderoso, dentre estas, proteínas com potenciais praguicidas e pesticidas. Os poucos relatos na literatura de insetos-pestes desta leguminosa referem-se aos lepidópteros desfolhadores, *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Hesperiidae), (Silva, 1995; Machado, 2000; Trevisan *et al.*, 2004) e *Hyperchiria incisa incisa* (Zanuncio *et al.*, 2013) e ao psilídeo *Euphalerus clitoriae* (Gondim-Júnior *et al.*,

2005), que suga ramos e folhas jovens, causando grande prejuízo ao indivíduo acometido pela infestação. Em geral, a planta se mantém por anos sem sofrer qualquer ataque de tais predadores, mas quando infestada sofre severos danos em sua parte aérea.



**Figura 3:** Árvore da espécie *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard (a); suas flores (b); os frutos (c) e sua semente (d).

Sementes, em particular, são fontes principais de inibidores de proteases com ação inseticida. Neste sentido, o presente trabalho elegeu como alvo e meta de estudo o isolamento de fitocistatinas das sementes de *C. fairchildiana*, que são inibidores específicos de proteases cisteínicas. Esta

escolha baseia-se no conhecimento de que, enquanto as principais proteases digestivas de Lepidoptera e Diptera são da classe das proteases serínicas, em Coleoptera são principalmente das classes das proteases cisteínicas e aspárticas (Maagd *et al.*, 2001). A hipótese que pretendemos testar é a de que, pelo fato de não haver relatos de literatura sobre a predação de tais sementes por coleópteros, as fitocistatinas destas sementes não teriam sofrido nenhuma pressão adaptativa por parte de insetos predadores, podendo ter conservado alto grau de toxicidade a insetos predadores desta ordem, os quais são, em geral, relevantes à produção de culturas de valor econômico.

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

## 2 - OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo central isolar cistatinas de sementes de *Clitoria fairchildiana* e avaliar seu potencial bioinseticida contra o inseto bruquídeo *Callosobruchus maculatus* (praga do feijão de corda).

### 2.1- Objetivos específicos

- ✓ Purificação de cistatinas de sementes da leguminosa *C. fairchildiana*;
- ✓ Análise da atividade inibitória das cistatinas purificadas sobre o desenvolvimento do bruquídeo *C. maculatus*.

### 3. MATERIAIS

#### 3.1- Materiais vegetais

As sementes quiescentes de *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard foram coletadas na cidade de Bom Jesus do Itabapoana-RJ no mês de junho, após naturalmente dispersas pela queda dos frutos maduros. Exsicatas da espécie estudada foram depositadas no herbário do Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade, sob a catalogação HUENF 9492.

#### 3.2- Insetos

Os insetos bruquídeos *Callosobruchus maculatus* (praga do feijão de corda) foram utilizados para a detecção de atividade biológica de cistatinas purificadas das sementes de *C. fairchildiana*

A colônia de *C. maculatus* utilizada neste estudo é mantida em sementes de *Vigna unguiculata* cv. EPACE-10, em frascos de vidro transparente, de boca larga, fechados com tampas plásticas perfuradas, no Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos. Os frascos são mantidos em câmara de crescimento a temperatura de 28 °C e umidade relativa de 65%. A cada geração, infestam-se novas sementes com fêmeas de dois dias após emergência, com período de postura de 1 dia.

Tais insetos crescidos em dieta natural e preferencial da espécie foram insetos-controle para todos os testes de alimentação alterada que se seguiram nesta pesquisa.

### 4. MÉTODOS

#### 4.1 - PURIFICAÇÃO DE CISTATINAS DE *Clitoria fairchildiana*

##### 4.1.1 - Extração de proteínas das sementes secas

As sementes de *C. fairchildiana* foram visualmente selecionadas,

escolhendo-se aquelas isentas de quaisquer lesões visíveis para serem descascadas manualmente. Os cotilédones obtidos foram triturados até a obtenção de uma farinha fina, a qual foi tratada com metanol 80% na proporção de 1:5 (m / v) durante 15 min, sob agitação constante, em temperatura ambiente. A suspensão foi centrifugada, a 10.000 x g, por 5 min, a 4° C. O sobrenadante foi descartado. Em seguida, foi repetido o tratamento com metanol, visando à remoção máxima de pigmentos e a farinha, livre de pigmentos, foi submetida à extração de proteínas, adicionando-se tampão fosfato de sódio 0,1 M com NaCl 0,5 M, pH 7,6 na proporção de 1:10 (m / v – 250 g de farinha / 2,5 L de tampão). A extração procedeu-se por 90 min, sob agitação constante, a 4° C. Feito isso, o material foi centrifugado a 12.000 x g durante 15 min, a 4° C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante, chamado de extrato bruto (EB), foi fervido a 100° C por 10 min. Após a fervura, o material foi centrifugado novamente a 12.000 x g durante 15 min, a 4° C. Em seguida o material foi dialisado, congelado em nitrogênio líquido e liofilizado. Este material foi chamado de extrato bruto fervido (EBF).

#### **4.1.2 - Cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephadex G-100**

Para a purificação de cistatinas inicialmente foi utilizada uma coluna de exclusão molecular em uma matriz Sephadex G-100. Esta cromatografia foi realizada com o intuito de separar as proteínas por massa molecular. A separação foi feita em uma coluna de 1 cm de diâmetro com volume total de 130 mL de resina, que foi montada sob ação da gravidade, devidamente empacotada e equilibrada com 200 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M pH 7,0. O extrato proteico obtido da farinha de sementes secas foi aplicado na coluna, baseando-se na concentração de proteínas determinada, que será descrita no item 4.1.4. Frações de 1 mL foram coletadas, a um fluxo de 500 µL por minuto. As frações foram avaliadas para a presença de proteínas pela leitura óptica de suas absorbâncias em um espectrofotômetro a 280 nm.

#### 4.1.3 - Cromatografia de afinidade em CnBr-Sepharose 4B CM-Papaína

Papaína comercial (5 mg – Sigma/Aldrich Co.) foi dissolvida em 0,75 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 contendo EDTA 1 mM e DTT de modo a se obter uma solução final de 2 mM. Esta preparação foi mantida a 20° C durante 20 min, quando foi adicionado ácido iodo acético sólido para uma concentração final de 10 mM. A solução foi dialisada durante a noite contra bicarbonato de sódio 0,1 M pH 9,0 (ajustado com NaOH) (Barrett, 1981). Por este procedimento a papaína é convertida à sua forma carboximetilada (CM-papaína). Sepharose-4B ativada com CnBr (5 g) foi dissolvida em tampão fosfato de potássio 0,5 M pH 7,0. A Sepharose 4B ativada foi misturada à CM-papaína e mantida a 20° C por 15 h, sob leve agitação. Após este tempo, o gel foi filtrado e levemente agitado com glicina 0,1 M em bicarbonato de sódio 0,1 M por 1 h. Em seguida, o gel foi lavado com ácido acético 0,1 M pH 3,0, seguido de fosfato de sódio 0,1 M, pH 11,0 e fosfato de sódio 0,1 M com EDTA 1 mM, pH 7,0 (Barrett, 1981). Fosfato de sódio 0,1 M / NaCl 0,5 M pH 7,0 foi utilizado como tampão de equilíbrio durante a realização da cromatografia para fins de purificação das cistatinas de sementes secas. A fração enriquecida em atividade cistatínica, proveniente da cromatografia de exclusão anteriormente descrita (4.1.2), foi aplicada nesta resina. O tampão de eluição foi fosfato de sódio 50 mM / NaCl 0,5 M pH 11,5. O fluxo foi de 1ml/min e as frações coletadas foram avaliadas para a presença de proteínas pela leitura óptica de suas absorbâncias em um espectrofotômetro a 280 nm.

#### 4.1.4 - Determinação da concentração de proteínas

A quantificação total de proteínas das diversas amostras obtidas ao longo do processo de purificação foi baseada no método do ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985), usando-se ovalbumina comercial, como proteína de referência. Para a elaboração de uma curva padrão, utilizou-se a proteína mencionada em concentrações variando entre 0 e 10 µg, a intervalos de 2 µg. As concentrações foram avaliadas por leitura espectrofotométrica, sob comprimento de onda de 570 nm.

#### 4.1.5. - Atividade de proteases cisteínicas

O ensaio de atividade papainásica foi baseado em Michaud *et al.* (1994), utilizando azocaseína como substrato. Uma curva de atividade foi realizada com o intuito de se determinar a concentração ideal da papaína a ser utilizada nos ensaios de inibição desta enzima por cistatina. Para a obtenção dessa curva, 1 mg de papaína foram dissolvidos em 1 mL de tampão citrato-fosfato (citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio monobásico 100 mM, Triton X-100 0,1 %, DTT 1,5 mM pH 5,6). A azocaseína, substrato para a enzima, foi preparada a uma concentração de 1% em tampão citrato-fosfato.

Para o ensaio da curva de atividade, diferentes volumes (1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20  $\mu\text{L}$ ) da solução estoque (1mg/mL) da papaína, os quais correspondem a 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20  $\mu\text{g}$ , respectivamente, foram acrescidos de 80  $\mu\text{L}$  de azocaseína 1%, e de tampão citrato-fosfato em volume a perfazer um total de 120  $\mu\text{L}$ . O período de incubação foi de 1 h em banho-maria a 37° C. A reação foi parada com 300  $\mu\text{L}$  de TCA 10%. Os tubos foram centrifugados por 5 min a 10.600 x g. Em seguida, foram retirados 350  $\mu\text{L}$  do sobrenadante e a estes foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M. Os produtos da hidrólise foram avaliados por leitura espectrofotométrica, em comprimento de onda de 440nm.

#### 4.1.6. - Ensaio de atividade de inibição da papaína

Este ensaio foi realizado com o objetivo de investigar a presença e os níveis de atividades inibitórias do tipo cistatina nas amostras dos tecidos cotiledonares. Tal ensaio foi baseado em Michaud *et al.* (1994). As reações foram realizadas incubando-se 80  $\mu\text{L}$  de azocaseína 1% (em tampão citrato-fosfato), com 6  $\mu\text{L}$  de papaína (1mg/mL), e com volumes variáveis da fonte de inibidores. Tampão citrato-fosfato (detalhado em 4.1.5) é adicionado para perfazer um total de 400  $\mu\text{L}$  de solução de ensaio. Após a incubação a 37° C em banho-maria por 1 h, a reação foi parada pela adição de 300  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Logo em seguida, a solução foi centrifugada por 5 min a 10.600 x g e foram retirados 350  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, aos quais se adicionaram 300  $\mu\text{L}$  de NaOH 1M. As amostras finais foram avaliadas por leitura espectrofotométrica, em

comprimento de onda de 440 nm. Uma unidade de atividade inibitória (UAI) foi arbitrariamente definida como equivalente a uma redução de 0,01 unidade de absorvância da papaína controle, após a leitura em 440 nm.

#### **4.1.7- Visualização de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS**

As amostras proteicas foram ressuspensas em tampão de amostra (contendo SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol.), fervidas por 3 min, rapidamente centrifugadas e aplicadas em poços, no topo de um gel de concentração (“stacking gel”), para então serem submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS, segundo método descrito por Laemmli (1970). A eletroforese foi realizada em um sistema vertical Mini Protean II da BIORAD. A separação proteica procedeu-se sob uma corrente constante de 80 V nos primeiros 60 min e 100 V no tempo restante.

O gel foi corado em solução corante de azul brilhante de Coomassie G a 2% em água, metanol e ácido acético (6:3:1, v/v/v), por 6 h e descorado em solução descorante composta de água destilada, metanol e ácido acético na mesma relação de proporcionalidade usada na preparação da solução corante.

#### **4.1.8 - Visualização de proteínas por eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE**

As amostras proteicas foram ressuspensas em tampão de amostra (contendo SDS e  $\beta$ -mercaptoetanol), fervidas por 3 min, rapidamente centrifugadas e aplicadas em poços, de um gel de concentração (“stacking gel”), para então serem visualizadas por eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE segundo método descrito por Schagger e von Jagow (1987). A eletroforese foi realizada em um sistema vertical Mini Protean II da BIORAD. A separação protéica ocorreu sob uma corrente constante de 22 V por 18 h.

O gel foi corado em solução corante de azul brilhante de Coomassie G a 2% em água, metanol e ácido acético (6:3:1, v/v/v), e descorado em solução

composta de água destilada, metanol e ácido acético na mesma relação de proporcionalidade usada na preparação da solução corante.

#### **4.1.9- Eletrotransferência de proteínas do gel para membranas de PVDF**

As amostras da fração retida (R) da cromatografia de afinidade CnBr Sepharose 4B CM-papaína presentes no gel de tricina foram eletrotransferidas para uma membrana de PVDF. A membrana de PVDF foi ativada com metanol 100% durante 3 segundos, e em seguida lavada com água milli-Q por 2 minutos para eluir o metanol. A membrana foi lavada em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, 20% de metanol) e incubada neste tampão por 5 minutos. Em seguida, foi realizada a “montagem do sanduíche” (papel filtro + membrana de PVDF + gel + papel filtro) em um sistema para transferência. A transferência ocorreu na voltagem de 1 V a cada  $\text{cm}^2$  durante 2 h. Após a transferência, a membrana foi corada com o reagente de Ponceau 0,01 M, marcadas as bandas e lavadas com água milli-Q.

## **4.2- ATIVIDADE INSETICIDA DE CISTATINAS DE *Clitoria fairchildiana***

### **4.2.1- Atividade inibitória *in vivo* da cistatina contra *C. maculatus***

Os efeitos das cistatinas sobre o desenvolvimento dos insetos foram examinados através de testes de alimentação, utilizando-se um sistema de sementes artificiais (Macedo *et al.*, 1993). Para preparo das sementes artificiais, foi utilizada farinha de feijão-de-corda, misturada a cinco concentrações: 0,05%, 0,1%, 0,5%, 1% e 2% da proteína isolada, as quais foram misturadas à farinha com ajuda de almofariz e pistilo. Cada semente foi produzida em um molde de cobre (10 mm de diâmetro), totalizando 400 mg, e com a ajuda de um compressor manual. Em tubos de ensaio individuais, foram colocadas uma semente e duas fêmeas adultas do bruquídeo, com dois dias de idade, por um período de 24 h a 28° C. Após esse período, as sementes foram desinfetadas, o número de ovos postos foi contabilizado e o excesso de ovos foi removido com o auxílio de uma agulha fina, deixando-se apenas três ovos por semente. Cada concentração citada anteriormente foi usada para a análise

do efeito de cistatinas sobre o desenvolvimento das larvas. Após vinte dias, as sementes foram abertas e as larvas sobreviventes foram contadas e pesadas. A massa e o número de larvas foram comparados com os de larvas de mesma idade que se desenvolveram nas sementes controle, que consistiram de sementes contendo apenas 400 mg de farinha de *Vigna unguiculata*.

#### **4.2.2 - Preparação dos extratos de homogenatos intestinais de *C. maculatus***

Homogenatos intestinais dos bruquídeos foram preparados, inicialmente, pela dissecação de intestinos de larvas de vinte dias, alimentadas com as sementes artificiais. Para tanto, os intestinos médios foram colocados em tampão PBS (NaCl 0,15 M/Fosfato de sódio 0,1 M pH 7.6). O tecido do intestino foi macerado e centrifugado por 15 min a 20.000 x g a 4° C e o sobrenadante dessa suspensão foi usado nos ensaios de quantificação de atividade de proteases cisteínicas (item 4.1.5) e visualização eletroforética de tais atividades (item 4.1.7).

#### **4.2.3. - Visualização de atividades de proteases cisteínicas dos insetos por zimografia**

As suspensões enzimáticas dos homogenatos intestinais dos insetos foram visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (15%) na presença de SDS, contendo gelatina em uma concentração de 0,1%, baseado na metodologia descrita por Heussen e Dowdle (1980). De uma solução concentrada de gelatina (1%), uma alíquota foi utilizada de forma a alcançar-se uma concentração final de 0,1% de gelatina, na composição do gel. A separação proteica ocorreu sob uma corrente constante de 80 V. Após a corrida eletroforética, o gel foi lavado com Triton X-100 2,5 % duas vezes por 30 min cada; logo após, o gel foi incubado em tampão citrato de sódio 100 mM, fosfato de sódio 100 mM, DTT 1,5 mM e Triton X-100 0,1 % pH 5,6 em banho-maria a 37<sup>0</sup> C durante 7 h. Posteriormente, o gel foi corado com Coomassie Brilhante Blue R 2% e então descorado com uma solução de

metanol: ácido acético : água (40:10:50, v/ v/ v), respectivamente. As bandas de atividade apareceram brancas em fundo azul.

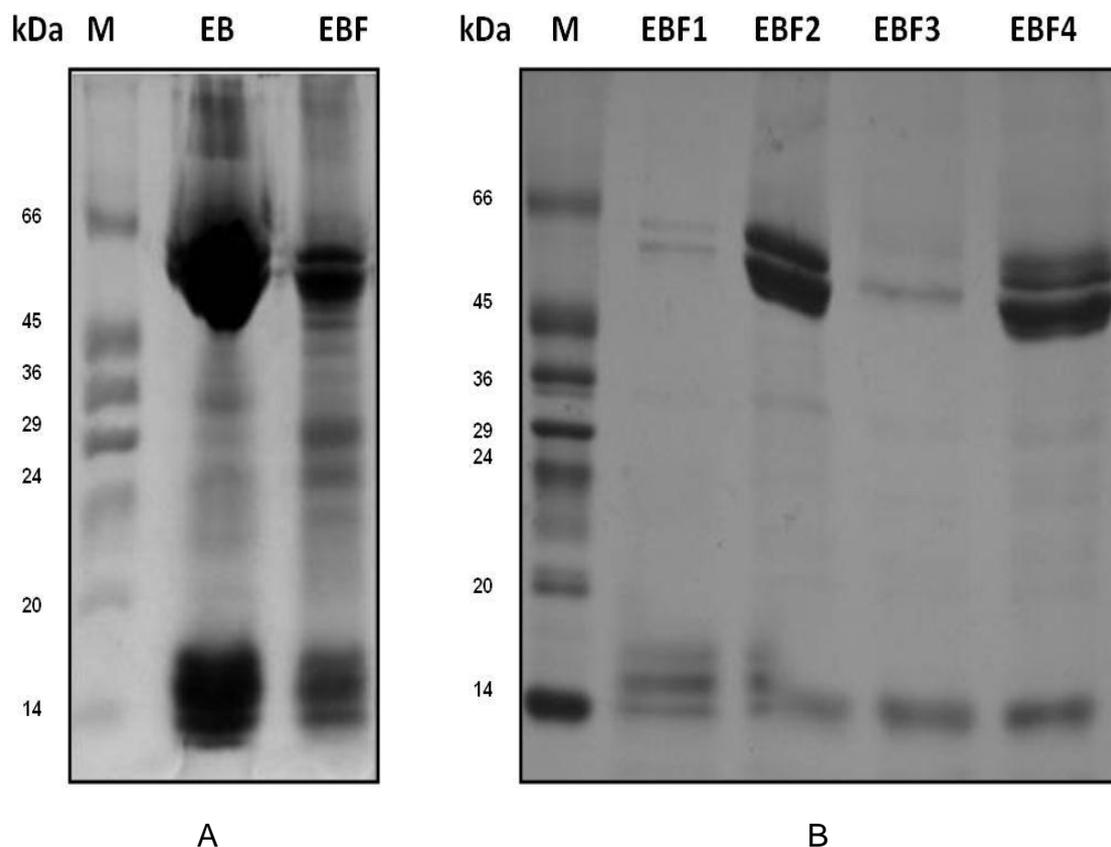
## 5 – RESULTADOS

### 5.1 - PURIFICAÇÃO DE CISTATINAS DE *Clitoria fairchildiana*

#### 5.1.1- Avaliação eletroforética do processo de extração protéica de cotilédones de *Clitoria fairchildiana*

Após a extração de proteínas da farinha de cotilédones de *Clitoria fairchildiana*, foi mensurado o teor proteico do extrato bruto não fervido (EB) e após a fervura a 100°C por 10 min (EBF). A concentração de proteínas do EB foi de 596 µg/mg de pó de extrato. Uma vez submetido à fervura, o teor de proteínas do EBF foi de 452 µg/mg de pó. Feito isso, essas amostras foram utilizadas no ensaio de atividade de inibição da papaína, para verificar qual extrato bruto (fervido ou não) apresentava maior taxa de atividade inibitória da papaína: o EB apresentou atividade de 0,39 UI específica, enquanto o EBF apresentou 0,61 UI específica (Tabela 2). Portanto, EBF teve um incremento da taxa de atividade inibitória da papaína por massa de proteína de mais de 55% quando comparado ao EB.

A figura 4A mostra o resultado da visualização eletroforética em gel de poliacrilamida (12%) na presença de SDS das proteínas extraídas e presentes no EB e EBF. No EB, foi possível observar a presença de várias proteínas. As bandas majoritárias provavelmente representam subunidades das proteínas oligoméricas de reserva, as vicilinas, de espécies de leguminosas, com massa molecular de entre 66 e 45 kDa (Figura 4A). A figura 4B mostra o perfil protéico do EBF após diferentes tratamentos das amostras: EBF1 (sem β-mercaptoetanol e fervido por 3 min); EBF2 (sem β-mercaptoetanol e sem ferver); EBF3 (com β-mercaptoetanol e fervido por 3 min); EBF4 (com β-mercaptoetanol e sem ferver). Foi possível observar que o tratamento de EBF1 (sem β-mercaptoetanol e com fervura por 3 min) favoreceu a visualização de proteínas de baixa massa molecular, na faixa aproximada de 14 kDa.



**Figura 4:** Visualização dos perfis proteicos por eletroforese em gel de poliacrilamida (12%). M= marcador de massa molecular de 14 a 66 kDa. Em A: Extrato bruto sem ferver (EB) e extrato bruto fervido (EBF). Em B: EBF1; extrato bruto sem  $\beta$ -mercaptoetanol e fervido; EBF2: sem  $\beta$ -mercaptoetanol e sem ferver; EBF3: com  $\beta$ -mercaptoetanol e fervido; EBF4: com  $\beta$ -mercaptoetanol e sem ferver.

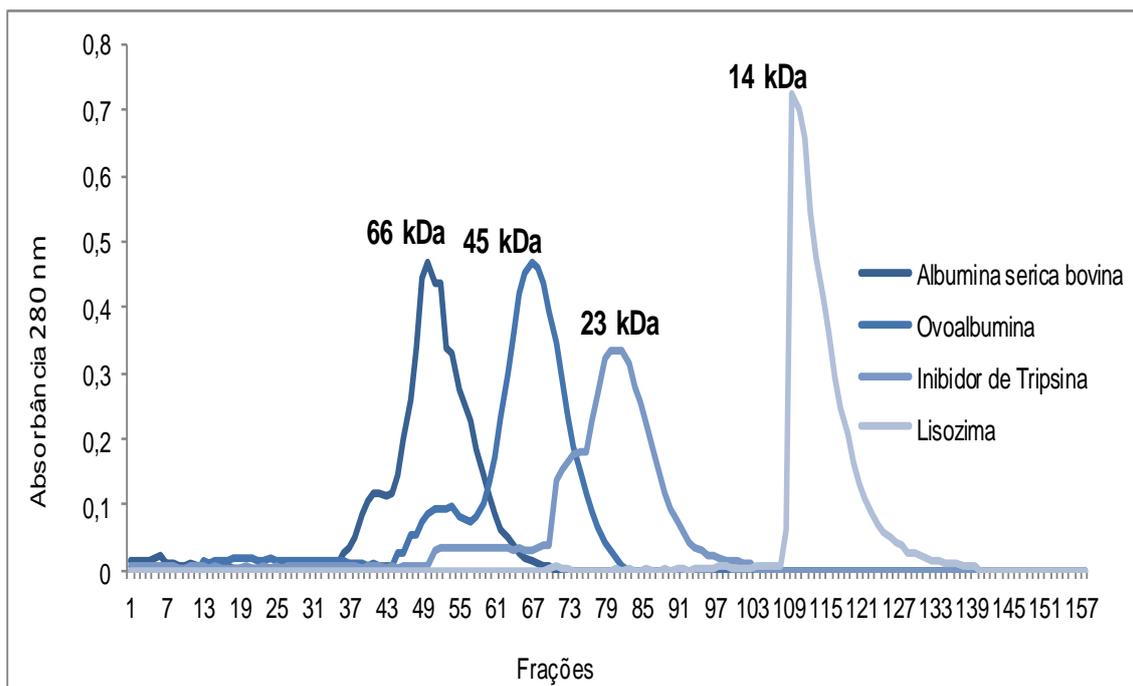
### 5.1.2 - Perfil cromatográfico de EBF submetido à cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephadex G-100

Os perfis cromatográficos das proteínas albumina sérica bovina (BSA) de 66 kDa, ovoalbumina de 45 kDa, inibidor de tripsina de 23 kDa e lisozima de 14 kDa, usadas como calibradores de separação de proteínas por massa

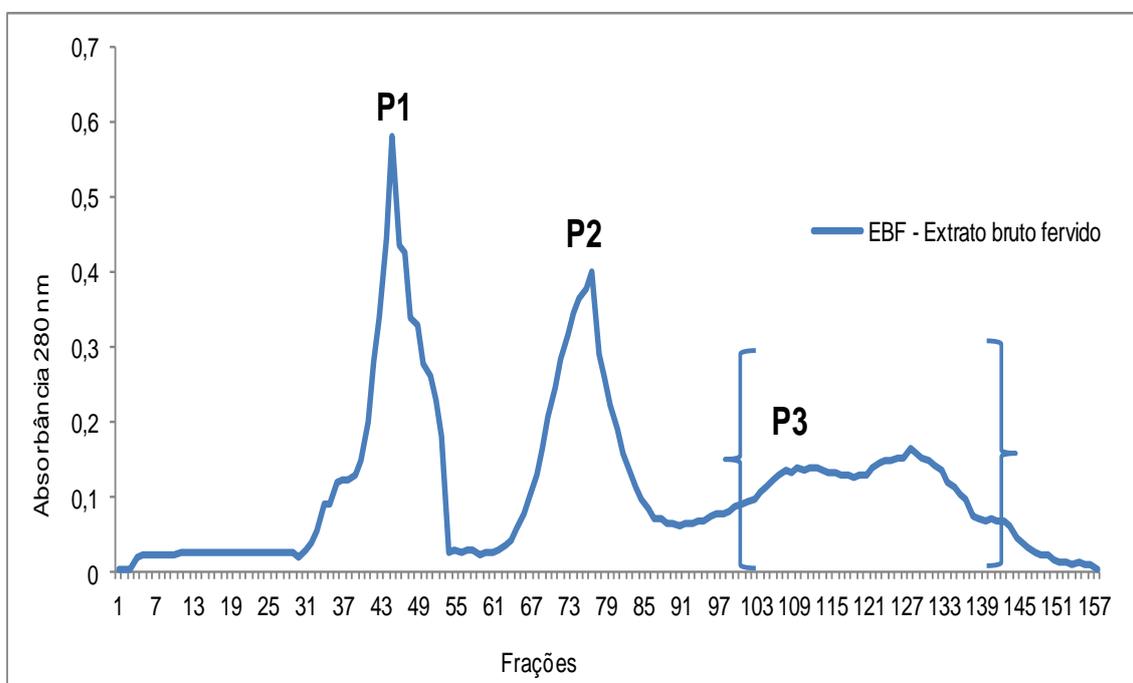
molecular na resina de Sephadex G-100, estão mostrados na figura 5. Esta etapa foi realizada com o intuito de obter um perfil cromatográfico de um padrão de proteínas de massas moleculares conhecidas.

A figura 6 mostra o perfil obtido a partir da separação do EBF (25 mg/mL) de cotilédones de *C. fairchildiana*. Na separação de EBF notam-se as três frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular, denominadas P1, P2 e P3. Essas frações foram acumuladas durante os processos cromatográficos, e tiveram seus teores proteicos mensurados: o P1 apresentou 139 µg/mg; P2 apresentou 201 µg/mg e o P3 apresentou 135 µg/mg (Tabela 2). Foram acumulados por repetidas passagens de EBF por essa cromatografia de exclusão molecular, conseguindo-se, ao final, as seguintes quantidades: P1 - 930 mg de massa total; P2 - 1.060 mg de massa total; P3 - 1.390 mg de massa total (Tabela 2).

As frações P1, P2 e P3 foram ainda submetidas a ensaios de atividade de inibição da papaína, para verificar qual ou quais frações apresentavam maiores taxas de atividade inibitória da papaína: P1 apresentou atividade específica de 0,55 UI; P2, 0,76 UI; P3, 2,25 UI (Tabela 2). Portanto, P3 apresentou a maior taxa de atividade inibitória da papaína por massa de proteína.



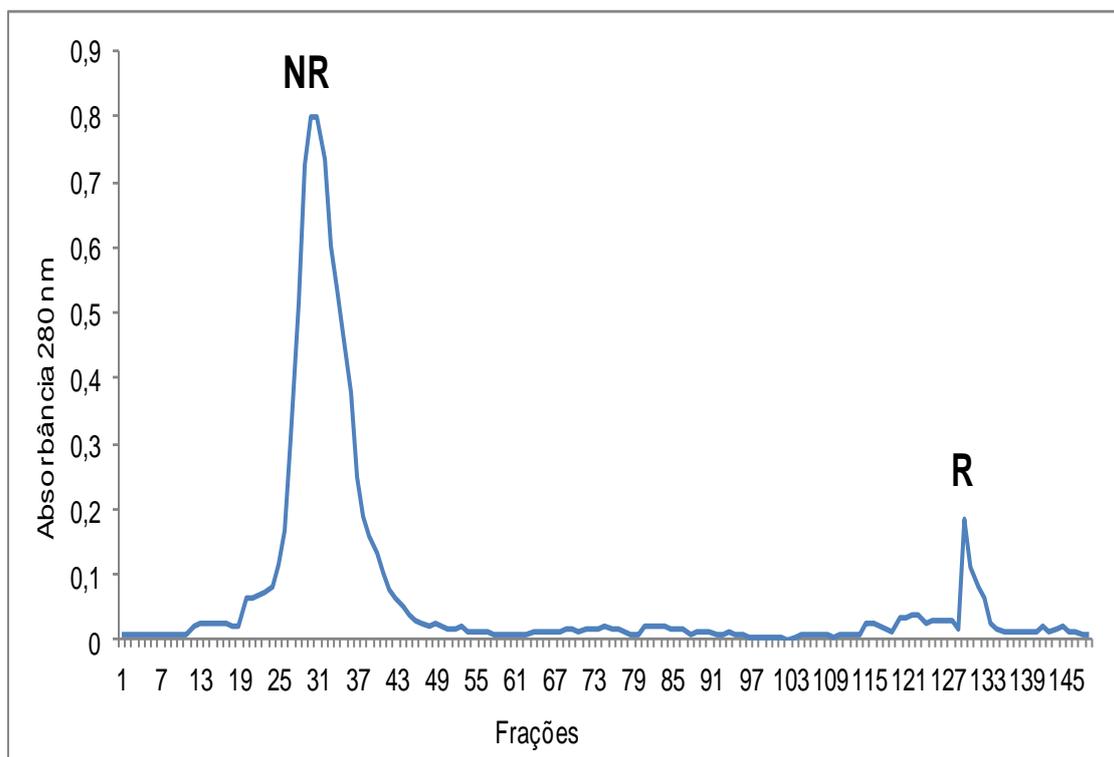
**Figura 5:** Perfil da cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephadex G-100 de separação das proteínas de calibração, albumina sérica bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), inibidor de tripsina (23 kDa) e lisozima (14 kDa).



**Figura 6:** Perfil da cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephadex G-100 do EBF de *C. fairchildiana* (25 mg/ml).

### 5.1.3 – Cromatografia de afinidade em CnBr-Sepharose 4B CM-papaína usando o P3 da exclusão molecular

O pico (P3) da cromatografia de exclusão molecular apresentou o comportamento mostrado na figura 7, quando submetido à cromatografia de afinidade em coluna de CnBr-Sepharose 4B CM-papaína. A majoritária porção proteica do P3 não ficou retida na resina (pico NR) e apenas uma pequena fração foi eluída com pH 11,5 (pico R). As frações foram quantificadas quanto ao teor proteico e foram testadas quanto à sua atividade inibitória de papaína. A fração NR com 100 µg de proteína obteve uma atividade específica menor que 1 UI (0,25 UI). A fração R apresentou uma maior taxa de atividade específica que a fração NR (6,27 UI). A massa total do NR acumulado foi de 450 mg e de 180 mg para a fração R (Tabela 2).



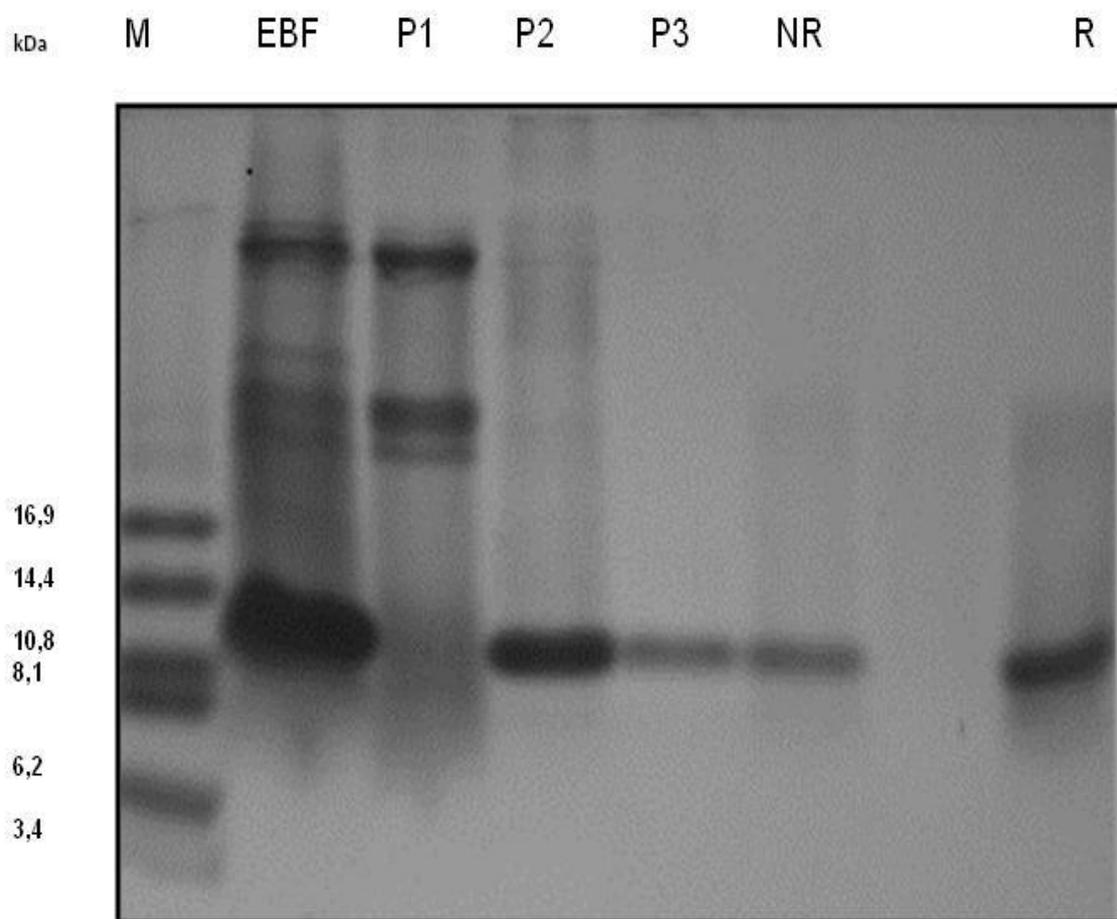
**Figura 7:** Cromatografia de afinidade em CnBr-Sepharose 4B CM-papaína da fração P3 (30 mg/ml). Tampão de equilíbrio fosfato de sódio 0,1M / NaCl 0,5M pH 7,0 e tampão de eluição fosfato de sódio 0,05M / NaCl 0,5M pH 11,5. Fluxo de 1,5 ml/min.

#### **5.1.4 - Visualização eletroforética das proteínas do extrato bruto (EB), dos picos obtidos na cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-100 (P1, P2 e P3) e na cromatografia de afinidade CnBr-Sepharose 4B CM-papaína (NR e R)**

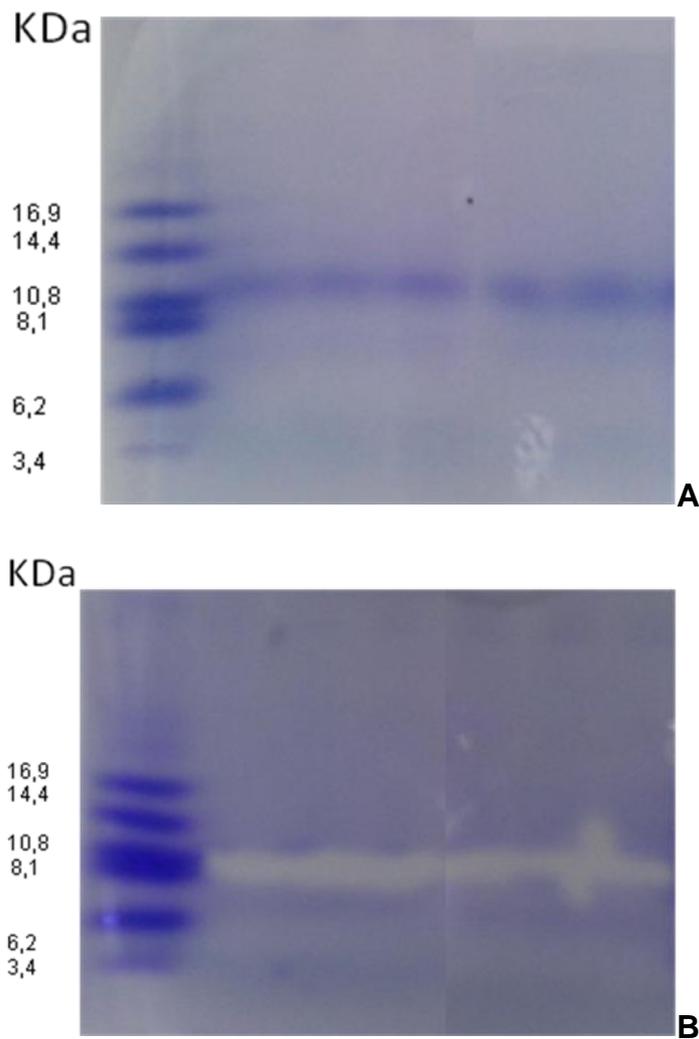
A Figura 8 mostra o resultado da eletroforese em gel de tricina, que teve como objetivo a visualização dos perfis proteicos do extrato bruto fervido (EBF), dos picos obtidos na cromatografia de exclusão molecular e na cromatografia de afinidade. Em P1 aparecem as bandas majoritárias que representam subunidades das proteínas oligoméricas de reserva, tipicamente leguminas e vicilinas, de espécies de leguminosas, com massas moleculares entre 100 e 80 kDa, as primeiras, e entre 66 e 45 kDa, as segundas. Nos picos P2 e P3 foi possível observar a presença de banda de baixa massa molecular de aproximadamente 12 kDa. No entanto, em P3 não foram visualizadas outras bandas protéicas, ao contrário do que ocorre em P2. Tal proteína de ~12 kDa esteve presente tanto na fração NR como na R, indicando a capacidade da resina de afinidade em reter tal proteína, mas sugerindo que a quantidade de proteína aplicada na coluna saturou a capacidade de retenção da coluna.

Esta proteína purificada foi recortada de um gel SDS-PAGE, em que todos os poços foram preenchidos com a fração R (figura 9). A faixa de gel foi enviada para o Laboratório de Toxinologia do Instituto Oswaldo Cruz, para ser submetida à análise por espectrometria de massas. Esta etapa conta com a colaboração dos Drs. Jonas Perales e André da Silva Teixeira Ferreira e ainda não foi concluída.

Alternativamente, a fração R foi submetida a eletrotransferência para uma membrana de PVDF e está sendo presentemente analisada por sequenciamento automático em sequenciador Shimadzu PPSQ-33<sup>a</sup> Protein Sequencer (Pharmacia Biotech Multiphor Novablot Unit) para elucidação da sequência N-terminal da proteína, seguindo metodologia descrita por Edman (1950). Esta etapa do trabalho contou com a colaboração da Profa. Olga Lima Tavares Machado, do LQFPP-CBB-UENF.



**Figura 8:** Visualização de frações proteicas obtidas ao longo do processo de purificação por eletroforese em gel de Tricina-SDS-PAGE. Poços: M - marcadores de massa molecular de 16,9 a 3,4 kDa; EBF - Extrato bruto fervido; Frações obtidas nas cromatografias de exclusão molecular em Sephadex G-100 (P1, P2 e P3); Frações não retida (NR) e retida (R) na cromatografia de afinidade em CnBr-Sepharose 4B CM-papaína.



**Figura 9:** Visualização da fração retida (R) da cromatografia de afinidade CnBr Sepharose 4B CM-Papaína em gel de Tricina-SDS-PAGE, antes (A) e depois (B) de recortada do gel para extração e envio para sequenciamento por espectrometria de massas.

### 5.1.5 – Acompanhamento das etapas de purificação de inibidor de proteases cisteínicas das sementes de *Clitoria fairchildiana*

A tabela 2 mostra todas as quantificações relativas às frações obtidas ao longo do processo de purificação de cistatinas, incluindo dados como massa total acumulada de cada fração, o teor de proteína total acumulado, o número de unidades inibitórias (UI) total, os valores de atividade específica (UI / mg de proteína) e ainda os valores do rendimento do processo e a dimensão da purificação.

O pico P1 apresentou 71.238 UI; essa fração foi desprezada, pois, como mostrado na tabela 2, o nível de purificação foi menor que 1 (0,9 x), indicando que, nela, o inibidor está mais contaminado com outras proteínas que em EBF (1 x). O P2 apresentou 162.180 UI, equivalentes a uma atividade específica de 0,76 UI/mg proteína. Isto indica, como mostrado na tabela 2, um aumento de 1,24 x no nível de purificação em relação ao EBF e um rendimento de 16,41 %. A fração P3 de proteínas de baixo peso molecular apresentou 423.950 UI, equivalentes a uma atividade específica de 2,25 UI/mg proteína, a um nível de purificação de 3,68 x e a um rendimento de 42,91 %. A fração P3 mostrou, portanto, a maior atividade específica em relação aos demais picos (P1 e P2), sendo este o critério mais importante na seleção desta fração para aplicação na próxima etapa de purificação, a cromatografia de afinidade (Tabela 2).

A fração não retida (NR) na coluna de afinidade apresentou 3.224,7 UI e atividade específica de 0,25 UI/mg proteína, enquanto a fração retida (R) apresentou 73.440 UI e atividade específica de 6,27 UI/mg proteína. Portanto, em NR o nível de purificação foi de 0,40 x e em R de 10,27 x (Tabela 2). O rendimento final do processo de purificação do inibidor na fração R foi de 7,43% em relação à concentração inicial no EBF.

**Tabela 2:** Acompanhamento da purificação de cistatinas de sementes de *Clitoria fairchildiana*

Etapas de purificação	Massa total (mg)	Proteína ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ de farinha)	Proteína total (mg)	Atividade inibitória (UI/mg de farinha)	Atividade inibitória Total (UI)	Atividade específica (UI/mg proteína)	Purificação (X)	Rendimento (%)
EB	5.325	678	3.610,35	238	1.267,350	0,35	< 1	< 100
EBF	3.550	452	1.541,3	278,3	987.965	0,61	1	100
P1	930	139	129,27	76,6	71.238,6	0,55	0,55	0,9
P2	1.060	201	213,06	153	162.180	0,76	1,24	16,41
P3	1.390	135	187,6	305	423.950	2,25	3,68	42,91
NR	450	100	45	71,66	3.224,7	0,25	0,40	0,32
R	180	65	11,70	408	73.440	6,27	10,27	7,43

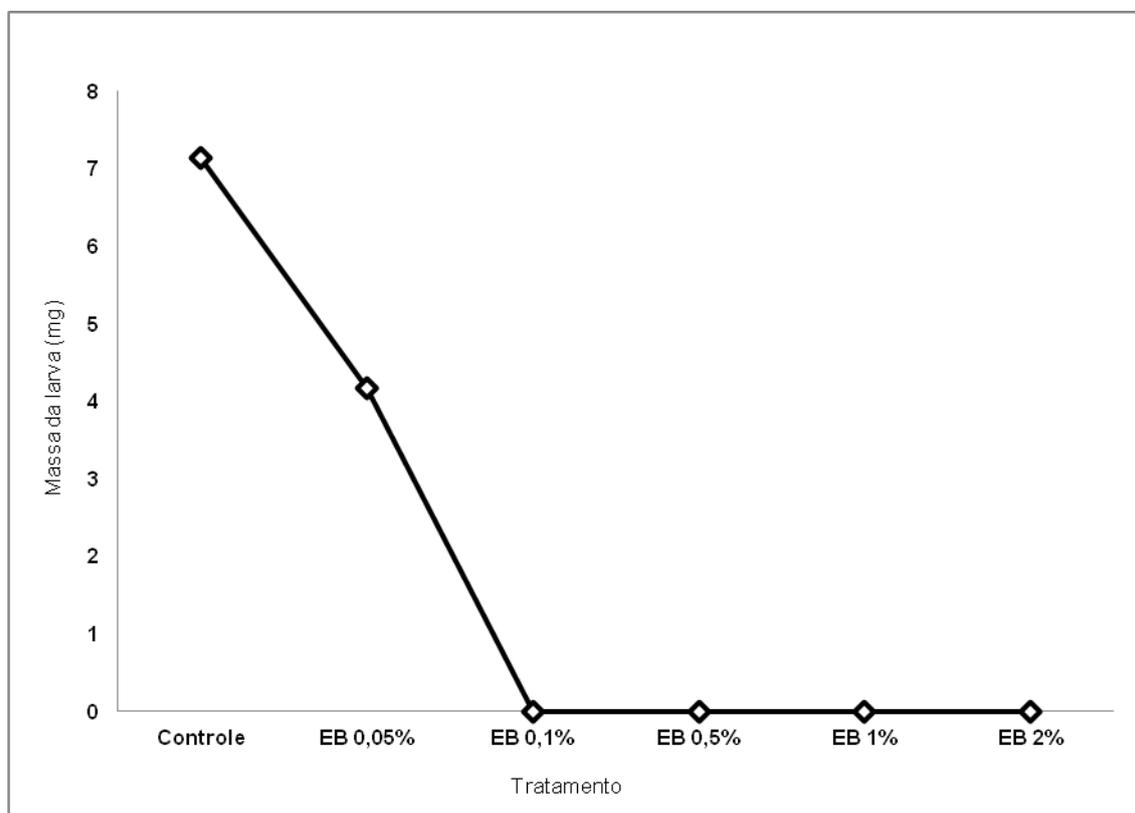
## 5.2. – ATIVIDADE INSETICIDA DE CISTATINAS DE COTILÉDONES DE *Clitoria fairchildiana* CONTRA *Callosobruchus maculatus*

### 5.2.1- Atividade inibitória *in vivo* do extrato bruto fervido (EBF) e fração R sobre o desenvolvimento larval de *Callosobruchus maculatus*

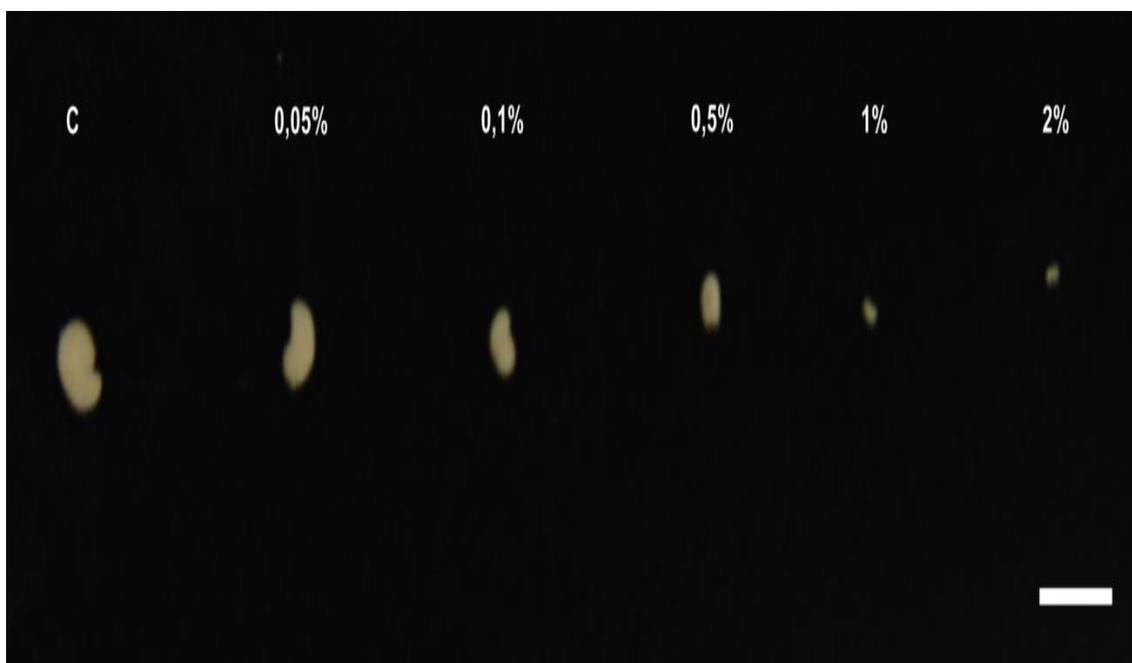
A atividade inibitória da fração retida (R) da cromatografia de afinidade sobre o desenvolvimento larval de *C. maculatus* foi avaliada por testes *in vivo*. Crescentes concentrações de EBF na dieta artificial dos insetos bruquídeos diminuíram consideravelmente a massa das larvas de 20 dias de desenvolvimento (Figura 10). Nas larvas controle a média da massa foi de 7,13 mg e das larvas alimentadas com 0,05%, a menor concentração testada, foi de 4,70 mg, um decréscimo de 35 % na massa da larva (Figura 10). As demais concentrações (0,1 %, 0,5 %, 1 % e 2 %) afetaram, em 100%, a sobrevivência larval.

Também foi visto o efeito da fração R da cromatografia de afinidade CnBr Sepharose 4B CM-papaína no desenvolvimento das larvas de *C. maculatus*, utilizando sistema de sementes artificiais, e os resultados mostram (Figuras 11 e 12) que ao aumentar a concentração de R, a massa das larvas diminuía consideravelmente. Quando foram incorporadas, na dieta artificial, concentrações da fração Retida (R), a média da massa das larvas alimentadas com 0,05% foi de 6,13 mg (uma redução de 14 % em relação ao controle); a das larvas alimentadas com 0,1%, foi de 4,40 mg (redução de 38 %); a das larvas alimentadas com 0,5 %, foi de 2,20 mg (redução de 69 %); para as larvas alimentadas com as concentrações de 1% e 2%, foi de zero, pois não houve massa significativa nas larvas alimentadas com a fração R nestas concentrações (figura 12).

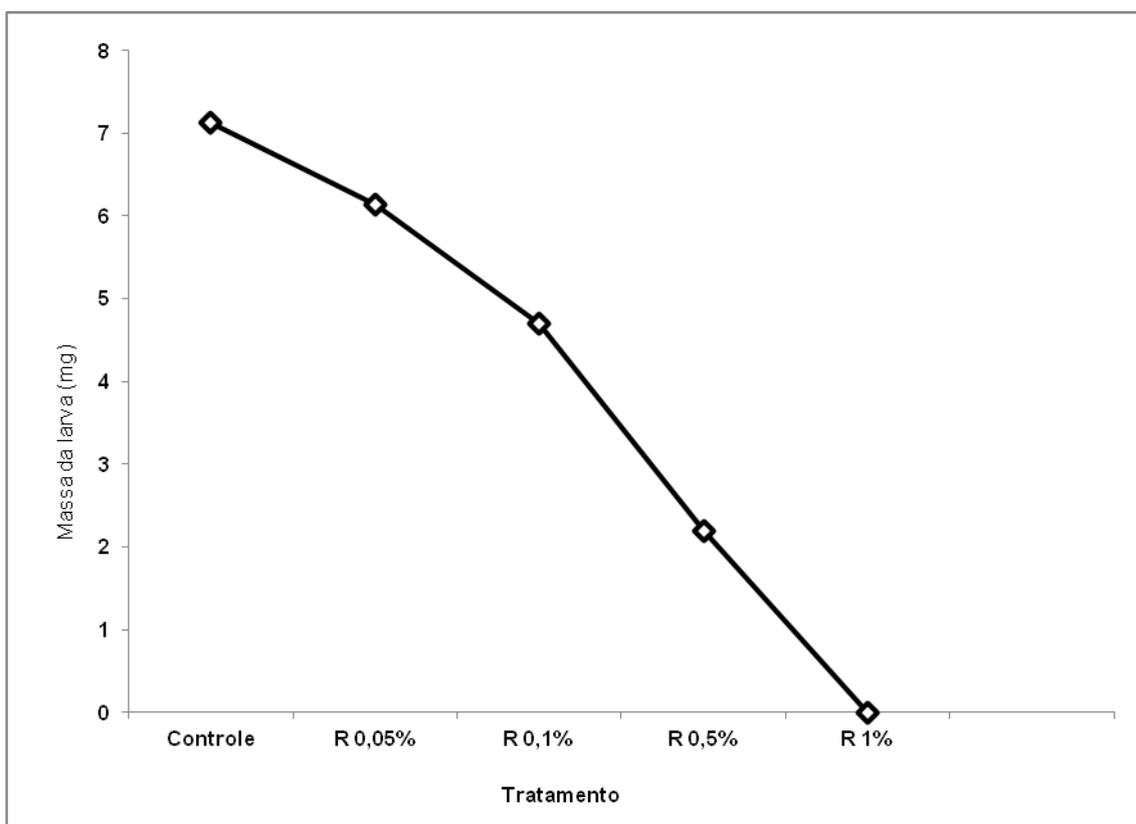
Uma amostragem da aparência de uma larva sobrevivente em cada uma das concentrações da fração R pode ser visualizada na figura 11.



**Figura 10:** Efeito do extrato bruto fervido (EBF) nas larvas com 20 dias de desenvolvimento. Sementes foram preparadas utilizando-se farinha de *Vigna unguiculata* incorporada com diferentes concentrações de EBF (0,05%, 0,1%, 0,5%, 1% e 2%). Cada valor representa a média das massas das larvas para cada concentração.



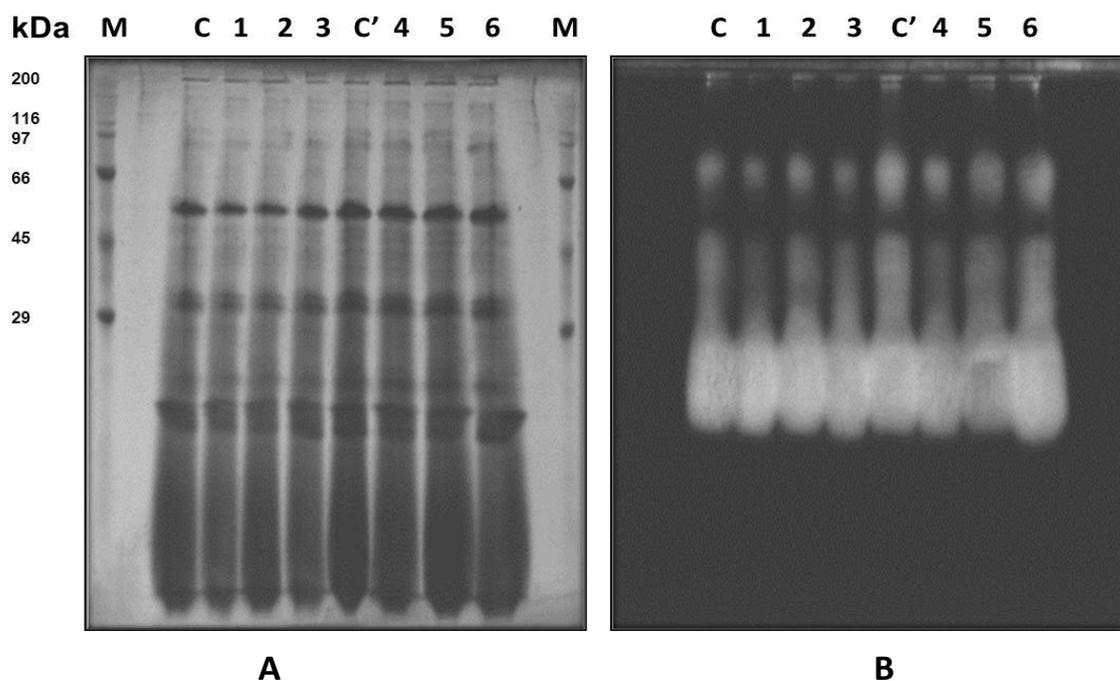
**Figura 11:** Visualização das larvas de *Callosobruchus maculatus* alimentadas com crescentes concentrações da fração R da cromatografia de afinidade CnBr Sepharose 4B CM-papaína. C= Controle (larvas alimentadas somente com farinha de feijão); concentrações da fração R (0,05%, 0,1%,0,5%, 1% e 2%). A barra de referência no canto inferior da figura equivale a 0,5 cm.



**Figura 12:** Efeito da fração Retida (R) obtida da cromatografia de afinidade CnBr-Sepharose 4B CM-papaína nas larvas com 20 dias de desenvolvimento. Sementes foram preparadas utilizando-se farinha de *Vigna unguiculata* incorporada com diferentes concentrações de R (0,05%, 0,1%, 0,5%, 1%). Cada valor representa a média das massas das larvas para cada concentração.

### 5.2.2- Visualização das atividades de proteases cisteínicas dos insetos por zimografia

As atividades das proteases digestivas dos insetos foram visualizadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % na presença (Figura 13 A) e ausência de gelatina 0,1 % (Figura 13B). As suspensões enzimáticas dos homogenatos intestinais das larvas de 20 dias, alimentadas com as diversas sementes artificiais contendo 0,05 %, 0,1 % e 0,5 % da fração R, foram aplicadas no gel. Observa-se que as amostras do homogenato intestinal de larvas alimentadas com 0,05 %, 0,1 % e 0,5 % da fração R, apresentaram bandas de atividade com intensidade ligeiramente menores, quando comparadas às visualizadas nas amostras-controle. A concentração de 0,05 % apresentou maior nível de inibição que as demais concentrações (0,1 % e 0,5 %). Tanto nos poços com 8  $\mu$ L como 16 $\mu$ L de amostras, as atividades apresentaram-se com níveis similares (figura 13B). A concentração de amostra do homogenato foi de um (01) intestino para cada 15  $\mu$ L de tampão PBS. Também foi possível visualizar uma aparente redução de atividade proteolítica nas demais concentrações (0,1 %, 0,5 %), mas não tão evidente. Acreditamos que o fato de ter sido constatado apenas pequena variação de atividades proteolíticas entre as amostras possa estar correlacionado com demasiada concentração de proteínas nas amostras do homogenato intestinal aplicadas no gel, o que levou a sobreposição de atividades de outras proteases além das proteases cisteínicas, que também atuam em pH 5,6.



**Figura 13:** Perfis proteicos de homogenatos intestinais de larvas de *Callosobruchus maculatus* visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida (15 %) na presença de SDS (A) e SDS contendo gelatina 0,1 % (B). As larvas foram alimentadas com as concentrações da fração R (0,05 %, 0,1 %, 0,5 %), incorporadas em sementes artificiais. Em A: SDS-PAGE. M= marcador de massa molecular de 200 a 29 kDa; C= Controle (Larvas alimentadas somente com farinha de *Vigna unguiculata*) (8  $\mu$ L); 1= 0,05 % da fração R (8  $\mu$ L); 2=0,1% da fração R (8  $\mu$ L); 3= 0,5 % da fração R (8  $\mu$ L); C'= Controle (Larvas alimentadas somente com farinha de *Vigna unguiculata*) (8  $\mu$ L).

## 6 - DISCUSSÃO

Neste trabalho, foram demonstradas as etapas de purificação, através de métodos cromatográficos, de cistatinas de sementes de *Clitoria fairchildiana*, bem como o estudo da atividade inibitória de frações enriquecidas com inibidor de proteases cisteínicas, através da alimentação artificial do inseto bruquídeo *Callosobruchus maculatus*, utilizando diferentes concentrações da fração enriquecida de cistatina.

Para tal, farinha de cotilédones de *C. fairchildiana* foi despigmentada e submetida à extração de proteínas. Em seguida, o extrato foi fervido por 10 min, com o propósito de se eliminarem enzimas que poderiam estar complexadas aos inibidores de interesse, bem como desnaturar proteínas termolábeis, representando um processo inicial de purificação antes dos processos cromatográficos. O teor proteico no EBF diminuiu em 24,2 % comparado ao teor proteico no EB, antes da fervura. Esse passo preliminar de purificação foi também adotado no trabalho de Rassa e Laing, em 2004, que submeteram o extrato bruto a aquecimento a 60°C por 10 min na etapa inicial de purificação de cistatinas de sementes e do córtex de kiwi, *Actinidia deliciosa*.

O extrato proteico fervido (EBF) de cotilédones de *C. fairchildiana* passou por várias etapas de purificação incluindo cromatografia de exclusão molecular em matriz Sephadex G-100 e cromatografia de afinidade em CnBr-Sepharose 4B CM-papaína. Os efeitos das cistatinas contidas nas amostras sobre a atividade da papaína (protease controle) foram determinados por ensaios *in vitro*. Processos de purificação de cistatina por métodos cromatográficos semelhantes também foram relatados para isolar, por exemplo, cistatinas de sementes de arroz, denominadas orizacistatinas (Abe *et al.*, 1991), as primeiras cistatinas isoladas de plantas. No trabalho de Abe *et al.* (1991) foi descrita uma série de cromatografias que consistiram de uma cromatografia de troca iônica CM-Sephadex C-50, cromatografia de exclusão molecular Sephadex G-75 e troca iônica DEAE-Sephadex A-50. A cistatina isolada de sementes de arroz apresentou massa molecular de aproximadamente 12.000 daltons, ponto isoelétrico 5,3 e demonstrou estabilidade a 100 °C e em pHs entre 2,2 e 9,0. A inibição da papaína (protease controle) foi do tipo não-competitiva.

O EBF de cotilédones de *C. fairchildiana* apresentou um teor proteico de aproximadamente de 45%, e na visualização do perfil proteico foi possível observar a presença de várias cadeias polipeptídicas (figura 5). As maiores bandas representam provavelmente subunidades das proteínas oligoméricas de reserva, como leguminas (11S) e vicilinas (7S), típicas de espécies leguminosas (Osborne, 1924), com massas moleculares de cerca de 80 a 100 e 45 a 66 kDa, respectivamente. Também observaram-se bandas proteicas de baixa massa molecular de cerca de 12 kDa. Na figura 7B vê-se o extrato bruto submetido a diferentes tratamentos com  $\beta$ -mercaptoetanol e aquecimento. Foi visto que o tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol e fervura por 3 min favoreceu a visualização de proteínas de baixas massas moleculares presentes no EBF. Já o tratamento com  $\beta$ -mercaptoetanol não seguido de fervura favoreceu a visualização de bandas de proteínas de altas massas moleculares, mas não separou, com nitidez, bandas proteicas de baixas massas moleculares.

O EBF de cotilédones de *Clitoria* foi submetido a seguidas cromatografias de exclusão molecular em matriz Sephadex G-100, para separação de proteínas por massa molecular. Três picos principais foram identificados (P1, P2 e P3), os quais foram submetidos a medições de seus teores proteicos e de sua capacidade de inibição da papaína. Em todos os picos, detectou-se certo nível de atividade inibitória; no entanto, a atividade específica foi maior no pico P3, como visto na tabela 2.

Na fração P3 visualizaram-se proteínas de baixo peso molecular, faixa em que seria provável encontrarem-se as fitocistatinas de 12-16 kDa, mais comumente isoladas (Abe *et al.*, 1987; Fernandes *et al.*, 1993; Kouzuma *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 2011). Visto que a fração P3 foi altamente enriquecida com atividade inibitória de papaína, esta foi submetida a uma série de cromatografias de afinidade em CnBr-Sepharose-4B CM-papaína, obtendo-se então as frações não retidas nessas cromatografias (NR) e as frações retidas (R), as quais foram acumuladas durante o processo de purificação. O perfil eletroforético destas frações é mostrado na figura 8.

A fração retida na coluna de afinidade foi submetida a ensaios de atividade de inibição da papaína, para confirmar a presença de cistatina na fração. Para visualizar a presença de cistatina na fração retida da cromatografia de afinidade, foi realizada eletroforese em gel de tricina-SDS-

PAGE, adequado para visualizar proteínas com baixo peso molecular. Foi possível observar uma única banda protéica de massa molecular aproximada de 12 kDa (Figura 8). Esta proteína está sendo atualmente avaliada por espectrometria de massas e sequenciamento N-terminal para ser confirmada sua identidade como uma fitocistatina. No entanto, como a última etapa de purificação tratou-se de uma cromatografia de afinidade utilizando a enzima papaína como ligante, método considerado de alta especificidade para retenção desta classe de inibidor, seguimos com a etapa de avaliação da atividade inseticida da fração R contra *Callosobruchus maculatus*. Diversos trabalhos mostram a purificação de cistatinas de sementes de espécies, como por exemplo: *Glycyne max* (Hines *et al.*, 1991; Misaka *et al.*, 1996); *Carica papaya* (Song *et al.*, 1995); *Helianthus annuus* (Kouzuma *et al.*, 1996, 2000, e 2001); *Triticum spp* (Corre-Menguyet *et al.*, 2002); *Sesamum indicum* (Shyu *et al.*, 2004); *kiwi* (Rassam e Laing, 2004); *Hordeum vulgare* (Martinez *et al.*, 2005); *Phaseolus mungo* (Sharma *et al.*, 2006) e sementes de *Vigna vexillata* (Cunha, 2007).

Os passos iniciais de purificação das fitocistatinas das sementes de *Clitoria fairchildiana* foram similares ao trabalho de Rassam e Laing (2004) que isolaram um inibidor de proteases cisteínicas de sementes de kiwi. No trabalho, o extrato bruto de sementes de kiwi também foi aplicado em coluna cromatográfica de exclusão molecular, porém em uma Sephadex G-75, e as frações inibitórias da papaína foram agrupadas, concentradas e purificadas posteriormente por uma coluna de afinidade à papaína. As cistatinas eluídas da coluna foram ainda separadas em uma coluna Hitrap SP, gerando um pico maior e outros três picos menores. Esses três picos menores foram separadamente agrupados e separados por uma coluna C-18 em HPLC. O gel corado com prata mostrou uma banda proteica de baixa massa molecular de 11 kDa. Kouzuma *et al.*, em 1996, isolaram dois inibidores de proteases cisteínicas (Sca e Scb) de baixos pesos moleculares, de sementes de girassol (*Helianthus annuus*). A purificação foi resultado de uma série de cromatografias: exclusão molecular em Sephadex G-75, troca-iônica em DEAE-Celulose, troca iônica em Q-Sepharose, S-Sepharose, afinidade em CM-Celulose e RP-HPLC de fase-reversa C<sub>4</sub> em gel YMC. No trabalho de Abe *et al.* (1987), foi relatada a purificação de cistatinas de sementes de arroz, por uso de

cromatografia de troca iônica em matriz CM-Sephadex C-50. A coluna foi lavada e eluída por um sistema de gradiente linear com uma concentração crescente de NaCl, tendo sido agrupadas e dialisadas as frações com atividade inibitória de papaína. Em seguida foram sequencialmente submetidas a cromatografias de exclusão molecular em matriz Sephadex G-75, e troca iônica em matriz DEAE-Sephadex A-50. O inibidor de protease cisteínica isolado de arroz foi purificado 6000 x em relação à sua concentração no extrato bruto inicial das sementes e foi obtido um rendimento de 28 %. Hines *et al.* (1991) também utilizaram uma série de cromatografias de troca iônica e afinidade, e as frações retidas nas cromatografias de afinidade foram aplicadas em uma coluna cromatográfica de exclusão molecular Sephacryl S-200 HR. O isolamento da cistatina de soja foi alcançado com uma purificação de 1050 x em relação ao extrato. O rendimento do inibidor, no entanto, foi pobre e estimado em aproximadamente 0,4 % da quantidade original de inibidores de proteases cisteínicas presentes no extrato inicial.

Em nosso trabalho, a fração mais enriquecida com atividade inibitória de papaína (R) alcançou um nível de purificação do inibidor de cerca de 10,27 vezes em relação ao EBF inicial. O rendimento total do processo de purificação do inibidor foi de 7,43 %. No entanto, é importante mencionar que nossos cálculos de referência partem de um EB fervido (EBF), que apresentou ganhos em torno de 1,56 x no valor de atividade específica em relação ao EB.

Os insetos possuem enzimas digestivas do tipo proteases serínicas, proteases cisteínicas, proteases aspárticas e metaloproteases. O bruquídeo *Callosobruchus maculatus* utiliza principalmente proteases cisteínicas do tipo catepsina L, da classe da papaína, para degradação de proteínas da dieta (Terra e Ferreira, 1994).

Para verificar a atividade bioinseticida do EBF e da fração R, enriquecida com atividade inibitória da papaína, como demonstrado nos ensaios *in vitro* (tabela 2), foram realizados ensaios *in vivo* utilizando o método de sementes artificiais, onde as larvas dos insetos bruquídeos *C. maculatus* foram alimentadas com crescentes concentrações do EBF e da fração R. Os homogenatos intestinais de larvas de 20 dias também foram preparados para a visualização da atividade de proteases digestivas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15 %, na presença de SDS e gelatina 0,1 %.

De acordo com os resultados obtidos, utilizando crescentes concentrações (0,05 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 % e 2 %) do EBF na dieta artificial das larvas do bruquídeo *C. maculatus*, foi observada uma alta toxicidade do EBF. As larvas dos bruquídeos alimentadas com 0,05 % de EBF obtiveram uma redução de 35 % em sua massa, quando comparadas com a massa das larvas controle (alimentadas somente com farinha de *Vigna unguiculata*), as que foram alimentadas com 0,1 % apresentaram uma redução na massa da larva de 100%. As demais larvas alimentadas com 1% e 2% do EBF não sobreviveram.

Para avaliar o potencial inseticida da fração R acumulada da cromatografia de afinidade Sepharose CnBr CM-Papaina 4B, que apresentou a maior taxa de atividade de inibição específica da papaína (tabela 2), quando comparada com as demais frações separadas durante o processo de purificação de cistatina, foram utilizadas crescentes concentrações (0,05 %, 0,1 %, 0,5 %, 1 % e 2 %) da fração R na dieta artificial dos insetos. E os resultados mostraram que as larvas alimentadas com 0,05 %, 0,1 % e 0,5 % da fração R apresentaram reduções de 14 %, 38 % e 69 %, respectivamente, em sua massa, quando comparadas com as larvas controle (sem adição da fração R). As larvas alimentadas com 0,05 % de EBF apresentaram uma redução na massa larval maior do que as larvas que se alimentaram com 0,05% da fração R. Isso sugere que o extrato bruto proteico da semente de *Clitoria fairchildiana* possui outras proteínas que também são tóxicas aos insetos, que em conjunto agiram mais fortemente contra o desenvolvimento larval dos bruquídeos que as cistatinas concentradas na fração R.

Hines *et al.* (1991) isolaram um inibidor de proteases cisteínicas de sementes de soja e foram realizados ensaios *in vitro* de atividade de inibição de proteases cisteínicas (papaína, ficina, bromelaína) e serínicas (tripsina e quimiotripsina) para monitorar a atividade inibitória durante a purificação de cistatina de soja. Este procedimento metodológico foi similar ao utilizado neste presente trabalho, para detectar a atividade inibitória durante a purificação de cistatina de *Clitoria fairchildiana*. Porém, Hines *et al.* (1991) não realizaram ensaios *in vivo*; utilizaram o homogenato intestinal dos insetos *Acanthoscelides obtectus*, *Zabrotes subfasciatus*, *Callosobruchus maculatus*, *Tribolium castaneum* e *Epilachna varivestis*, como fonte de proteases cisteínicas em

ensaios *in vitro*, adicionando o inibidor isolado de soja. Os resultados deste trabalho mostram que o inibidor de soja reduziu fortemente a atividade proteolítica do intestino de larvas de *Callosobruchus maculatus* em 88 %, utilizando 0,4 µg da cistatina de soja. Também inibiu fortemente a atividade proteolítica de proteases das larvas de *T. castaneum*. No entanto, a cistatina de soja inibiu em níveis variáveis a proteólise de proteínas digestivas desses 5 insetos avaliados. Para *A. obtectus* e *E. varivestis* os valores de inibição foram de 26,0 % e 58 %, respectivamente, utilizando a mesma concentração do inibidor. Foi visto também que o inibidor isolado de soja perde sua atividade depois de 30 min de aquecimento a 100°C.

Em outros trabalhos, foi observado que o bruquídeo *Callosobruchus maculatus* pode usar de estratégias para superar a ação de inibidores de proteases cisteínicas na dieta (Zhu-Salzman *et al.*, 2003). Para detectar os efeitos da dieta com cistatina de soja nos estágios específicos do desenvolvimento larval dos bruquídeos, a alimentação e o desenvolvimento larval foram monitorados nos quatro instares e na pupa. A frequência da alimentação normal (média dos eventos de alimentação/minuto) foi obtida utilizando um monitor de alimentação (Shade *et al.*, 1990). Dez larvas com dieta livre de cistatina e oito com dieta com cistatina foram monitoradas individualmente por 15 min/dia. Resultados mostram que a frequência da alimentação larval durante o 3º instar foi inferior com as larvas sob dieta com cistatina do que nas com dieta sem a adição de cistatina. No entanto, o quarto instar apresentou comparáveis parâmetros de tempo de desenvolvimento (7 dias na dieta com cistatina x 6,5 dias na dieta sem cistatina) e também demonstraram comparáveis frequências de alimentação entre ambos grupos de insetos. Através destes resultados, concluiu-se que houve adaptação do desenvolvimento desses insetos à introdução da cistatina na dieta. Muitos trabalhos tem demonstrado um efeito sinérgico de inibidores de proteases, resultando na diminuição da adaptação dos insetos aos inibidores (Oppert *et al.*, 2005).

A atividade de proteases cisteínicas foram as principais detectadas em larvas de *Tribolium castaneum* e a atividade de protease serínica foi minoritária. Quando as larvas ingeriram em sua dieta, inibidor de protease cisteínica, ocorreu uma dramática mudança no perfil de proteases cisteínicas

do intestino das larvas. Porém, foi visto um efeito sinérgico quando acrescentou-se também o inibidor de protease serínica (STI) na dieta artificial das larvas, resultando na prevenção da resposta adaptativa do inseto. Larvas de *Tribolium castaneum* foram alimentadas com E-64 (inibidor de protease cisteínica) e STI (inibidor de protease serínica) acrescidas em sua dieta artificial, e também com a combinação dos dois inibidores. A atividade caseinolítica do extrato intestinal das larvas com alimentação controle foi inibida em 40 % pelo STI, mas a inibição no extrato de larvas alimentadas com E-64 foi maior, um aumento de 91 %. A combinação de 0,1 % de E-64 e 1,0 % de STI na dieta resultou no aumento na inibição pelo E-64 (74% para 87) e STI (40 % para 31 %). Porém, uma combinação de 0,1 % de E-64 e 5% de STI conduziu um aumento na inibição de E-64 (87 % para 92 %) e um decréscimo na inibição de STI (40 % para 15 %) (Oppert *et al.*, 2005).

O inseto coleóptera *Lissorhoptrus brevis* é uma das mais importantes praga do arroz (*Oryza sativa*). Armas *et al.* (2009) descreveram a produção de plantas transgênicas de arroz expressando uma cistatina de cevada HvCPI-1 para explorar o potencial desta proteína no controle da praga. A atividade da proteína foi confirmada pela redução, *in vitro*, de 90% da atividade de proteases cisteínicas digestivas do inseto. Além disso, proteínas extraídas da raiz do arroz transgênico mostraram uma inibição de 70% em pH 4,5 e 45% em pH 6,0 da atividade de catepsina B no intestino das larvas de *L. brevis*. Segundo os autores a cistatina de cevada pode ser um efetivo componente que poderá ser combinado com outros métodos de controle de peste como uma estratégia em combater a resistência do inseto.

No trabalho de Armas *et al.* (2009) também foi analisada a atividade inibitória do extrato de proteínas de folhas de arroz transgênicas contra proteases digestivas totais de larvas de *L. brevis* (100 µg do extrato de proteínas de folhas de 65 linhagens transgênicas e não- transgênicas incubadas com 160 µg do extrato do intestino) e a atividade foi mensurada usando azocaseína como substrato. Esse ensaio resultou em 50 % de inibição da atividade de proteases das larvas, com 11 das linhagens testadas. No ensaio de atividade de inibição de proteases do homogenato de larvas de *L. brevis* pela cistatina recombinante de cevada, viu-se que 10 µg, 50 µg e 70

$\mu\text{g}$  de HvCPI-1 inibiram 56,8 %, 57,2 % e 56,1 % da atividade proteolítica, respectivamente. Este resultado foi semelhante aos obtidos neste presente trabalho, visto que as larvas do bruquídeo *C. maculatus* quando foram submetidas a dieta artificial com a concentração de 1 % da fração R sofreram na redução de sua massa de 69%. Em um outro trabalho, também com cistatina de soja, foi relatado que os bruquídeos de feijão quando submetidos ao consumo de cistatina em sua dieta, são capazes de reconfigurar a expressão de sua principal protease digestiva, a cathepsina L, e também são capazes de retornar à alimentação e desenvolvimento normal (Ahan *et al.*, 2007). Cerca de 30 diferentes isoformas de catepsinas L foram identificadas no intestino dos bruquídeos do feijão e foram divididas em subfamílias A e B (Zhu-Salzman *et al.*, 2003).

Em 2010, Kiggundu *et al.* testaram o potencial de duas cistatinas, OsCYS1 (de arroz) e CpCYS (de mamão papaia) no controle de *Cosmopolitus sordidus* (Coleoptera: Curculionidae), predador específico de banana (*Ananas cosmus*), como uma estratégia para o desenvolvimento de linhagens resistentes desta cultura a esse predador. Ensaio de inibição de proteases foram realizados e mensurada a eficiência de diferentes cistatinas *in vitro*, seguido pelo ensaio de dieta com cistatina infiltrada em discos de bananas para verificar o impacto das duas cistatinas na taxa de crescimento das larvas do inseto. As duas cistatinas foram expressas em *Escherichia coli* e purificadas em cromatografia de afinidade a  $\text{Ni}^{2+}$ . Os resultados mostraram um efeito dramático nas larvas após 10 dias, comparados com as larvas controle sem cistatina. Foi observado um decréscimo de 70 % do crescimento das larvas que se alimentaram com bananas infiltradas com ambas as cistatinas, em relação ao controle. Comparando com o presente trabalho, este decréscimo de 70 % do crescimento dessas larvas, pelas cistatinas, foi similar ao efeito da fração R no desenvolvimento das larvas do inseto *C. maculatus*, quando incorporada ao nível de 0,5 %. Carrillo *et al.* (2011) caracterizaram treze genes que codificam cistatinas (HvCPI-1 a HvCPI-13) de cevada (*Hordeum vulgare*). Foi analisado o efeito de todos os membros desta família gênica contra dois insetos-pestes do arroz, *Myzus persicae* e *Acythosiphum pisum*. Todas as cistatinas, exceto HvCPI-7, HvCPI-10 e HvCPI-12, inibiram, *in vitro*, a atividade de catepsinas L e/ou B, sendo a HvCPI-6 a mais efetiva contra ambas as

espécies de insetos. Quando administrada em dietas artificiais, HvCPI-6 foi tóxica para as ninfas de *A. pisum* ( $LC_{50} = 150 \mu\text{g/ml}$ ), enquanto não houve mortalidade significativa de larvas de *M. persicae*, até concentrações de 1 mg/ml. Foram realizados ensaios de atividade enzimática para catepsinas B e L, e também foram analisadas as atividades proteolíticas por zimografia e ensaios de dieta artificial. Nos ensaios de dieta artificial, 15 ninfas foram confinadas em sacos contendo 0-1 mg de HvCPI-6 por mL de dieta artificial e a taxa de sobrevivência foi calculada após 3 dias. Nestes ensaios *in vivo* a mortalidade foi de 80% quando *A. pisum* foi alimentado com 300  $\mu\text{g/mL}$  de cistatina. Porém, não houve mortalidade de *M. persicae*, com cistatina na concentração de 1 mg/mL. A cistatina recombinante HvCPI-6 também foi vista como capaz de reduzir 70 % e 50 % da atividade da catepsinas L e B, respectivamente, nas duas espécies. Diversas cistatinas, isoladas de diferentes plantas apresentam um variável nível de toxicidade e inibição de proteases cisteínicas digestivas dependendo do inseto predador alvo. Recentemente, Becker- Ritt e Carline (2012), em uma revisão, relataram alguns dados sobre a avaliação de proteínas e peptídeos de plantas com propriedades inseticidas, como as cistatinas. Em resumo, são mencionados dados relativos à origem da proteína, o inseto alvo, tipo de teste e a concentração efetiva para a toxicidade e ação inibitória, tais como: o inibidor de proteases cisteínicas isolado de soja (*Glycine max* (L.) Merrill), com ação inibitória, ao nível de 10  $\mu\text{g}$  e 4  $\mu\text{g}$ , a proteases digestivas do inseto *Callosobruchus maculatus*, por testes de atividade enzimática (Chen *et al.*, 2005); o inibidor de protease cisteínica isolado de soja, com ação inibitória, ao nível de 4 $\mu\text{g}$ , às proteases digestivas dos insetos *Callosobruchus maculatus* e *Tribolium castaneum*, por testes de atividade enzimática (Barbeta *et al.*, 2008); soyacistatina N, a cistatina isolada de soja, tóxica ao nível de 85  $\mu\text{M}$  para os insetos *Diabrotica virgifera virgifera*, portestes de dieta artificial (Daly *et al.*, 2006); orizacistatina I, tóxica ao nível de 0,3% para os insetos *Callosobruchus chinenses* e *Riptortus clavatus*, por testes de dieta artificial (Saether *et al.*, 1995); Orizacistatina II, tóxica ao nível de 0,5 % para o inseto *C. chinenses* e de 1 % para o inseto *Riptortus clavatus*, portestes de dieta artificial (Saether *et al.*, 1995).

Todos os trabalhos citados demonstram que as fitocistatinas têm a habilidade de inibir proteases cisteínicas digestivas de diversos predadores herbívoros que atacam plantações importantes como culturas de feijão, soja e outros alimentos. Devido à grande abrangência de organismos sobre os quais estas proteínas podem atuar, sugere-se sua utilização em programas de transformação de plantas economicamente importantes para o controle de seus predadores específicos (Benchabane *et al.*, 2010). Neste contexto, o presente trabalho propôs o isolamento e avaliação do potencial inseticida das fitocistatinas de sementes de *Clitoria fairchildiana*, usando como modelo de estudo o bruquídeo *Callosobruchus maculatus*. Tal escolha da fonte de isolamento desta fitocistatina, apóia-se na ausência de relatos de literatura sobre a predação de sementes de *Clitoria fairchildiana* por coleópteros. Portanto, levanta-se a hipótese de que as fitocistatinas destas sementes não teriam sofrido nenhuma pressão adaptativa por parte de insetos predadores, e que, portanto, conservariam uma elevada toxicidade a insetos predadores da ordem Coleopterae. Os dados aqui apresentados sugerem que tal hipótese é verdadeira, mas que a semente de *Clitoria fairchildiana* possua outros elementos de natureza proteica, além de cistatinas, também lesivos ao desenvolvimento larval do nosso inseto modelo, desde que a incorporação do EBF à dieta artificial do inseto foi deletéria ao desenvolvimento do inseto.

## 7- CONCLUSÃO

- O processo de isolamento de cistatina de *Clitoria fairchildiana* alcançou um nível de enriquecimento de cerca de 10,27 vezes em relação ao extrato bruto fervido inicial.
- Após a última etapa de purificação foi identificada e visualizada, por eletroforese, uma banda isolada de cerca de ~12 kDa, a qual foi retida na cromatografia de afinidade à papaína, indicativo de que trata-se de uma cistatina.
- O extrato bruto fervido de cotilédones (EBF) de *Clitoria fairchildiana* apresentou uma alta toxicidade ao inseto bruquídeo *Callosobruchus maculatus*, quando incorporado na dieta artificial desses insetos. Foram observadas redução de 35% nas massas das larvas alimentadas com 0,05% desta fração e mortalidade das demais larvas alimentadas com concentrações mais elevadas (0,1, 0,5, 1 e 2 %).
- A fração retida (R) da cromatografia de afinidade, de maior taxa de atividade inibitória específica de papaína quando comparada às demais frações obtidas no processo de isolamento, e contendo a banda de 12 kDa, também apresentou uma alta toxicidade aos insetos bruquídeos do feijão, tendo sido observadas reduções de 14%, 38% e 69% em larvas alimentadas com 0,05%, 0,1% e 0,5%, respectivamente.
- A atividade de proteases cisteínicas dos homogenatos intestinais das larvas alimentadas com as diferentes dietas foi visualizada por técnicas zimográficas e amostras de larvas alimentadas com a concentração de 0,05% da fração foram as únicas em que se constatou alguma redução na atividade de proteases cisteínicas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, K., Emori, Y., Kondo, H., Susuki, K., Arai, S. (1987). Molecular cloning of a cysteine proteins inhibitor of rice (Oryzacystatin). Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. *J. Biol.Chem.*, 262(35): 16793-7.
- Abe, M., Whitaker, J.R. (1988). Purification and characterization of the cysteine protease inhibitor from the endosperm of corn. *Agric.Biol.Chem.*, 52: 1583-1584.
- Abe, M., Arai, S. (1991). Some properties of a cysteine protease inhibitor from corn endosperm. *Agric. Biol. Chem.*, 55: 2417-2418.
- Abe, M., Domoto, C., Watanabe, H., Abe, K., Arai, S. (1996). Structural organization of the gene encoding corn cystatin. *Biosci. Biochem.*, 60:1173-1175.
- Aguiar, J. M., Franco, O. L., Rigden , J. D., Jr. Bloch, C., Monteiro, A. C.S., Flores, V.M.Q, Jacinto, T., Xavier-Filho, J., Oliveira, A.E.A., Grossi-de-sa, M.F., Fernandes, K.V.S. (2006). Molecular modeling and inhibitory activity of cowpea cystatin against bean bruchid pests. *Proteins: Struct. Funct. Bioinform.*, 63: 662–670.
- Ahn, J.E., Lavingshimer, M.R., Salzman, R.A., Presnail, J.K, Lu, A.L., Koiwa, H., Zhu-Salzman, K. (2007). Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* counteracts dietary protease inhibitors by modulating propeptides of major digestive enzymes. *Insect. Mol Biol.*,16 (3):295-304.
- Amirhusin, B., Shade, R.E., Koiwa, H.,Hasegava, P.M., Bressam, R.A., Murdok, L.L., Zhu-Salzman, K.(2007).Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*.*J.Physiol.*, 53:734-740.
- Arai, S. H., Watanabe, Kondo, H., Emori, Y., Abe, K. (1991). Papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a rice seed cysteine protease inhibitor, depends on the central Gln-Val-Val-Ala-Gly region conserved among cystatin superfamily members. *J. Biochem.*, 109:294-298.
- Arai, S. (2002). Global view on functional foods: Asian perspectives. *Br. J. Nutr.*, 88:139-143.

- Armas, R., Hernandez, C., Abreu, D., Perez, M., Cabrera, Y., Pujol, M., Alfonso-Rubi, J. (2009). A Barley cystatin stably expressed in rice exhibits Strong in vitro inhibitory activity against gut proteases of rice water weevil. *Biotechnologia Aplicada*, 26: 321-327.
- Asho, A., Michaud, D., Cloutier, C. (2001). Recombinant and classically selected factors of potato plant resistance to the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, variously affect the potato aphid parasitoid *Aphydus nigripes*. *Biocontrol.*, 46: 401-418.
- Atkinson, H.J., Urwin, P.E., McPherson, M.J. (2003). Engineering plants for Nematode resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 41:615–639.
- Bangrak, P. & Chotigeat, W. (2011). Molecular cloning and biochemical characterization of a novel cystatin from *Hevea* rubber latex. *Plant. Physiol. Biochem.*, 49: 244 -250.
- Barbeta, B.L., Marshall, A. T., Gillon, A. D., Craik, D.J., Anderson, M.A. (2008). Plant cytotoxins disrupt epithelial cells in the midgut of lepidopteran larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 105:1221-1225.
- Barrett, A. J. (1981). Cystatin, the egg-white inhibitor of cysteine proteinases. *Methods Enzymol.*, 80: 771-778.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Davies, M. E., Machleidt, W., Salvesen, G., Turk, V. (1987). Cysteine protease inhibitors of the cystatin superfamily. In: A.J. Barrett, G. Salvesen (Eds.), *Protease Inhibitors. Elsevier.* , 515–569.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Davies, M.E., Machleidt, W., Salvesen, G., Turk, V. (1986). Cysteine protease inhibitors of the cystatin superfamily. in: A.J. Barrett, G. Salvesen (Eds.), *Protease Inhibitors. Elsevier.* , 519-569
- Benchabane, M., Schluter, U., Voster, J., Goulet, M.C., Michaud, D. (2010). Plant cystatins. *Biochimie.*, 92: 1657-1666.
- Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos, J., Turk, V. (1988). The 2.0 Å X-ray crystal structures of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteases. *EMBO J.*, 7: 2593 – 2599.
- Bolter, C.J., Jongsma, M.A. (1995). Colorado potato beetles (*Leptinotarsa decemlineata*) adapt to protease inhibitors induced in potato leaves by methyl jasmonate. *J. Insect. Physiol.*, 41:1071-1078.

- Bouchard, E., Michaud, D., Cloutier, C. (2003). Molecular interactions between an insect predator and its herbivore prey on transgenic potato expressing a cysteine protease inhibitor from rice. *Mol. Ecol.*,12: 2429–2437.
- Broadway, R.M. (2000). The response of insects to dietary protease inhibitors. *Bioscience/Eurekah.com.*, 80-88.
- Brzin, J., Rogelj, B., Popovic, T., Struleij, B., Rintonja, A. (2000). Clitocyprin, a new type of cysteine protease inhibitor from fruit bodies of mushroom *Clitocybe nebularis*. *J. Biol. Chem.*, 26: 20104-20109.
- Carrilo, L., Maryinez, M., Alvarez-Alfagense, F., Castañera, P., Smagghe, G., Dig, I., Ortigo., F. (2011). A barley cysteine-protease inhibitor reduces the performance of two aphid species in artificial diets and transgenic *Arabidopsis* plants. *Transgenic Res.*, 2:305-319.
- Chapman, R.F. (1998). Alimentary canal, digestion and absorption. *Insects. Struct. Funct.*, 38–68.
- Cheng, Mei-Ling., Tzen, J.T.C., Shyu, D.J.H, Chou, Wing-Ming. (2014). Functional characterization of the N-terminal and C-terminal domains of a sesame group II phytocystatin. *Botanical Studies.*,55:18.
- Chen, Ming-Shun., Johnson, B., Wen, L., Muthukrisnan, K.J.K., Morgan, T.D., Reeck, G.R. (1992). Rice cystatin: bacterial expression, purification, cysteine protease inhibitory activity, and insect growth suppressing activity of a truncated form of the protein. *Protein Expr. Purif.*, 3:41- 49.
- Chen, B., Colgrave, M.L., Daly, N. L., Rosengren, K. J., Gustafson, K.R., Craik, D. J.J. (2005). Isolation and characterization of novel cyclatides from *Viola hederaceae* solution structure and anti-Hiv activity of vhl-1, a leaf-specific. *Chemistry.*, 280: 22395 – 22405.
- Cloutier, C., Jean, C., Fournier, M. (2000). Adult Colorado potato beetles, *Leptinotarsa decemlineata* compensate for nutritional stress on oryzacystatin I-transgenic potato plants by hypertrophic behavior and over-production of insensitive proteases. *Arch. Insect. Biochem. Physiol.*, 44: 69-81.
- Colella, R., Sakaguchi, Y., Nagase, H., Bird, J.W.C. (1987).Chicken egg white cystatin. *J. Biol.Chem.*, 264:17164-17169.
- Corre – Menguy, f., Cejudo, F. J., Mazubert, C., Vidal, Lelandais-Brière, C., Torre, G., Rode, A., Hartmann, C. (2002). Caracterization of the expression

- of a wheat cystatin gene during caryopsis development. *Plant. Mol Biol.*,50: 687 – 698.
- Credland, P.F., Dendy, J. (1992). Intraspecific variation in bionomic characters of the Mexican bean weevil, *Zabrotes subfasciatus*. *Entomol. Exp. App.*, 65:39-47.
- Daly, N.L., Clark, R. J., Plan, M.R., Craick, D.J. (2006). Kalata B8, a novel antiviral circular protein, exhibits conformational flexibility in the cysteine knot motif. *Biochem J.*,393: 619-626.
- De Maagd, R.A., Bravo, A., Crickmore, N. (2001).How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.*, 17:193-199.
- Diop, N.N., Kidric, M., Repellin, A., Gareil, M., Arcy-Lameta, A., Thi,A., Zuily-Fodil, Y.(2004). A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp) leaves. *FEBS Letters.*, 557:545-550.
- Dutt, S., Sling., V.K., Marla., S.S., Kumar, A. (2010). In silico analysis of sequential, structural and functional diversity of wheat cystatin and its implication in plant defense. *Genomics Proteomics e Bioinformatics.*, 8: 42-56.
- Fernandes, K.V.S., Campos, F.A.P., Do Val, R., Xavier-Filho, J. (1991).The expression of papain inhibitors during development of cowpea seeds. *Plant. Sci.*, 74:179-184.
- Fernandes, K.V.S., Sabelli, P.A., Barratt, D.H.P., Richardson, M., Xavier-Filho, J., Shewry, P.R. (1993).The resistance of cowpea seeds to bruchid beetls is not related to levels of cysteine protease inhibitors. *Plant. Mol. Biol.*, 23: 215-219.
- Ferry,N., Edwards, M.G., Gatehouse, J., Capeli, T., Christou, P., Gatehouse, A.M.R. (2006). Transgenic plants for pest control: a forward looking scientific perspective. *Transgenic. Res.*, 15:13-19.
- Flores, V.M.Q., Louro, R.P., Xavier-Filho., Barratt, D.H.P., Shewry, P.R., Fernandes, K.V.S. (2001).Temporal and tissue localization of cowpea (*Vigna unguiculata*) cystatin. *Physiol. Plantarum.*, 112: 195-199.
- Gianotti, A., Rios, W.M., Soares-Costa, A., Nogaroto, V., Carmona, A.K., Oliva, M.L.V., Andrade, S.S., Henrique-Silva, F.(2005).Recombinant expression,

- purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum oycinarum*). *Protein. Expr. Purif.*, 47:483–489.
- Gondim-Junior, M.G.C., Barros, R., Silva, F.R., Vasconcelos, G.J.N. (2005). Occurrence and biological aspects of the clitoria tree psyllid in Brazil. *Scientia Agricola* (Piracicaba, Braz.), 62:281-285.
- Goulet, Marie-Claire., Dallaire, C., Vaillancourt, Louis-Philippe., Khalf, M., Badri, A., Preradov, A., Duceppe, Marc-Olivier., Goulet, C., Cloutier, C., Michaud, D. (2008). Tailoring the specificity of plant cystatins toward herbivorous insect digestive cysteine proteases by single mutations at positively selected amino acid sites. *Plant. Physiol.*, 146:1010-1019.
- Hilder, V., Gatehouse, A.M.R., Sheerman, S.E., Barker, R.F., Boulter, D. (1987). A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature.*, 160-163.
- Hines, M.E., Osuala, C.I., Nielsen, S.S. (1991). Isolation and partial characterization of a soybean cysteine proteases inhibitor of coleopteran digestive proteolytic activity. *J. Agric. Food Chem.*, 39: 1515–1520.
- Hirashiki, I., Ogata, F., Yoshida, N., Makisumi, S., Ito, A. (1999). Purification and complex formation analysis of a cysteine protease inhibitor (cystatin) from seeds of *Wisteria floribunda*. *J. Biochem.*, 4: 604-608.
- Hong, J.K., Hwang, E., Lim, C.J., Yang, K.A., Jin, Z., Kim, C.Y., Koo, J.C., Chung, W.S., Lee, K. O., Lee, S.Y., Cho, M.j., Lim, C.O.(2007). Over-expression of Chinese cabbage phytocystatin 1 retards seed germination in *Arabidopsis*. *Plant. Sci.*, 172:536-563.
- Hosoyama, H., Irie, K., Abe, K., Arai, S. (1994). Oryzacystatin exogenously introduced into protoplasts and regeneration of transgenic rice. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 8:1500-1500.
- Hwang, J. E., Hong, J.K., Je, H.J., Lee, K.o., Kim, D.Y., Lee, S. Y., Lim, C.H., (2009). Regulation of seed germination and seedling growth by an *Arabidopsis* phytocystatin isoform, AtCYS6. *Plant. Cell. Rep.*, 28:1623:1632.
- Hwang, J. E., Hong, J.K., Lim, C.H., Chen, H., Je, J., Yang, K.A., Kim, D.Y., Choi, Y.J., Lee, S.Y., Lim, C.O. (2010). Distinct expression patterns of two *Arabidopsis* phytocystatin genes, AtCYS1 and AtCYS2, during development and abiotic stresses. *Plant. Cell. Rep.*, 29:905–915.

- Irene, D., Chung, Tse-Yu., Chen, Bo-Jiun, Liu, Ting-Hong, Li, Feng-Yin., Tzen, Jason T.C., Wang, Cheng-I., Chyan, Chia-lin (2012). Solution structure of a pytocystatin from *Ananas comosus* and its molecular interaction with papain. *Plos one.*, 55:18.
- Irie, K., Hosoyama, H., Tabeuchi, T., Iwabuchi, K., Watanabe, H., Abe, M., Abe, K & Arai, S. (1996). Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteases. *Plant. Mol. Biol.*, 30: 149-157.
- Ishimoto, M., Kuroda, M., Yoza, K., Nishizawa, K., Teraishi, M., Mizutani, N., Ito, Kenji., Moriya, S.(2012). Heterologous expression of corn cystatin in soybean and effect on growth of the stink bug. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 11:2142-2145.
- Jacinto, T., Fernandes, K.V.S., Machado, O.L.T., Siqueira Jr., C.L. (1998). Leaves transgenic tomato plants overexpressando prosystemim accumulate high levels of cystatin. *Plant . Sci.*, 138:35-42.
- Jongsma, M.A., Bakker, P.L., Stiekma, W.J., Bosh, D. (1995). Phage display of a double-headed protease: analysis of the binding of potato protease II. *Mol. Breed.*, 1: 181– 191.
- Kimura, M., Ikeda, T., Fukumoto, D., Yamasaki, N., Yanekura, M. (1995). Primary structure of a cysteine protease inhibitor from the fruit of Avocado (*Persea Americana mill* ). *Biosci, Biotechol Biochem.*, 59:2328-2329.
- Koiwa, H., Bressan, R.A., Hasegawa, P. M. (1997). Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trend Plant Sci.*, 2:379-384.
- Koiwa, H.,Shade, R.E., Zhu-Salzman, K., Subramanian, L., Murdock, L., Nielsen, S.S., Bressam, R.A., Hasegawa, P.M.(1998). Paghe display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatins. *The Plant J.*, 3:371:379.
- Koiwa, H., Shade, R.E., Zhu-Salzman, K., D'Urzo, M.P., Murdock, L.L., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. (2000). A plant defensive cystatin (soyacystatin) targets cathepsin-L-like digestive cysteine proteases (DvCALs) in the larval midgut of western corn rootworm (*Diabrotica virgifera virgifera*). *FEBES.*, 471:67-70.
- Kondo H., Abe K., Emori Y. & Arai S. (1991). Gene organization of oryzaystatin-II, a new cystatin superfamily member of plant origin, is closely related to

- that of oryzacystatin-I but different from those of animal cystatins. *Febs Lett.*, 278:87-90.
- Kouzuma, Y., Kavano, K., Kimura, M., Yamasaki, N., Kodowaki, T., Yamanato, K. (1996). Purification, characterization, and sequencing of two cysteine protease inhibitors, sea and Scb, from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. *J. Biochem.*, 119:106-119.
- Kouzuma, Y., Inanaga, H., Doi-Kawano, Yamasaki, K.N., Kimura, M. (2000). Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding the cysteine protease inhibitor with three cystatin domains from sunflower seeds. *J. Biochem.* 128:161-166.
- Kouzuma, Y., Tsukigata, K., Inanaga, H., Doi-Kawano, K., Yamasaki, N., Kimura, N. (2001). Molecular cloning and functional expression of Cdna encoding the cysteine protease inhibitor sca from sunflower seeds. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65, 4.
- Kraulis, J. (1991). MOLSCRIPT: A program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 24:946-950.
- Kuroda, M., Ishimoto, M., Suzuki, K., Kondo, H., Abe, K., Kitamura, K., Arai, S. (1996). Oryzacystatin exhibit growth-inhibitory and lethal effects on diferente species of bean insect pest *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera) and *Riptortus clavatus* (Hemitera). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60: 209-212.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature.*, 227:680-685.
- Lalitha, S., Shade, R.E., Murdock, L.L., Bressam, R.A., Hasegawa, P.M., Nielsen, S.S (2005). Effectiveness of recombinant soybean cysteine protease inhibitors agaist selected crop pests. *Comp. Biochem. Physiol.*, 140:227-235.
- Lawrence, P.K., Koundal, K.R. (2002). Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *J. Nematol.*, 28: 209–215.
- Lim, C. O., Lee, S.I., Chung, W.S., Park, S.H., Hwang, I., Cho, M. J. (1996). Characterization of a cDNA encoding cysteine protease inhibitor from *Chinese cabbage* (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*) flower buds. *Plant Mol. Biol.*, 30: 373-379.

- Lorenzi, H. *Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*, vol. 1, 4 edição. Nova Odessa, SP: *Instituto Plantarum*, 2002.
- Machado, M.C. (2000). Biologia comparada de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: HesperIIDae) em *Clitoria fairchildiana*, *Centrosema pubescens*, *Galactia striata* (Leguminosae) e alimentação alternada. *Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais) Curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Margis, R., Reis, E.M., Villeret, V. (1998). Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Arch. Biochem. Biophys.*, 359: 24-30.
- Martínez, M., López-Solanilh, E., Rodríguez- Palenzuela, P., Carbonero, P., and Díaz, I., (2003). Inhibitor of plant-pathogenic fungi by barley cystatin H-Vcpi (Gene ICY). Is not associated with its cysteine-proteínase inhibitory properties, *Mol. Plant–Microbe Inter.*, 16:876-883.
- Martinez, M., Abrahan, Z., Carbonero, P., Díaz, I. (2005a). Comparative Phylogenetic analysis of cystatin gene families from arabidoppsis, rice and barley. *Mol. Gen. Genomics.*, 273: 423-432.
- Martinez, M., Abrahan, Z., Gambardella, M., Echaide, M., Carbonero, P. Diaz, I. (2005b).The strawberry gene Cyf1 encodes a phytocystatin with antifungal properties.*J. Exp. Bot.*,56: 1821–1829.
- Megdiche, W., Passaquet, C., Zourrig, W., Zuily, Y., Abdelly, C.(2009).Molecular cloning and characterization of novel cystatin gene in leaves *Cakile maritima* halophyte.*J. Plant.Physiol.*,166: 739-749.
- Michaud, D., Nguyen-Quoc, B., Bernier-Vadnais, N., Faye, L., Yelle, S. (1994). Cysteine protease forms in sprouting potato tuber. *Physiol. Plantarum.*, 90: 497-503.
- Misaka, T., Kuroda, M., Iwabuchi, K., Abe, K., Arai, S. (1996). Soyacystatin, a novel cysteine protease inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. *Eur. J. Biochem.*,240: 609-614.
- Munger, A., Coenen, K., Cantin, L., Goulet, C.,Vaillancourt, Louis-Philippe., Goulet, Marie-Claire., Tweddell, R., Sainsbury, F., Michaud, D. (2012).

- Beneficial 'unintended effects' of a cereal cystatin in transgenic lines of potato, *Solanum tuberosum*. *Plant Biology*., 12:198.
- Nagata, K., Kudo, N., Abe, K., Arai, S., Tanokura, M. (2000). Three-dimensional solution structure of oryzacystatin-I, a cysteine protease inhibitor of the rice, *Oryza sativa* L. japonica. *Biochemistry*., 39: 14753 – 14760.
- Nissen, M. S., Kumar, M.G.N., Youn, B., Knouweles, D.B., Lam, K.S., Ballinger, W.J., Knowles, R. N., & Kang, C. (2009) .Characterization of *Solanum tuberosum* multicystatin and its structural comparison with other cystatins. *Plant Cell*., 21: 861–875.
- Nogueira, F.C.S., Silva, C.P., Alexandre, D., Samuels, R., Soares, E. L., Aragão, F.J.L., Palmisano, G., Dom ont, G. B., Roepston, P., Campo, F.a.p. (2012). *Proteomics*, 12: 2704-2715.
- Ojima, A., Shiota, H., Higashi, K., Kamada, H., Shimma, Y., Wada, M., Satoh, S.(1997). An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteases in cell cultures and seeds of carrot. *Plant. Mol. Biol.*, 34: 99-109.
- Oppert, B., Morgan, T.D., Hartzler, K., Kramer, K.J., (2005). Compensatory proteolytic responses to dietary protease inhibitors in the flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 140:53-58.
- Orr, G. L., Srickland, J.A. & Walsh, T. A. (1994). Inhibitor of diabrotica larval growth by a multicystatin from potato tubers. *J. Insect Physiol.*, 40: 893-900.
- Osborne, T. B. (1924). *The Vegetable Proteins*, 2nd ed. London.
- Pernas, M., Lopez-Solanilla, E., Sanchez-Monge, R., Salcedo, G., Rodriguez-Palenzuela, P. (1999). Antifungal activity of a plant cystatin. *Mol. Plant–Microbe Inter.*, 12: 624–627.
- Owan, A.D., Buttle, D.J., Barret, A.J. (1990). The cysteine proteases of the pineapple plant. *Biochem. J.*, 266:869-875.
- Rawlings, D.N., Barrett, A. J. (1990). Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *J. Mol. Evol.*, 30:60-71.
- Santino, A., Gallo, A., Leone, A., Paltronieri, P., Zacheo, G.(1998) Purification and characterization of a novel papain inhibitor from comom bean (*Phaseolus Vulgaris*) seed. *Physiologia Plantarum.*, 104: 293-298.1998.

- Sauther, O., Craik, D.J., Compbell, I.D., Sletten, K., Juw, J., Norman, D. G. (1995). Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the Uterotonic polypeptide Yalata B1. *Biochem.*, 34:4147-4158.
- Sharma, S., Rashid, F., Bano, B. (2006). Studies on low molecular mass phytocystatin purified from *Paseolus mungo* (Urd). *Biochesm-Moscow* 4: 406-413.
- Sharma, G., Kumar, M., Sharma, S. (2011). Studies on antibacterial activity and biochemical/ biophysical properties of phytocystatinas purified from *Catharanthus roseus* (Madagascar periwinkle): an evergreen sub shrub com monly found in ditrict Bijnor (V.P.). *Adv. Biosci. Biotechnol.*, 2:391-396.
- Shyu, D.J.H., Chou, Wing-Ming., Yiu, Tien-Joung., Lin, C. P. C., Tzen, J.T.C. (2004a). Cloning, functional expression, and characterization of cystatin in sesame seed. *J. Agric. Food. Chem.*, 5:1350-1356.
- Shyu, D.J.H., Chyan, Chia-Lin., Tzen, J.T.C., Chou, Wing-Ming (2004b). Molecular cloning, expression, and functional characterization of a cystatin from *Pineapple stem*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68:1681 – 1689.
- Silva, L. K. F. da. (1995). Aspectos biológicos de *Urbanus acawoios* (Williams, 1926) (Lepidoptera: Hesperiidæ) em *Clitoria fairchildiana*, *Centrosema pubescens*, *Glycine max* e *Phaseolus vulgaris* (Leguminosae). Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Florestais) – *Curso de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Florestais*, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Siqueira-Júnior, C.L., Fernandes, K.V.S., Machado, O.L.T., Cunha, M., Gomes, V.M., Moura, D., Jacinto, T. (2002). 87 KDa tomato cystatin exhibit properties of a defense protein and forms protein crystals in prosystemin overexpressing transgenic plant. *Plant. Physiol. Biochem.*, 40:247–254.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76–85.
- Soares-Costa, A., Beltramini, L.M., Thiemann, O.H., Henrique-Silva, F. (2002). A surgance cystatin: recombinante expression, purification, and antifungal activity. *Biochem. Biophysical. Res. Communications*, 296:1194-1199.

- Song, I., Taylor, M., Baker K., Bateman, R. (1995). Inhibition of cysteine protease by carica-papaya cystatin produced in *Escherichia coli*. *Gene.*, 2:221-224.
- Southgate, B.J.(1979). Biology of the Bruchidae. *Ann. Ver. Entomol.*, 1:449-473.
- Souza, V.,C, Lorenzi, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da Flora brasileiras, baseado na APG II*, 2005.
- Storey, R.D. & Wagner, F.W. (1986). Plant proteases: A need for uniformity. *Phytochem.*, 12:2701-2709.
- Szewinska, J. Zdunck-Zastocka, E., Pojmaj, M., Biclowski, W. (2012). Molecular cloning and expression analysis of triticale phytocystatins during development and germination of seeds. *Plant. Mol. Biol. Rep.*, 30:867-877.
- Terra, W.R, Ferreira, C. (1994). Insect digestive enzymes properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Phys. B.*, 109:1–62.
- Trevisan, H., Nadai, J.D., Lunz., A.M., Carvalho, A.G.(2004).Consumo foliar e aspectos biológicos de *Urbanus acawoios* (Lep.: Hesperidae) alimentado com folíolos de *Clitoria fairchildiana* (leguminosae: Faboideae) em três níveis de maturidade. *Ciencia Rura.I*, 34:1-4.
- Turk, V., Bode, W. (1991).The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteases. *FEBS Lett.*, 285: 213-219.
- Turk, V., Stoka, V., Turk, D. (2008).Cysatin: Biochemical and structural proprieties, and medical relevance. *Fronturs in Bioscienc.* , 5406-5420.
- Ussuf, K.K., Losemi, N.H., Mitra, R. (2001). Protease inhibitors: Plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. *Current Science.*, 80:7.
- Urwin, P.E., Atkinson, H.J., Waller, D.A., McPherson, M.J. (1995). Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. *Plant. J.*, 8: 121–131.
- Urwin, P.E., Lilley, C.J., McPherson, M.J., Atkinson, H.J. (1997). Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. *Plant. J.*, 12: 455–461.
- Urwin, P.E., McPherson, M.J., Atkinson, H.J. (1998). Enhanced transgenic plant resistance to nematodes by dual protease inhibitor constructs. *Planta.*, 204:472-479.

- Valdes-Rodriguez, S., Cedro-Tanda, A., Aguilar-Hernandez, V., Cortes-Onofre, E., Blanco-Labra, A., Guerrero-Rangel, A. (2010). Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi. *Plant. Physiol. Biochem.*, 48: 469-475.
- Waldron, C., Wegrich, L.M., Merlo, P.A.O., Walsh, T. A. (1993). Characterization of a genomic sequence coding for potato multycystatin, an eight-domain cysteine protease inhibitor. *Plant. Mol. Biol.*, 23:801-812.
- Walker, A.J., Urwin, P.E., Atkinson, H.J., Brain, P., Glen, M.D., Shewry, P.R. (1999). Transgenic *Arabidopsis* leaf tissue expressing a modified oryzacystatin shows resistance to the field slug *Deroceras reticulatum* (Müller). *Transgenic Res.*, 8:95–103.
- Walsh, T., Strickland, A. (1993). Proteolysis of the 85-kilodalton crystalline cysteine protease inhibitor from potato releases functional cystatin domains. *Plant. Physiol.*, 103:1227-1234.
- Wang, Ke-Ming, Kumar, S., Cheng, Y-Sheng, Venkatagin, S., Yang, Ai-Hwa, Y., Yeh, Yeh, Kai-Wun. (2008). Characterization of mechanism and antifungal activity between group-2 phytocystatins from taro (*Colocasia esculenta*). *FEBS J.*, 275:4980-4989.
- Watanabe, H., Abe, K., Emory, Y., Hosoyama, H, Arai, S. (1991). Molecular cloning and gibberellin-induced expression of multiple cysteine proteases of Rice seeds (*Oryza sativa*). *J. Biol. Chem.*, 266: 16897-16902.
- Yang, A.H., Yeh, K. W. (2005). Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung no. 1). *Planta*. 221: 493–501.
- Zanuncio, J.C., Parreira, D.S., Mielke, O.H.H., Ramalho, F.D.S., Serrão, J.E., Zanuncio, T. V. (2013). *Hiperchiria incisa incisa* (Lepidoptera: Saturniidae) on plants of *Clitoria fairchildiana* in Viçosa, Minas Gerais state, Brazil. *J. Lepidopterists Soc.*, 2:131-133.
- Zhao, Y., Botella, M.A., Subramanian, L., Niu, X., Nielsen, S.S., Bressan, R.A., Hasegawa, P.M. Two Wound-Inducible Soybean Cysteine Protease Inhibitors Have Greater Insect Digestive Protease Inhibitory Activities than a Constitutive Homolog (1996). *Plant. Physiol.*, 111:1299-1306.
- Zhu-Salzman, K., Koiwa, H., Sazman, R.A., Shade, R.E., Ahn, J.E. (2003). Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component

strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Mol. Biol.*, 12:135-145.

Zhu-Salzman, K., Zeng, R. (2015) Insect Response to plant defensive protease inhibitors.2015 *Annu. Rev. Entomol.*,60:233-52.