

**Purificação, caracterização e avaliação do potencial
biopesticida de sete inibidores de proteinase do tipo Kunitz
induzidos por metil jasmonato em folhas de maracujá
(*Passiflora edulis* Sims).**

SYLVIO BOTELHO JÚNIOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
Junho – 2014

**Purificação, caracterização e avaliação do potencial
biopesticida de sete inibidores de proteinase do tipo Kunitz
induzidos por metil jasmonato em folhas de maracujá
(*Passiflora edulis* Sims).**

SYLVIO BOTELHO JÚNIOR

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia”.

Orientadora: Dr^a Tânia Jacinto Freitas da Silva

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE
DARCY RIBEIRO - UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ
Junho – 2014

**Purificação, caracterização e avaliação do potencial
biopesticida de sete inibidores de proteinase do tipo Kunitz
induzidos por metil jasmonato em folhas de maracujá
(*Passiflora edulis* Sims).**

SYLVIO BOTELHO JÚNIOR

“Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia”.

Aprovada em 27 de Junho de 2014.

Comissão examinadora:

Prof.^a Dr^a Maura Da Cunha – UENF

Prof.^o Dr^o Francisco José Alves Lemos - UENF

Prof.^a Dr^a Flávia Borges Mury – UFRJ

Prof.^a Dr^a Katia Valevski Sales Fernandes - UENF
(co-orientadora)

Prof^a. Dr. Tânia Jacinto Freitas da Silva – UENF
Orientadora

Agradecimentos

A Deus, por toda a força e motivação para conclusão deste trabalho.

A minha família, por acreditarem em meus projetos e me apoiarem nos momentos mais difíceis.

A Tânia Jacinto, por mais de dez anos de empenho na minha formação acadêmica.

A professora Olga Machado, cuja participação foi fundamental para realização deste trabalho.

A Viviane Perdízio e Dalvânia (Gal), pela ajuda inestimável até nos pequenos detalhes.

Aos professores do LBT, Franzé e Marília, pelo exemplo de profissionalismo e humanismo.

Um agradecimento especial aos técnicos do LBT, por toda ajuda e suporte para o desenvolvimento dos experimentos.

Ao Drº André Carvalho, pela revisão deste trabalho.

Aos professores Francisco José, Flávia Borges e Maura por aceitarem o convite de participação da banca examinadora.

Ao meu amigo Bruno Jardim, pelo apoio e camaradagem.

Ao meu “irmão” Luiz Cláudio, pelo incentivo diário em minha vida na tentativa de me transformar em um ser humano melhor.

Aos meus amigos, Flavinho, Victor, Luciano (Pépé), Frederico (Grug), Jorge, por estarem presentes na minha vida da infância até os dias de hoje.

A UENF, CNPq, CAPES e FAPERJ pelo financiamento.

A todos aqueles que direta e indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Índice

Lista de figuras	v
Lista de Tabelas	vii
Abreviaturas	vii
Resumo	ix
Abstract	xi
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 O gênero <i>Passiflora</i>	02
1.2. Os mecanismos de defesa vegetal	04
1.3 Os jasmonatos	06
1.4 Os inibidores de proteinase.....	09
1.5 Os Inibidores de proteinase serínica	11
1.6 Os Inibidores de proteinase do tipo kunitz.....	12
1.7 Insetos utilizados como modelo de estudo do potencial biopesticida dos Pls	13
1.7.1 <i>Diatraea saccharalis</i>	13
1.7.2 <i>Callosobruchus maculatus</i>	14
1.7. <i>Aedes aegypti</i>	15
2. OBJETIVOS.....	18

3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1 Material Biológico	21
3.2 Padronização da indução de inibidores de proteinase por vapores de metil jasmonato	22
3.2.1 Cultivo de plantas de maracujá.....	22
3.2.1 Tratamento com metil jasmonato.....	22
3.3 Extração de proteínas foliares.....	22
3.4 Dosagem do teor protéico	23
3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE 12,5%).....	23
3.6 Ensaio de inibição de atividade proteolítica da tripsina <i>in gel</i>	24
3.7 Purificação dos inibidores de proteinase serínica induzidos por MeJa em tecido foliar.....	24
3.8 Sequência dos aminoácidos da região N-terminal	26
3.9 Ensaio de inibição de atividade proteolítica da tripsina <i>in vitro</i>	26
3.10 Ensaio de inibição da atividade proteolítica da quimiotripsina <i>in vitro</i>	27
3.11 Ensaio de inibição de atividade proteolítica da papaína <i>in vitro</i>	28
3.12 Estabilidade Térmica da atividade inibitória contra tripsina	28
3.13 Ensaio de inibição da atividade proteolítica das enzimas digestivas de larvas de <i>Aedes aegypti</i>	29
3.14 Ensaio de inibição da atividade proteolítica das enzimas digestivas de larvas de <i>Callosobruchus maculatus</i>	29
3.15 Ensaio de inibição da atividade proteolítica das enzimas digestivas de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i>	30

3.16 Efeito dos inibidores no desenvolvimento e sobrevivência de larvas de <i>D. saccharalis</i>	31
3.17 Análise estatística	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Indução e purificação de inibidores de proteinase em folhas de maracujá.....	33
4.2 Sequência de aminoácidos da região N-termnal e identificação de isoformas dos PfKTIs	40
4.3 Estudo da atividade dos PfKTIs contra diferentes enzimas comerciais	44
4.4 Estudo da termoestabilidade dos PfKTIs na atividade contra tripsina	49
4.5 Análise do potencial biopestida dos PfKTIs.....	50
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	63
7. BIBLIOGRAFIA	66
8. ANEXOS	96

Lista de Figuras

Figura 1: Representação gráfica do desempenho da cultura do maracujá no Brasil, no período 1980/2010	03
Figura 2: Esquema representando as várias etapas da via da biosíntese dos jasmonatos	08
Figura 3(A): Visualização eletroforética do extrato protéico foliar de plantas induzidas por metil jasmonato em gel de poliacrilamida 10% semi desnaturante	34
Figura 3 (B): Visualização eletroforética do extrato protéico do tecido foliar de plantas induzidas por metil jasmonato em gel de poliacrilamida 10% contendo gelatina	34
Figura 4: Cromatograma da fração F30-55 em coluna de fase reversa C18 em sistema de alta performance (HPLC)	35
Figura 5: Visualização eletroforética dos picos (1 a 6) presentes na figura 3 em gel de poliacrilamida desnaturante 12,5%.....	35
Figura 6: Cromatograma do pico 1 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4)	36
Figura 7: Cromatograma do pico 2 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4)	37
Figura 8: Cromatograma do pico 3 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4)	37
Figura 9: Cromatograma do pico 4 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4)	38
Figura 10: Cromatograma da parte inicial (subida) do pico 5 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4)	38
Figura 11: Cromatograma da parte final (descida) do pico 5 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4)	39

Figura 12: Cromatograma do pico 6 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4).....	39
Figura 13(A): Visualização eletroforética dos sete inibidores obtidos da segunda cromatografia de fase reversa em coluna C18 em gel de poliacrilamida em condições nativas (PAGE 10%).....	43
Figura 13(B): Visualização eletroforética dos sete inibidores obtidos da segunda cromatografia de fase reversa em coluna C18 em gel de poliacrilamida 10% contendo gelatina e em condições nativas.....	43
Figura 14: Visualização gráfica da atividade inibitória <i>in vitro</i> dos PfKTIs sobre tripsina.....	45
Figura 15: Visualização gráfica da atividade inibitória <i>in vitro</i> dos PfKTIs sobre quimiotripsina... ..	46
Figura 16: Visualização gráfica da atividade inibitória <i>in vitro</i> dos PfKTIs sobre papaína... ..	47
Figura 17: Visualização gráfica da estabilidade térmica dos IPs.....	49
Figura 18: Visualização gráfica da inibição <i>in vitro</i> de enzimas digestivas de extrato do intestino médio de larvas do inseto <i>Diatraea saccharalis</i>	50
Figura 19: Análise da inibição da atividade do extrato do intestino médio de larvas e adultos de <i>Aedes aegypti in vitro</i> na presença de PfKTIs.....	51
Figura 20: Análise da inibição da atividade do extrato do intestino médio de larvas de <i>Callosobruchus maculatus in vitro</i> por inibidores purificados.....	52
Figura 21: Visualização gráfica do efeito sobre o peso e sobrevivência de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> quando alimentadas com dieta acrescida da fração enriquecida com inibidor.....	54

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sequência parcial de aminoácidos da região N-terminal dos inibidores de proteinase de folhas de maracujá.....	41
Tabela 2: Sequencia N-terminal dos aminoácidos presentes nos picos que não apresentaram homogeneidade.....	42
Tabela 3: Concentração dos IPs com capacidade de inibir 50% da atividade proteolítica (IC ₅₀).....	48

Abreviaturas

ABS	Absorbância
AOC	Aleno óxido ciclase (do inglês <u>a</u> llene <u>o</u> xide <u>c</u> yclase)
AOS	Aleno óxido sintase (do inglês <u>a</u> llene <u>o</u> xide <u>s</u> ynthase)
BANA	do inglês, N _α - <u>b</u> enzoyl-DL- <u>a</u> rginine β- <u>n</u> aphthyl <u>a</u> midate hydrochloride
BApNA	do inglês N α- <u>B</u> enzoil –DL - <u>A</u> rginine <u>4</u> - <u>N</u> itroanilide
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
BTEE	do inglês N-□□benzoyl-L-tyrosyl ethyl ester hydrochloride
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etileno Diamino Tetracético
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IC₅₀	do inglês <u>i</u> nhibitory <u>c</u> oncentration required for 50% inhibition
JA	Ácido jasmônico (do inglês <u>j</u> asmonic <u>a</u> cid)
kDa	Kilo Dalton
KPIs	Inibidores de proteinase do tipo Kunitz (do inglês <u>K</u> unitz- <u>t</u> ype <u>p</u> roteinase)

inhibitors)

LOX	Lipoxigenase (do inglês lipoxygenase)
OPC8	do inglês 3-oxo-2-(20(Z)-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic
OPDA	Ácido 12-octo-fitodienoico (do inglês 12-oxophytodienoic acid)
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PfKTI	do inglês Passiflora flavicarpa Kunitz trypsin inhibitors
PIs	Inibidores de proteinase (do inglês <i>proteinase inhibitors</i>)
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta performance- Fase reversa
SPI	Inibidores de proteinase serínica (do inglês <i>serine proteinase inhibitors</i>)
Temed	N',N',N',N', tetrametil etileno diamina
Tris	Tris (hidroximetil) Amino Etano

Resumo

O maracujá (*Passiflora flavicarpa* Sims) representa uma cultura tropical economicamente importante no Brasil, sendo o principal produtor mundial. A cultura do maracujá está sujeita a diferentes agentes agressores no ambiente, sendo a herbivoria por lagartas uma importante causa de perdas econômicas. Com isso, para melhoria nos processos de cultura do maracujá, se faz necessário uma melhor compreensão dos mecanismos de defesa deste vegetal, que atualmente, permanecem mal compreendidas. Neste cenário, buscamos entender o sistema de defesa do maracujazeiro, dando ênfase à caracterização bioquímica de inibidores de proteinases (PI) presentes nesta planta. No presente trabalho, plantas de maracujá foram expostas aos vapores de metil jasmonato (MeJa, do inglês *methyl jasmonate*) por 96 horas com intuito de aumentar a expressão de PIs no tecido foliar. Logo após, foi realizada uma extração protéica das folhas de maracujá seguido de precipitação por sulfato de amônio. As amostras obtidas foram submetidas a cromatografia de gel filtração (Sephadex G-100), e as frações que apresentaram atividade inibitória sobre tripsina foram reunidas e aplicadas em cromatografia de fase reversa (RP-HPLC). Com isso, foram purificados sete inibidores de proteinase serínica (20-25 kDa) identificados por SDS-PAGE (12,5%). Através da técnica de degradação de Edman obtivemos a sequência de aminoácidos da região N-terminal desses inibidores. Essas sequências revelaram similaridade com inibidores da família Kunitz de diferentes espécies vegetais. Com isso, nomeamos nossos inibidores de PfKTI (*Passiflora flavicarpa* *Kunitz trypsin inhibitor*). A realização de eletroforese em gel de poliacrilamida nativo revelou que esses inibidores apresentam múltiplas isoformas. Todos os inibidores apresentaram forte atividade inibitória contra tripsina e quimiotripsina *in vitro* (com exceção de PfKTI-1). Nossos resultados demonstraram diferenças na atividade desses inibidores contra essas proteases indicando um polimorfismo funcional. A termoestabilidade dos PfKTIs foi testada incubando esses inibidores a diferentes temperaturas, realizando logo após ensaio enzimático contra tripsina *in vitro*. A atividade de PFKTI-3 e PFKTI-5 foi abolida quando incubados a 80 °C enquanto que os outros inibidores tiveram baixa atividade após incubação por 100 °C. Para avaliar a capacidade bifuncional dos PfKTI

realizamos ensaio *in vitro* contra papaína. Apesar de raro, dois inibidores (PFKTI-4 e PFKTI-7) apresentaram atividade contra esta proteinase. Ensaios enzimáticos *in vitro* dos PFKTIs contra proteases do intestino médio de diferentes insetos (*Diatraea saccharalis*, *Callosobruchus maculatus* e *Aedes aegypti*) foram realizados com a finalidade de avaliar o potencial bioinseticida destes inibidores. Todos os PFKTIs atuaram fortemente sobre proteases do intestino médio da broca da cana, *D. saccharalis* (um inseto lepidóptero). Ensaios *in vivo* acrescentando uma fração enriquecida com inibidores na dieta de larvas de *Diatraea saccharalis* reforçam o potencial inseticida de PIs contra esta praga. Além disso, os inibidores que apresentaram atividade bifuncional foram efetivos contra proteases cisteínicas presentes no intestino médio do caruncho, *C. maculatus* (um inseto coleóptero). Inesperadamente, todos os inibidores foram altamente eficazes contra as proteases do intestino médio de *A. aegypti* (vetor do vírus da dengue). Neste trabalho, através de abordagens bioquímicas, demonstramos a flexibilidade das plantas de maracujá para expressar um amplo repertório de potentes inibidores de proteinase do tipo Kunitz (KPIs) em resposta a MeJa. Esses resultados levam a abertura de novos caminhos na pesquisa de PIs derivados de plantas, podendo esses, por exemplo, atuar no controle de mosquitos vetores de doenças. Adicionalmente nossos estudos refletem a complexidade dos KPIs em maracujá, que pode ser explorado para melhorar as condições de defesa das plantas e enfatiza o potencial do maracujazeiro como fonte de compostos bioativos com aplicações biotecnológicas diversificadas.

Palavras chave: Metil jasmonato, inibidor de proteinase, defesa vegetal, maracujá.

Abstract

The passion fruit (*Passiflora flavicarpa* Sims) represents an economically important tropical crop in Brazil, being the country is the world's leading producer. The passion fruit culture is subject to various harmful agents in the environment, being herbivory by the caterpillars a major cause of economic loss. Thus, for improvement in the culture processes of passion fruit, is necessary a better understanding of the defense mechanisms of the plant, which currently remains misunderstood. In this setting, we seek to understand the defense system of passion fruit plant, emphasizing the biochemical characterization of proteinase inhibitors (PI) present at this plant. In the present work, passion fruit plants were exposed to vapors of methyl jasmonate (MeJa) for 96 hours in order to increase expression of PIs in the leaf tissue. Right after, a protein extract of the leaves of passion fruit plant followed by ammonium sulfate precipitation was done. The samples were subjected to gel filtration chromatography (Sephadex G-100), and the fraction that showed activity against trypsin were pooled and applied to reversed-phase chromatography (RP-HPLC). Thus, seven serine proteinase inhibitors (20-25 kDa) identified by SDS-PAGE (12.5%) were purified. By the technique of Edman degradation we obtained the amino acid sequence from the N-terminus of these inhibitors. These sequences showed similarity to the Kunitz family inhibitors from different plant species. With this, we named our inhibitors PfKTI (*Passiflora flavicarpa* Kunitz trypsin inhibitor). The realization of native polyacrylamide gel electrophoresis revealed that these inhibitors have multiple isoforms. To study the inhibitory capacity of PfKTIs against commercial serine proteases (trypsin and chymotrypsin) *in vitro* enzymatic assays were performed. All inhibitors showed strong inhibitory activity against trypsin and chymotrypsin (except PfKTI-1). Our results showed differences in the activity of these inhibitors against these proteases indicating a functional polymorphism. Thermostability of PfKTIs were tested by incubating these inhibitors at different temperatures, after conducting enzymatic *in vitro* assay against trypsin. The ability to maintain activity after contact with different temperatures was variable, PFKTI-3 and PFKTI-5 have abolished its activities when incubated at 80 °C while others had low inhibitory activity after incubation for 100 °C. To evaluate the ability of

bifunctional PfKTIs we conducted *in vitro* assay against papain. Although rare, two inhibitors (PFKTI-4 and PFKTI-7) showed activity against this proteinase. Enzyme assays against PfKTIs of the midgut proteases of the different insects (*Diatraea saccharalis*, *Callosobruchus maculatus* and *Aedes aegypti*) *in vitro* were applied with the purpose to evaluate the potential biopesticide of these inhibitors. All PfKTIs have acted strongly on the midgut proteases of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (an Lepidoptera insect). *In vivo* assays adding a fraction enriched with inhibitors to the diet of larval *D. saccharalis* reinforce the PIs insecticide potential against this pest. Besides this it showed bifunctional inhibitory activity (acting on more than one class of protease) were effective against cysteine proteases present in the midgut of the weevil *C. maculatus* (a coleopteran insect). Unexpectedly, all inhibitors were highly effective against the midgut protease of *A. aegypti* (dengue virus vector). In this study, through biochemical approaches, we demonstrate the flexibility of passion fruit plants to express a wide repertoire of potent Kunitz proteinase inhibitors (KPIs) in response to MeJa. These results paved the ways in the research of plant-derived PIs, these may, for example, act to control mosquito-borne disease . Additionally, our studies demonstrate the complexity of KPIs in passion fruit, which can be exploited to improve the protection of plants and emphasizes the potential of passion fruit plants as a source of bioactive compounds with diverse biotechnological applications.

Introdução

1.1 O gênero *Passiflora*

O maracujá compreende várias espécies do gênero *Passiflora*, pertencentes à família *Passifloraceae*. O gênero *Passiflora* reúne cerca de 400 espécies, a maioria delas originárias da América Tropical, sendo mais de 120 espécies nativas do Brasil (Bernacci *et al.*, 2008). Apesar disso, os cultivos comerciais no Brasil baseiam-se numa única espécie, *Passiflora edulis*, que representa mais de 95% da área cultivada, devido à qualidade dos seus frutos, vigor, produtividade e rendimento em suco (Meletti, 2011). *P. edulis* é nativa do Brasil, e possui vários nomes populares, tais como maracujá-azedo, maracujá-amarelo, maracujá-preto e maracujá-roxo. Esta espécie apresenta grande variabilidade, sendo que diferentes cores da casca do fruto são facilmente observadas. Portanto a nível taxonômico deve-se utilizar *Passiflora edulis* Sims, para toda e qualquer planta e cor de fruto do maracujá-azedo (Bernacci *et al.*, 2008).

A produção de maracujá vem ganhando grande importância no mundo, sendo o Brasil o maior produtor e consumidor mundial (Silva *et al.*, 2011). Segundo dados da Emater-RJ, o maracujá é produzido em mais de 40 municípios do estado do Rio de Janeiro e o estado está entre os principais produtores, seguido da Bahia, Espírito Santo, Sergipe e São Paulo (EMBRAPA, 2014). O cultivo do maracujá tem contribuído de forma positiva para o crescimento econômico brasileiro, gerando empregos no meio rural e urbano e também criando divisas através das exportações de suco. A popularidade dos produtos derivados do maracujá está crescendo no mercado externo, devido principalmente ao sabor exótico e marcante que eles oferecem aos consumidores (Almeida e Cunha, 2004).

Mesmo tendo posição de destaque no cenário nacional e internacional, a produtividade do maracujazeiro no país é considerada relativamente baixa em relação à demanda (Silva *et al.*, 2011.). A ocorrência de problemas fitossanitários tem contribuído, nos últimos anos, para a redução da vida útil dos novos plantios (SIDRA, 2014). Contudo, o aumento da produção ao longo dos anos pode ser observado através da evolução da área colhida de maracujá no Brasil entre 1980 e 2010 (figura 1).

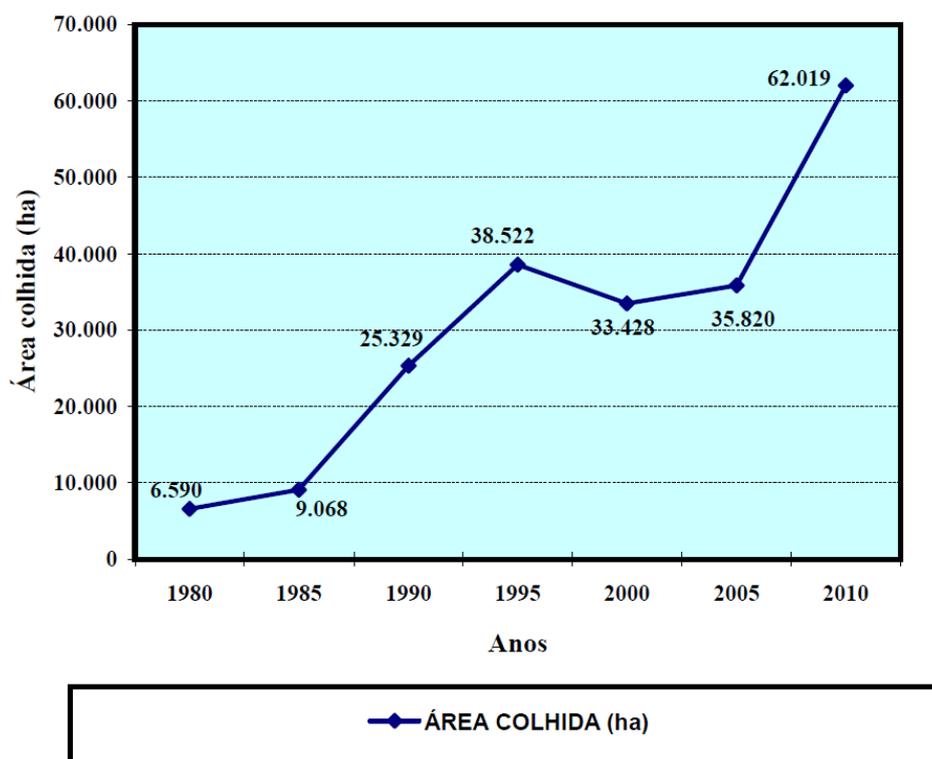


Figura 1: Representação gráfica do desempenho da cultura do maracujá no Brasil, no período 1980/2010 Fonte: www.ibge.gov.br.

Os frutos de maracujá no Brasil são destinados a dois setores, ao mercado de frutas frescas e para a industrialização, principalmente de sucos. Nos processos de industrialização há um grande potencial para o processamento de bebidas, doces e sorvetes (Melletti, 2011), e adicionalmente é utilizado como fonte de niacina, vitaminas A e C (Sjostrom *et al.*, 1978). Subprodutos desta indústria como cascas e sementes podem ser utilizados como ração animal (Cruz *et al.*, 2010). Na indústria farmacêutica utiliza-se o maracujá como calmante (Rizzi *et al.*, 1998) e observa-se um crescente interesse pelo maracujá para fins ornamentais (Cruz *et al.*, 2010).

Apesar do crescimento gradual na produção de maracujá, esta cultura sofre alguns tipos de problemas no país. Um dos grandes problemas enfrentados pelos produtores de maracujá no Brasil são as pragas, pois geralmente ocasionam grandes perdas na produção, podendo chegar a comprometer até 100% da produtividade da cultura em alguns casos (Bruckner e Picanço, 2001). A infestação de pragas na cultura de maracujá na região Norte Fluminense do

estado do Rio de Janeiro tem acarretado em uma significativa diminuição da produtividade desta região (Mondaini e Kinpara, 2003). No Brasil, as lagartas desfolhadoras da ordem Lepidóptera constituem as pragas que mais atacam o maracujazeiro. As principais espécies que atacam a cultura no país são os insetos *Dionae juno juno* e *Agraulis vanillae vanillae*. O ataque desses insetos caracteriza-se por folhas danificadas, com significativa redução da área foliar (Boiça Jr., 1998).

O desenvolvimento de pesquisas e a adoção de melhores métodos de manejo da cultura constituem pontos fundamentais para o desenvolvimento sustentável da cultura do maracujá no Brasil. Com isso, a biotecnologia tem apresentado diversas técnicas passíveis de utilização como ferramenta ao melhoramento desta cultura, sendo as transformações genéticas as mais bem sucedidas (Meletti, 2011). Dentro disso, os estudos dos mecanismos de defesa das plantas de maracujá frente aos estresses causados pelo ambiente são de grande importância, pois este conhecimento pode contribuir com a melhoria da produtividade da cultura no Brasil, auxiliando nos processos de cultivo e colheita, e conseqüentemente aumentando ainda mais sua relevância econômica para o país.

1.2 Os mecanismos de defesa vegetal

As plantas apresentam estratégias de defesa que permitem o retardo ou até mesmo impedem a penetração de agentes fitopatogênicos, tais como, vírus, bactérias, fungos, nematóides e insetos (Rojas *et al.*, 2014). De modo geral, os mecanismos de defesa vegetal podem ser agrupados em duas categorias: as defesas constitutivas, sendo estas as que fazem parte do desenvolvimento normal da planta (pré-formadas), e as defesas induzidas, sendo ativadas após a percepção do ataque (pós-formadas). Em ambas as categorias, os fatores envolvidos na resistência podem ser ainda subdivididos em estruturais e bioquímicos. As defesas estruturais atuam como barreiras físicas, enquanto que as defesas bioquímicas atuam através da produção de substâncias tóxicas ou repelentes ao patógeno, criando condições adversas ao estabelecimento deste na planta (Wittstock e Gershenzon, 2002).

Os mecanismos de resistência ditos constitutivos, ou seja, pré-formados, compreendem tanto barreiras estruturais como ceras, cutícula, tricomas, bem como barreiras químicas envolvidas no processo de defesa, como substâncias não proteicas como flavonóides, glicosídeos cianogênicos, e diversas proteínas e peptídeos com atividade antimicrobiana assim como inibidores de proteinase (PIs, do inglês *proteinase inhibitors*) (Schwan-Estrada, 2008).

Do mesmo modo, as plantas também apresentam mecanismos de resistência pós-formados, isto é, aqueles que são ativados ou aumentam o nível de compostos pré-existentes após a percepção do patógeno ou lesão por pragas. As defesas induzidas são ativadas pelo reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*) presentes na superfície do patógeno (Boller e He, 2009) ou por moléculas (efetores) translocadas pela praga/patógeno para as células vegetais (Bonardi e Dangl, 2012). Além disso, ocorre a produção de compostos químicos em resposta a estímulos físicos devido à lesão provocada pela alimentação de insetos herbívoros ou ataque de patógenos (Shewry e Lucas, 1997; De Wit, 2007). A defesa precocemente induzida gera respostas que incluem a reorganização do citoesqueleto (Higaki *et al.*, 2011), a fortificação da parede celular (Hardham *et al.*, 2007), a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*; Torres, 2010), e síntese de fitoalexinas (Ahuja *et al.*, 2012). Em geral, os eventos tardios da respostas de defesa induzida incluem a transcrição de proteínas relacionadas patogênese (PR, do inglês *pathogenesis-related*) (van Loon *et al.*, 2006) e o desenvolvimento de um tipo de morte celular programada, conhecida como resposta hipersensitiva (HR, do inglês *hypersensitive response*) que ocorre no local da infecção (Coll *et al.*, 2011).

A resposta induzida em plantas pelo ataque de insetos herbívoros é bem descrita na literatura e incluem a produção de proteínas defensivas e outras substâncias, mudanças na qualidade nutricional da planta, e a liberação de uma mistura complexa de compostos voláteis (Rojas *et al.*, 2014). Dentre estes compostos de defesa induzida, os derivados dos jasmonatos merecem destaque, pois estas substâncias são conhecidas por ativar genes cujos

produtos participam de vias de defesa, incluindo a síntese de inibidores de proteases.

1.3 Os jasmonatos

O termo jasmonatos refere-se ao ácido jasmônico (JA, do inglês *jasmonic acid*) e seus derivados ativos como o metil jasmonato (MeJa, do inglês *methyl jasmonate*) e conjugados de aminoácidos (como a valina, leucina e isoleucina) (Wasternack *et al.*, 2007). Os jasmonatos são derivados da oxidação de ácidos graxos (oxilipinas), principalmente do ácido linolênico, podendo também, em algumas plantas, ser sintetizado a partir do ácido hexadecatrienóico (Kombrink, 2012). Entre algumas de suas funções em plantas estão a modulação no crescimento das raízes, o desenvolvimento da flor, senescência e movimento de gavinhas (Wasternack *et al.*, 2013). Os jasmonatos também são moléculas ativas no desenvolvimento da resposta ao estresse de plantas juntamente com outros hormônios vegetais. Particularmente, derivados do ácido jasmônico desempenham um papel central na defesa da planta contra herbívoros. Os danos causados por pragas provocam uma rápida e transiente síntese de jasmonatos nas folhas feridas, mediando o acúmulo de várias substâncias que conferem resistência aos herbívoros (Wang e Wu, 2013). Em relação ao papel de defesa hospedeira, eles compreendem um grupo de moléculas de sinalização vegetal que partilham um elevado grau de estrutura e similaridade funcional com as prostaglandinas, moléculas de sinalização encontradas em animais. No caso das plantas, a formação do ácido jasmônico e do MeJa em resposta ao ataque de insetos e patógenos acaba culminando na expressão de genes de defesa de plantas (Gfeller *et al.*, 2010). Contudo, a elucidação do modo de ação dos jasmonatos tem sido dificultada pelo fato de que as plantas contêm muitos derivados do JA que diferem consideravelmente em sua atividade biológica (Kombrink, 2012).

A via de biossíntese dos jasmonatos ocorre em duas regiões distintas na célula vegetal (figura 2), iniciando-se através do reconhecimento de um sinal sistêmico que culmina na ativação de lipases na membrana dos cloroplastos. Com isso, há a liberação de ácido linolênico (18:3) ou ácido hexadecatrienóico

(16:3). Ainda no cloroplasto esses ácidos graxos são convertidos através da ação sequencial de três classes de enzimas, as lipoxigenase (LOX, do inglês lipoxigenase), as aleno óxido sintase (AOS, do inglês allene oxide synthase) e aleno óxido ciclase (AOC, do inglês allene oxide cyclase), em ácido 12-oxo-fitodienoico (OPDA, do inglês 12-oxophytodienoic acid). Logo após, o OPDA é exportado para os peroxissomos, onde é reduzido para OPC8 (do inglês 3-oxo-2-(20(Z)-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic) através de uma enzima chamada OPDA-redutase. O OPC8 sofre β -oxidação através de uma reação em cascata tendo a remoção de moléculas de carbono de sua cadeia principal, formando assim o JA (Gfeller *et al.*, 2010).

Uma vez formado, o JA pode passar por diferentes conversões metabólicas originando distintos jasmonatos. A formação de MeJa ocorre através de reações de metilação do JA. Acredita-se que essas reações ocorram no citoplasma sendo catalisadas por metiltransferases (Avanci *et al.*, 2010). O MeJa é capaz de provocar a indução de PIs, que se acumulam em resposta a ferimentos ou a ataques de patógenos (Cohen e Flescher, 2009). Farmer e Ryan (1990) foram os primeiros pesquisadores a revelarem que o MeJa, quando aplicado de forma exógena, é um potente indutor da formação de PIs em folhas de tomate, alface e tabaco.

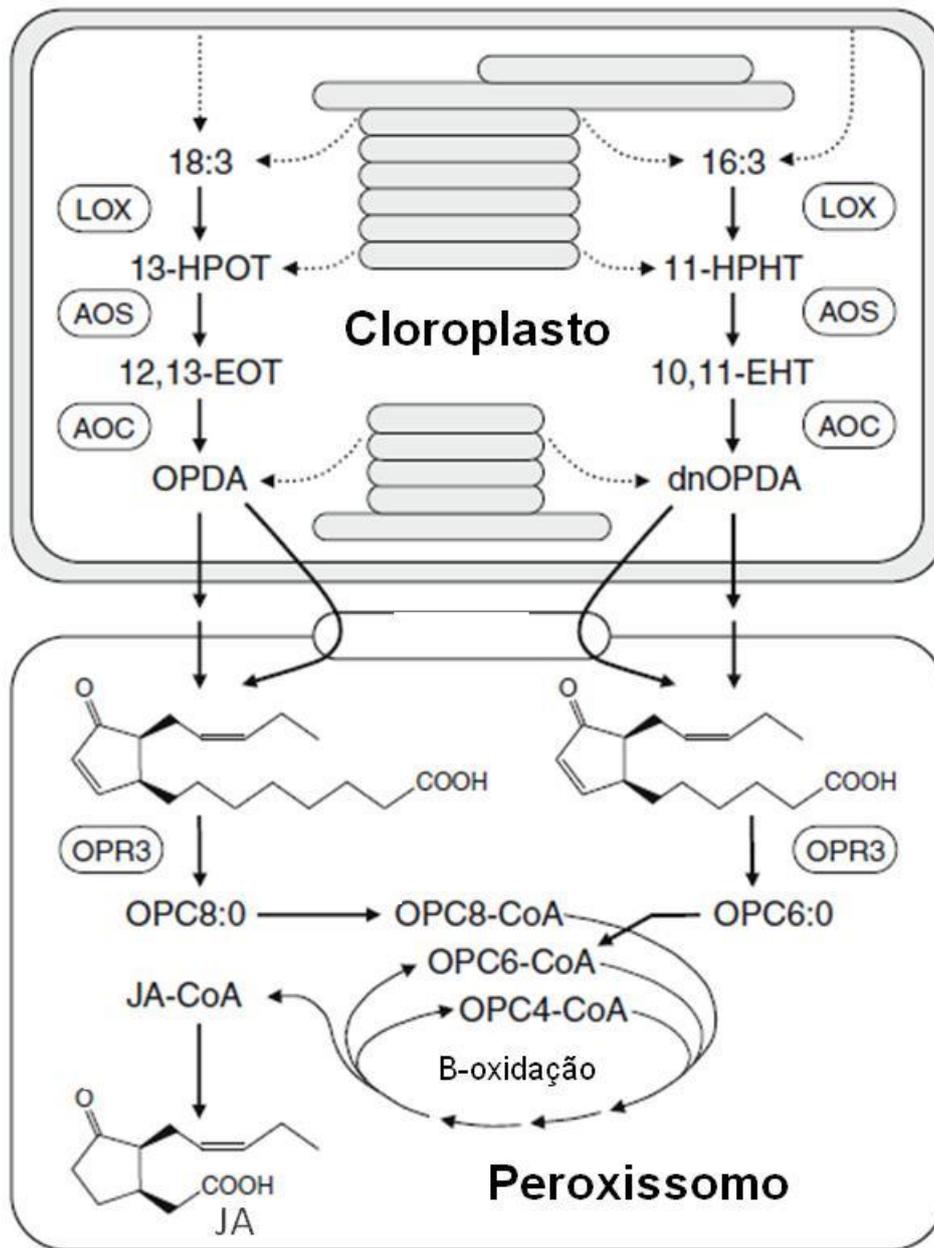


Figura 2: Esquema representando as várias etapas da via da biosíntese dos jasmonatos e dos compartimentos celulares onde as reações ocorrem em plantas. A via inicia-se com a percepção pela planta do ataque de um agressor em sua membrana celular (adaptado Schaller e Stintzi, 2009). (18:3) ácido linolênico, (16:3) ácido hexadecatrienóico, (LOX) lipoxigenase, (AOS) aleno óxido sintase, (AOC) aleno óxido ciclase, (OPDA) ácido 12-octo-fitodienoico (OPC8) 3-oxo-2-(20(Z)-pentenyl)-cyclopentane-1-octanoic).

1.4 Os inibidores de proteinase

As plantas são capazes de sintetizar uma grande variedade de moléculas para se proteger do ataque de insetos e microorganismos, sendo os PIs considerados como importante proteínas envolvidas na defesa de plantas (Silva *et al.*, 2012; Mithoefer e Boland, 2012). De modo geral, PIs são conhecidos por apresentarem um amplo espectro de atuação em diversos organismos participando de diversas funções bioquímicas, tais como a regulação metabólica, a supressão de retrovíroses *in vivo* e *in vitro*, atividade hemolítica, propriedades antifúngicas, funcionam como agentes anticarcinogênicos, estão relacionados na inibição do desenvolvimento de protozoários e no processo de defesa vegetal (Bhattacharyya e Babu, 2009; Sabotic e Kos, 2012).

Os PIs possuem a propriedade de inibir atividades catalíticas de enzimas proteolíticas (Oliveira *et al.*, 2007; Bateman *et al.*, 2011). Diferentes PIs já foram encontrados e caracterizados em plantas e animais (Macedo *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2009) e são geralmente categorizados de acordo com a classe de proteinase sobre o qual eles exercem sua ação inibitória. Assim, baseado em suas especificidades, os PIs podem interagir com o sítio catalítico de proteinases serínicas, aspárticas, cisteínicas e metalo-proteinases (Lima *et al.*, 2011; Fan e Wu, 2005.). No sítio ativo do inibidor, ou próximo a ele, há um resíduo de aminoácido que interage especificamente com o sítio da enzima responsável pelo reconhecimento do substrato primário, deste modo o inibidor pode agir contra proteinases pertencentes à classe específica que reconhece seu sítio ativo. Com isso, o complexo formado entre o sítio ativo do inibidor e o sítio catalítico da enzima bloqueia a atividade enzimática sobre qualquer substrato (Joshi *et al.*, 2013).

Os PIs de planta são um grupo diverso de proteínas, compreendendo pelo menos 10 famílias agrupadas como: Inibidores do tipo Kunitz, inibidores Bowman-Birk, inibidores de protease cisteínica (fitocistatina), *Potato I*, *Potato II*, inibidores do tipo *Squash*, inibidor de tripsina cereais/ α -amilase, inibidor metalocarboxi, serpinas e inibidor de mostarda (De Leo *et al.*, 2002; Rawlings *et al.*, 2014). Os PIs podem ser encontrados em órgãos vegetativos e órgãos de armazenamento de quase todas as plantas cultivadas importantes na

agricultura (Volpicella *et al.*, 2011), onde estão amplamente distribuídos entre as diferentes famílias e são particularmente abundantes (de 1 a 10% das proteínas totais) (Oliveira *et al.*, 2007). Com isso, estudos do polimorfismo e distribuição dos PIs no tecido vegetal de várias espécies de plantas são relevantes para compreensão dos processos de evolução dos mecanismos de resistência contra pragas (Konarev *et al.*, 2002). Além disso, o acúmulo de PIs em tecidos vegetais como uma resposta a ferimento mecânico, herbivoria e a presença de jasmonatos é um atributo característico de suas funções defensivas contra a predação (Howe e Jander, 2008).

Diferentes aspectos levam ao interesse no isolamento e caracterização dos PIs visto que: (i) são ferramentas inestimáveis para alcançar uma melhor compreensão dos princípios que fundamentam a interação proteína-proteína (Chandrasekaran *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2011); (ii) a sua ação regulatória no processo fisiológico via equilíbrio protease-inibidor (Neuteboom *et al.*, 2009; Jimenez-Duran *et al.*, 2013); (iii) seus polimorfismos são características atraentes para o estudo da evolução molecular (Christeller, 2005; Wang *et al.*, 2008). (iv) o seu potencial na aplicação terapêutica (Muricken e Gowda 2011; Wu *et al.*, 2012).

Atualmente, um dos principais focos dos estudos de PIs de plantas está na identificação de potenciais inibidores contra proteases digestivas de insetos, e na compreensão da natureza dinâmica das proteinases do intestino médio de insetos a nível molecular (Bode *et al.*, 2013). A função primordial dos PIs no mecanismo de defesa de plantas contra o ataque de insetos é assumida por provocar a interferência na digestão de proteínas. Além da inibição direta das proteinases digestivas, a hiper-secreção de enzimas digestivas causada pela presença de PIs no trato digestivo resulta na baixa disponibilidade de aminoácidos essenciais livres e conseqüente redução da síntese de proteínas necessárias aos processos de crescimento e desenvolvimento, ou mesmo nos processos reprodutivos do inseto (Bazok *et al.*, 2005).

1.5 Os Inibidores de proteínase serínica

Dentre todas as classes de PIs, os inibidores de proteínase serínica (SPI, do inglês *serine proteinase inhibitors*) são os mais bem estudados. Eles são amplamente distribuídos na natureza e podem inibir a ação de proteases serínicas em diferentes organismos (Teles *et al.*, 2004; Roberts *et al.*, 2011). Eles são encontrados em tecidos animais, microorganismos e também em tecidos vegetais (Pando *et al.*, 2001; Jamal *et al.*, 2013) e usualmente estão presentes em múltiplas formas. Sua classificação em várias famílias é feita com base na similaridade da estrutura primária, na localização do sítio ativo, nas características estruturais e em seu mecanismo de ação (Ranasinghe e McManus, 2013). Apesar das famílias possuírem sequências primárias e estruturais diferentes, os mecanismos de catálise e estrutura do local de reação do inibidor são bem conservados (Koiwa *et al.*, 1997).

Durante muitos anos os SPI têm sido investigados por várias razões, dentre as quais pode-se incluir sua utilidade nos estudos das interações proteína-proteína (Rao e Suresh, 2007). No entanto, devido os SPI participarem no controle da atividade de proteínases em diferentes processos fisiológicos, suas funções nos organismos onde são encontrados ainda não são totalmente compreendidas (Teles *et al.*, 2004).

Nos vegetais os SPI estão agrupados nas famílias Kunitz, Bowman Birk, *Potato I* e *II* e na família de inibidores *Squash* (Joshi *et al.*, 2013). Os SPI possuem importante potencial inibitório contra enzimas digestivas de insetos herbívoros de plantas economicamente importantes. Estes inibidores formam um importante componente na estratégia do mecanismo de defesa de várias espécies de planta. Em geral, a taxa de síntese destes inibidores atinge o ápice em 12 horas e resulta em níveis máximos de acúmulo por volta de 24 a 48 horas após o ataque de um inseto (Bhattacharyya *et al.*, 2007).

Insetos lepidópteros possuem como maioria de suas enzimas digestivas as proteases serínicas, fazendo com que a produção de SPI contra esta classe de protease em plantas seja um importante mecanismo de defesa, atuando como bioinseticida (Chougule *et al.*, 2008). Esses inibidores entram no trato digestivo dos insetos juntamente com o alimento provocando bloqueio na digestão de proteínas, em consequência, há uma privação de aminoácidos e

energia, resultando em retardo do crescimento e do desenvolvimento destes insetos (Yoshizaki *et al.*, 2007). Este efeito pode ser observado quando os insetos são alimentados com dietas artificiais contendo inibidores específicos contra a classe principal de proteinases presentes em seu intestino. Além disso, uma ação sinérgica dos inibidores pode ocorrer, desenvolvendo inseticidas mais eficazes quando misturado diferentes grupos de inibidores (Oliva *et al.*, 2010). Com isso, surge o interesse de produzir cultivares transgênicos expressando genes de inibidores, tornando assim essas plantas resistentes a insetos herbívoros (Yoshizaki *et al.*, 2007).

1.6 Os Inibidores de proteinase do tipo kunitz

Os inibidores de proteinase do tipo Kunitz (KPIs, do inglês *Kunitz-type proteinase inhibitors*) encontrados na soja foram os primeiros inibidores a serem descritos (Kunitz, 1945). Normalmente, os KPIs são proteínas de cadeia simples, que variam seu peso molecular entre 18 e 24 kDa, apresentam em média 180 resíduos de aminoácidos com baixo conteúdo de cisteína, formando duas pontes dissulfeto e um único sítio de reação (Oliva *et al.* 2010).

Os KPIs de plantas compreendem proteínas com atividade inibitória contra várias proteases serínicas, tais como enzimas digestivas (quimotripsina e tripsina), enzimas de coagulação do sangue (calicreína do plasma, factor XII, factor XI, factor Xa e trombina), enzimas do sistema fibrinolítico (plasmina), bem como enzimas envolvidas em processos inflamatórios (elastase e catepsina G) (Oliva *et al.*, 2010). Além disso, em alguns casos os KPIs também são capazes de inibir proteinases de outras classes, como as aspárticas e as proteinases cisteínicas o qual participam de diversos processos fisiológicos em plantas e animais (Lima *et al.* 2011).

A maioria dos KPIs de plantas conhecidos foram estudados de forma isolada, conseqüentemente poucos grupos de pesquisa voltaram seus estudos para a complexidade deste tipo de inibidor em uma dada espécie de planta, tal como descrito para a batata, por exemplo, onde estudos demonstram a presença de diversidade bioquímica entre esses inibidores enfatizando a importância da atuação dessas moléculas em conjunto nos processos de

defesa vegetal (Heibges *et al.*, 2003a; Major e Constabel, 2008; Philippe *et al.*, 2009).

A indução de KPIs por MeJa, ferimento mecânico e herbivoria em folhas de maracujá já foram estudados pelo nosso grupo de pesquisa. Dessa forma, a purificação parcial assim como a sequências de aminoácidos da região N-terminal de alguns inibidores foram obtidas (Botelho-Júnior *et al.*, 2008). Com base nisso, o presente trabalho teve como objetivo concluir a purificação desses inibidores, assim como caracterizar bioquimicamente cada inibidor.

1.7 Insetos utilizados como modelo de estudo do potencial biopesticida dos PIs.

1.7.1 *Diatraea saccharalis*.

D. saccharalis também é conhecida popularmente como broca da cana de açúcar, é um lepidóptero existente nas Américas. Em sua fase adulta se apresenta como uma mariposa de hábitos noturnos que faz a postura de seus ovos na parte dorsal das folhas de plantas como cana de açúcar, arroz, milho, sorgo e outras gramíneas (Bortoli *et al.*, 2005; Sidhu *et al.*, 2013). Para a cana de açúcar, nos primeiros dias de vida, as lagartas se alimentam dos tecidos foliares, com posterior penetração no interior dos colmos. Seus prejuízos diretos originam-se das galerias que fazem nos colmos, impedindo o fluxo de seiva, provocando também perda de massa, redução de sacarose e açúcares redutores, além do tombamento da planta pela ação do vento (Vacari *et al.*, 2012). Indiretamente, favorecem a contaminação das plantas por microrganismos fitopatogênicos que podem causar a podridão vermelha do colmo, cujos fungos causadores são *Colletotrichum falcatum* e *Fusarium moniliforme*, provocando a inversão da sacarose, diminuindo a pureza do caldo, o que reduz o rendimento de açúcar e álcool (Gallo *et al.*, 2002; Bravo *et al.*, 2008). O manejo desta peste está embasado no controle biológico, especialmente envolvendo o parasitóide de lagartas *Cotesia flavipes* (uma espécie de vespa), cujo número de adultos liberados no canavial atacado depende da população de lagartas da broca em campo (Dinardo-Miranda *et al.*, 2011).

A *D. saccharalis* têm importância econômica na maioria dos países onde a cultura de cana de açúcar tem expressão. O Brasil é o maior produtor mundial de cana de açúcar sendo a *D. saccharalis* a praga que mais causa perdas à cultura no país (Silva *et al.*, 2012). A produção brasileira de cana de açúcar deve alcançar 594,07 milhões de toneladas na safra 2013/14 onde cerca de 86% da produção está concentrada no Centro-Sul, sendo 52,6%, em São Paulo, onde o plantio da cana de açúcar ocupa 4,4 milhões de hectares. A produção total de álcool deve alcançar 23,6 bilhões de litros, sendo 14,5 bilhões do tipo hidratado e 9,1 bilhões do anidro (CONAB, 2014).

Devido a crescente importância da cana de açúcar na economia, e sendo a *D. saccharalis* a principal praga que acomete a cultura no Brasil. Torna-se interessante a utilização da *D. saccharalis* como inseto modelo para estudos do potencial bioinseticida dos PIs de maracujá. Proteinases serinicas (tripsina, quimotripsina e elastase) são as principais enzimas presentes no intestino médio de lepidópteros (Parde *et al.*, 2010), incluindo *D. saccharalis*. Com isso, o envolvimento dos PIs na estratégia de defesa das plantas contra insetos baseia-se na inibição destas proteinases que estão envolvidas diretamente em processos vitais desta praga (Ramos *et al.*, 2012).

1.7.2 *Callosobruchus maculatus*.

Callosobruchus maculatus (Coleoptera: Bruchidae), é considerado a praga mais relevante de *Vigna unguiculata* (popularmente conhecido como feijão-de-corda) em regiões tropicais e subtropicais, podendo causar perdas na produção na ordem de 60% (Pereira *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2014) chegando a atingir, em seis meses de armazenamento, 90% de perdas em termos de sementes perfuradas (Almeida *et al.*, 2006). Esta praga inicia sua infestação no campo, onde oviposita nas vagens, podendo continuá-la no armazém (Gallo *et al.*, 2002). *C. maculatus* consegue destruir cerca de metade da safra brasileira anual de *V. unguiculata* e, de modo geral, causa perdas de 30% a 40% nos principais grãos colhidos no país, principalmente milho, trigo, soja e arroz (Brito *et al.*, 2006). Os danos causados são decorrentes da colonização do interior dos grãos pelas larvas do inseto, resultando em perda de peso, desvalorização comercial, redução do valor nutritivo, do grau de higiene do produto pela presença de excrementos, ovos e insetos e do poder

germinativo das sementes (Almeida *et al.*, 2005., Carvalho *et al.*, 2011; Marsaro Jr *et al.*, 2011). Em consequência disso, o ataque de insetos em sementes armazenadas constitui um problema que se agrava cada vez mais, devido principalmente, ao desconhecimento dos produtores quanto à utilização e manuseio de substâncias químicas (Castro *et al.*, 2013).

Com a utilização de métodos alternativos procura-se encontrar técnicas que permitam manejar a resistência do *C. maculatus* aos praguicidas organosintéticos, assim como estratégias que proporcionem uma opção de controle, que evitem a eliminação dos inimigos naturais, a contaminação da água, do ar e do solo, a intoxicação dos produtores e, especialmente, a acumulação de substâncias tóxicas nos produtos agrícolas alimentícios (Almeida *et al.*, 2005).

Larvas de *C. maculatus* apresentam no seu sistema digestivo, em sua maioria, enzimas da classe das proteinases cisteínicas (Hines *et al.*, 1991). Sendo assim, neste trabalho, achamos relevante avaliar a capacidade dos inibidores purificados contra enzimas digestivas desta praga, auxiliando-nos na caracterização destas moléculas como possíveis agentes bifuncionais.

1.7.3 *Aedes aegypti*.

O *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é um mosquito originário da África, onde existem populações selvagens e domésticas. Originalmente foi descrito no Egito, o que lhe conferiu seu nome específico (*Aedes aegypti*). Este inseto tem acompanhado o homem em sua permanente migração. Por todo continente Americano o *A. aegypti* foi disseminado pelo próprio homem através do transporte dos seus ovos, larvas e até do mosquito adulto em navios, aviões e veículos terrestres. No mundo moderno o *A. aegypti* se adaptou facilmente às áreas urbanas e vive preferencialmente dentro das casas ou perto delas, uma vez que lá encontra melhores condições para sua reprodução: sangue humano e depósitos com água (Barreto, 2005; Rochel e Gould, 2013; Chen e Vasilakis, 2011). As fêmeas passaram a ovipor em ecótopos artificiais localizados no domicílio e peridomicílio. Quase toda coleção de água limpa e parada (caixas d' água, cisternas, latas, pneus, cacos de vidro e vasos de plantas) funciona

como criadouro potencial para sua proliferação. Alguns pesquisadores já relataram o desenvolvimento do mosquito também em água poluída (Monath, 1994; Silva *et al.*, 1999). Essa espécie apresenta hábitos diurnos, alimentando-se e depositando seus ovos, preferencialmente, ao amanhecer e no período vespertino próximo ao crepúsculo (Braga, 2007).

O mosquito *A. aegypti* é o vetor que transmite as viroses responsáveis pela dengue e a febre amarela, doenças consideradas um importante problema de saúde pública mundial (Abbas *et al.*, 2014). Estima-se que 50-100 milhões de pessoas são infectadas anualmente em mais de 100 países de todos os continentes, com exceção da Europa e da Antártida. Destes casos, cerca de 550 mil necessitam de hospitalização e pelo menos vinte mil levam ao óbito (WHO, 2012). Na região das Américas foram registrados, no início de 2012, mais de 120.000 casos de dengue pelo Programa Regional da Dengue da Organização Mundial da Saúde, com 1.855 casos graves e 40 óbitos, tendo sido verificada a manifestação dos quatro sorotipos de vírus (OPAS/OMS, 2012). Nesse contexto, a dengue tornou-se um problema contemporâneo e urgente para o sistema sanitário.

Apesar de alguns avanços recentes nas pesquisas para a busca de vacinas para prevenção da dengue, ainda não foi comprovada a eficácia das mesmas (Coller *et al.*, 2011). Sendo assim, a medida de controle disponível para se evitar as infecções causadas pelo vírus da dengue é o combate ao seu principal vetor urbano, o mosquito *A. aegypti*, sendo a eliminação das larvas o método de controle ideal, uma vez que os mosquitos habitam locais abrigados e de difícil acesso (Teixeira *et al.*, 1996).

As estratégias utilizadas para controle das larvas e dos mosquitos *A. aegypti* são baseadas no uso de várias técnicas disponíveis, como o emprego do bioinseticida *Bacillus thuringiensis* (Bti), peixes larvófagos das espécies *Gambusia affinis* e *Poecilia* spp e dos inseticidas químicos das classes dos piretroides, carbamatos e organofosforados, além da melhoria de saneamento (Lefevre *et al.*, 2003). No entanto, o uso continuado de inseticidas sintéticos tem causado o problema de descontrole da população do mosquito, levando ao surgimento de espécies resistentes a uma grande variedade de inseticidas.

Esta estratégia também tem provocado outros efeitos indesejáveis, tais como poluição ambiental e toxicidade para seres humanos e outros organismos (Marcoris *et al.*, 1999). Assim, torna-se necessária a busca de novas alternativas ambientalmente seguras, potencialmente adequadas e mais eficazes para uso em programas de combate à larva do *A. aegypti*. Uma das tendências atuais neste sentido é a prospecção de produtos naturais de origem vegetal com propriedades larvicidas (Garcez *et al.*, 2013). Trabalhos realizados com o intuito de isolar e caracterizar substâncias bioativas com atividade larvicida contra *A. aegypti* são descritos desde a década de 1980. Contudo, a maior parte dos estudos é realizada com extratos brutos e óleos essenciais, sendo que, na maioria destes casos, não se conhece o composto responsável pela atividade apresentada (Sckenkel *et al.*, 2000). Neste contexto, faz-se interessante avaliar o potencial bioinseticida dos PIs obtidos neste trabalho sobre *A. aegypti*.

Objetivos

Geral:

Purificar e caracterizar bioquimicamente SPI induzidos por MeJa em folhas de maracujá, assim como avaliar o potencial biopesticida de cada inibidor contra representantes de 3 ordens de insetos.

Objetivos específicos:

- Purificar, através de técnicas cromatográficas, inibidores de proteinase serínica induzidos por MeJa em folhas de maracujá;
- Obter a sequência de aminoácidos parcial da região N-terminal de todos os inibidores purificados;
- Determinar a estabilidade dos inibidores em diferentes condições de temperatura;
- Avaliar o potencial inibitório *in vitro* de cada inibidor purificado contra enzimas comerciais (tripsina, quimiotripsina e papaína);
- Testar o potencial inibitório *in vitro* de cada inibidor contra as enzimas digestivas presentes no intestino médio de larvas de *Diatraia saccharalis* e de larvas e adultos de *Aedes aegypti*;
- Estudar o potencial inibitório contra enzimas digestivas presentes no intestino médio de larvas de *Callosobruchus maculatus*, das proteínas purificadas que apresentarem atividade inibitória contra papaína;
- Avaliar o desenvolvimento e a sobrevivência das larvas de *Diatraia saccharalis* alimentadas com dieta na presença de inibidores de proteinase purificados.

Materiais e Métodos

3.1 Material Biológico.

Sementes de maracujá (*Passiflora edulis* Sims) obtidas a partir de frutos comprados em mercado local do município de Campos dos Goytacazes foram coletadas, secadas em temperatura ambiente por 24 horas e estocadas.

Proteases serínicas: Tripsina e quimiotripsina de pâncreas bovino foram comprados da Sigma Co, St Louis, U.S.A.

Protease cisteínica: Papaína do latex de mamão foi comprado da Sigma Co, St Louis, U.S.A.

Inibidores de proteinase comerciais: SoyKI (inibidor do tipo Kunitz de Soja) e eggCys (cistatina do ovo, inibidor de proteinase cisteínica) foram comprados da Sigma Co, St Louis, U.S.A.

Larvas de *Diatraea saccharalis* neonatas e no quarto estágio de desenvolvimento foram doadas pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), campus Leonel Miranda, situada em Campos dos Goytacazes. Ambas foram usadas no mesmo dia da doação.

Larvas de *Callosobruchus maculatus* no terceiro estágio de desenvolvimento foram cedidos pela professora Dra Antonia Elenir Amâncio Oliveira do Laboratório de química e funções de peptídeos e proteínas (LQFPP), da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Estas larvas foram imediatamente utilizadas após o recebimento.

Intestino de mosquitos adultos fêmeas (5 dias de idade) e larvas (quarto estágio de desenvolvimento) de *Aedes aegypti* foram cedidos pelo professor Dr. Francisco José Alves Lemos do Laboratório de biotecnologia (LBT), da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF).

Metil jasmonato (MeJa, do inglês methyl jasmonate) foram comprados da Sigma Co, St Louis, U.S.A.

3.2 Padronização da indução de inibidores de proteinase por vapores de metil jasmonato

3.2.1. Cultivo de plantas de maracujá.

Sementes de plantas de maracujá foram germinadas em vermiculita e depois transferidas para vasos de xaxim, onde permaneceram durante 20 dias em câmara de crescimento com fotoperíodo de 17 h de luz a 28 °C e 7 h no escuro a 18 °C. Neste estágio de desenvolvimento as plantas possuem quatro folhas, sendo duas expandidas e duas apicais ainda em desenvolvimento.

3.2.2 Tratamento com metil jasmonato.

Para o tratamento com MeJa utilizamos metodologia descrita por Rangel *et al.* (2002), 3 µL da solução estoque de MeJa 96% foi colocado na ponta de um cotonete preso a parede de recipientes de vidro com volume de aproximadamente 4.000 cm³. Plantas intactas de maracujá foram colocadas neste recipiente e os mesmos foram fechados e vedados com parafilme, pois o MeJa é uma substância volátil. Desta forma, as plantas ficaram expostas continuamente aos vapores de MeJa (48 e 96 horas) e adicionalmente à luz durante as primeiras 24 h, para intensificar a resposta de defesa. Ao fim do tratamento, as folhas foram coletadas e imediatamente mergulhadas em nitrogênio líquido.

3.3 Extração de proteínas foliares.

Folhas de plantas de maracujá expostas aos vapores de MeJa como descrito no item 3.2.2 foram maceradas, utilizando-se grau e pistilo, na presença de nitrogênio líquido. Foram adicionados polivinilpolipirrolidona (10% do peso das folhas) e o conteúdo protéico foi extraído pela adição de 3 mL de tampão de extração (fosfato de sódio 50 mM, pH 6,5) para cada grama de folha. O material foi homogeneizado suavemente durante alguns minutos e mantido a temperatura de 4 °C, sendo em seguida centrifugado durante 20 minutos, a 10.000 x g, 4 °C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o precipitado descartado. O sobrenadante foi utilizado imediatamente.

3.4 Dosagem do teor protéico.

O teor protéico dos extratos foliares obtidos foi quantificado utilizando-se o Método de Bradford (1976). Uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) foi feita de acordo com as instruções do *Kit Bio-Rad Protein Assay*. A curva padrão foi projetada num gráfico de absorbância a 595 nm versus μg de proteína. A massa de proteína correspondente a cada extrato foliar foi determinada a partir do gráfico da curva padrão.

3.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE 12,5%).

As proteínas estudadas neste trabalho foram analisadas em géis de poliacrilamida 12,5 % conforme metodologia descrita por Laemmli (1970). As amostras protéicas foram preparadas previamente com tampão de amostra contendo Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, glicerol 10%, ABF 0,001%, SDS 2% e β -mercaptoetanol 5%, aquecidas a 100 °C durante 3 minutos e centrifugados por alguns segundos. Como padrão de peso molecular utilizamos o kit Pharmacia Biotech, com faixa de peso molecular variando de 14,4 a 94,0 kDa. O tampão de corrida utilizado foi constituído por Tris 0,025 M, Glicina 0,192 M; SDS 0,1%. A corrida eletroforética foi realizada com voltagem constante (100 V) por cerca de 1 h. Logo após, as proteínas foram fixadas e coradas pela imersão do gel em solução contendo *Coomassie Brilliant Blue R 250* 0,2%, 45% de metanol e 10% de ácido acético durante aproximadamente 30 min. Em seguida, os géis foram colocados em solução descorante contendo 5% de metanol e 7% de ácido acético.

3.6 Ensaio de inibição de atividade proteolítica da tripsina *in gel*.

Ensaio de inibição de tripsina *in gel* foram realizados com base na metodologia descrita por Felicioli *et al.* (1997). Amostras protéicas foram separadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) contendo 0,5% de gelatina comercial (Sigma) de acordo com o método de Laemmli (1970) excluindo-se o β -mercaptoetanol e o aquecimento a 100 °C do processo de

preparo de amostras. Experimentos utilizando inibidores purificados foram realizados com géis comprados (Biorad) contendo 0,1% de gelatina através de condições nativas (PAGE). Com o intuito de remover o SDS após a separação por eletroforese em condições semi-desnaturantes, géis foram imersos em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 com 2,5% de Triton X-100 por três vezes num período de 20 minutos. Logo após, os géis foram incubados a 37 °C por 1 h em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 com CaCl 20 mM contendo 50 µg/ml de tripsina. Em seguida, os géis foram lavados suavemente com água destilada para retirar o excesso de tripsina. Por fim, as proteínas foram fixadas e coradas pela imersão do gel em solução contendo *Coomassie Brilliant Blue R 250* 0,2%, 45% de metanol e 10% de ácido acético durante aproximadamente 30 min. Em seguida, os géis foram colocados em solução descorante contendo 5% de metanol e 7% de ácido acético. A ocorrência de bandas azuis escuras presentes no gel demonstra a presença de inibidores de proteinase, pois nestas regiões ocorre a incapacidade da digestão da gelatina pela tripsina.

3.7 Purificação dos inibidores de proteinase serínica induzidos por MeJa em tecido foliar.

O cultivo das plantas de maracujá, a exposição ao vapor de MeJa e extração proteica foram feitos como descritos nos itens 3.2.1, 3.2.2 e 3.3, respectivamente. Após isso, foi realizado um processo de precipitação protéica, por sulfato de amônio de acordo com metodologia descrita por Rangel *et al.* (2002). Foi adicionado inicialmente sulfato de amônio numa concentração suficiente para se atingir uma saturação de 20%. A solução permaneceu sob agitação suave durante 3 h a 4 °C. O material obtido foi centrifugado a 10.000 x g por 20 min a 4 °C. Terminada a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e a ele adicionado sulfato de amônia para atingir uma saturação de 55%. A solução permaneceu sob agitação suave durante 3 h a 4 °C. O material foi centrifugado como descrito acima. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi coletado e completamente ressuspenso no menor volume possível de tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e foi chamada de fração F30-55.

A fração F30-55 obtida após o processo de precipitação foi submetida a uma cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-100,) em coluna de 32 X

2,0 cm previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, sob um fluxo de aproximadamente 1 mL por minuto. As frações coletadas foram submetidas a ensaio de atividade inibitória *in vitro* avaliando quanto à atividade inibitória contra tripsina (conforme descrito no item 3.9)

As frações que obtiveram atividade biológica sobre a atividade da tripsina *in vitro* (item 3.9) foram reunidas e passaram por processo de diálise e liofilização sendo então chamadas de fração enriquecida com inibidores. Este material liofilizado foi solubilizado em água (10% do seu volume inicial). Logo após, o material obtido foi submetido a uma cromatografia de fase reversa em alta pressão (RP-HPLC) conforme descrito por Garcia *et al.* (2004) com modificações. Foi utilizado uma coluna C18 (ST, 18 μ , 4.6 x 250 mm, Amersham Biosciences) em um fluxo de 0,7 mL/min. A corrida cromatográfica foi iniciada com 100% de solvente A (fosfato de potássio 10 mM, pH 6,0 em água) por 10 min seguido por um gradiente linear (0 a 100%) do solvente B (fosfato de potássio 10 mM em 50% de acetonitrila) por 65 min. As proteínas foram detectadas e coletadas por monitoramento da absorbância a 220 nm.

Para avaliarmos a homogeneidade das proteínas purificadas, uma segunda etapa de cromatografia de fase reversa foi realizada para cada fração obtida anteriormente. Nessa nova etapa cromatográfica mantivemos mesmo fluxo e coluna utilizados anteriormente. As corridas cromatográficas foram iniciada com 100% de solvente A (0,1% de TFA em água) por 10 min seguido por um gradiente linear (0 a 100%) do solvente B (0,1% de TFA em 80% de acetonitrila) por 80 min. As proteínas foram detectadas e coletadas por monitoramento da absorbância a 220 nm.

O perfil protéico de cada fração foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (como descrito no item 3.5). As frações que não apresentaram homogeneidade foram submetidas a cromatografia nas mesmas condições da segunda etapa, onde as amostras foram coletadas de forma diferenciada. Neste caso, na tentativa de separar as proteínas eluídas na mesma amostra, o pico apresentado na técnica em questão foi coletado em três frações distintas, a primeira coletada durante a subida do pico, a segunda no ápice do pico e a terceira na descida do pico. O perfil protéico de cada fração foi avaliado por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE 12,5%).

3.8 Sequência dos aminoácidos da região N-terminal.

O sequenciamento da região N-terminal dos inibidores de proteinase serínica purificados como descrito no item 3.7, foi realizado através da técnica de degradação de Edman pela Dr^a Olga Lima Tavares do Laboratório de química e funções de peptídeos e proteínas (LQFPP), da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). A homologia das sequências obtidas foram comparadas com outros inibidores depositados em banco de dados através do programa Protein BLAST (NCBI). O alinhamento final das sequências foi feito com CLUSTALW2 (programa de alinhamento de sequências múltiplas para DNA ou proteínas, produzindo alinhamentos de sequências divergentes com significância biológica. O programa calcula os melhores pareamentos para cada sequência, e mostra os alinhamentos de tal forma que as identidades e diferenças fiquem claras).

3.9 Ensaio de inibição de atividade proteolítica da tripsina *in vitro*.

Para o estudo da atividade dos inibidores de proteinase serínica contra tripsina, foi utilizado metodologia descrita segundo Erlanger *et al.* (1961). Neste ensaio foi utilizado BApNA (do inglês N α - Benzoil -DL -Arginine 4-Nitroanilide) como substrato. Diferentes concentrações dos inibidores purificados foram pré-incubado com 5 μ L de tripsina 100 μ g/mL (W/V) diluída em tampão de reação (Tris-HCl, 50 mM, pH 8.0, com CaCl₂ 20 mM). O volume foi ajustado (100 μ L) pela adição de tampão de reação, e em seguida, os tubos permaneceram a 37 °C por 5 min. Logo após, a reação foi iniciada pela adição de 100 μ L de BApNA 2 mM em DMSO 10% e incubada a 37 °C por 30 minutos. A reação foi parada pela adição de 100 μ L de ácido acético 30%. A atividade inibitória foi avaliada através do declínio da hidrólise do BApNA pela tripsina quando os P_fKTIs estavam presentes. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 405 nm. Para comparar diretamente os níveis de atividade inibitória dos PIs purificados, calculou-se a concentração dessas moléculas com capacidade de inibir 50% da atividade enzimática (IC₅₀, do inglês *inhibitory concentration required for 50% inhibition*). Os valores de IC₅₀

foram calculados a partir da análise da regressão linear dos gráficos obtidos da titulação de cada inibidor contra a enzima em questão.

3.10 Ensaio de inibição da atividade proteolítica da quimiotripsina *in vitro*.

Para o estudo da atividade dos inibidores de proteinase serínica contra quimiotripsina, foi utilizado como substrato BTEE (do inglês N- α -benzoyl-L-tyrosyl ethyl ester hydrochloride) segundo metodologia descrita por Huang *et al.* (2007). As amostras obtidas foram pré-incubadas com 50 μ L de quimiotripsina 20 μ g/mL (W/V) diluída em 1 mM de ácido clorídrico. O volume foi ajustado (500 μ L) pela adição de tampão de reação (Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0, com CaCl₂ 20 mM), e em seguida, os tubos permaneceram a 25 °C por 3 min. Logo após, a reação foi iniciada pela adição de 500 μ L de BTEE 2 mM em 50% metanol com Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0, e incubada a 25 °C por 6 minutos. A atividade inibitória foi avaliada através do declínio da hidrólise do BTEE pela quimiotripsina quando os inibidores estavam presentes. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda a 256 nm. Para comparar diretamente os níveis de atividade inibitória dos PIs purificados, calculou-se a concentração dessas moléculas com capacidade de inibir 50% da actividade enzimática (IC₅₀). Os valores de IC₅₀ foram calculados a partir da análise da regressão linear dos gráficos obtidos da titulação de cada inibidor contra a enzima em questão.

3.11 Ensaio de inibição de atividade proteolítica da papaína *in vitro*.

A atividade inibitória das proteínas purificadas contra a papaína foi medida usando-se BANA (do inglês, N- α -benzoyl-DL-arginine β -naphthylamide hydrochloride) como substrato, segundo metodologia de Abe e colaboradores (1994). Na solução de ensaio estava contido 1 μ g de papaína (0,1 μ g/ μ l) diluída em tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0, adicionados a diferentes concentrações das proteínas purificadas. O ajuste do volume final (350 μ l) foi feito pela adição do tampão fosfato de sódio (NaH₂PO₄) 0,25 M, pH 6,0 contendo EDTA 2,5 mM e β -mercaptoetanol 25 mM. Em seguida, os tubos

foram incubados a 37 °C por 5 minutos. A atividade enzimática foi iniciada pela adição de 35 µl de BANA (5,0 mM em DMSO 10%) onde os tubos foram incubados a 37 °C por 10 minutos. A reação foi parada pela adição de 500 µl de HCl 2% em etanol. A reação de coloração foi obtida pela adição de 500 µl de p-dimetilaminacinnamaldeído 0,06% em etanol. A leitura de absorbância foi feita utilizando um espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540nm. A atividade inibitória foi detectada a partir do declínio da hidrólise do BANA pela papaína quando os inibidores estavam presentes. Para comparar diretamente os níveis de atividade inibitória dos PIs purificados, calculou-se a concentração dessas moléculas com capacidade de inibir 50% da actividade enzimática (IC₅₀). Os valores de IC₅₀ foram calculados a partir da análise da regressão linear dos gráficos obtidos da titulação de cada inibidor contra a enzima em questão.

3.12 Estabilidade Térmica da atividade inibitória contra tripsina.

Para observar o potencial termoestável dos inibidores purificados utilizamos método descrito por Macedo *et al.* (2007). Os PIs purificados (0,1 mg/ml em água) foram aquecidos a banho-maria em diferentes temperaturas (37, 50, 60, 80 e 100 °C) por 30 minutos. Logo após, as amostras foram resfriadas a 4 °C por 10 minutos, sendo em seguida analisadas quanto a capacidade inibitória contra tripsina de acordo com o item 3.9.

3.13 Ensaio de inibição da atividade proteolítica das enzimas digestivas de larvas de *Aedes aegypti*.

Para o estudo da atividade dos inibidores de proteinase serínica contra enzimas digestivas de larvas de *Aedes aegypti*, foi utilizado metodologia descrita segundo Lemos *et al.* (1996), com modificações. Mosquitos adultos (5 dias de idade) e larvas (quarto estágio de desenvolvimento) de *A. aegypti* foram imobilizados em gelo para remoção dos intestinos médios, que logo após, foram homogeneizados em Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e centrifugados a 10.000 x g por 30 min a 4 °C. Após a centrifugação coletamos o sobrenadante

que foi usado como solução rica em proteinases e descartamos o precipitado. Após adquirirmos esse extrato, foi realizada dosagem do teor protéico como descrito no item 3.4 e em seguida, realizamos um ensaio da atividade enzimática como descrito a seguir. O efeito da atividade proteolítica do extrato dos intestinos médios da larva foi medido usando BApNA (1 mM) como substrato. Neste ensaio utilizamos Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 como tampão de reação. O extrato dos intestinos médios foi pré-incubado por 5 min a 37 °C na presença de 1 µg de cada inibidor. Após este procedimento foi adicionado o substrato incubando a reação por 30 min a 37 °C em 500 µl de volume final. A reação foi parada adicionando-se ácido acético 30% e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 405 nm. A concentração do extrato dos intestinos médios utilizada no experimento foi aquela que apresentou uma leitura de 0,5 de absorbância, quando realizado o ensaio enzimático na ausência de inibidores.

3.14 Ensaio de inibição da atividade proteolítica das enzimas digestivas de larvas de *Callosobruchus maculatus*.

O intestino médio de larvas de terceiro estágio de *C. maculatus* foi dissecado em solução salina NaCl 250 mM, homogeneizado em tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0 contendo EDTA 2,5 mM e β-mercaptoetanol 25 mM e centrifugados a 10.000 x g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante resultante foi usado como solução rica em proteinases para ensaio enzimático usando BANA como substrato, seguindo procedimento descrito por Abe *et al.* (1994). O homogenato intestinal obtido como descrito acima, foi pré incubado com 20 e 40 µg de PfKTI-2 e PfKTI-7 por 5 min a 37°C em volume final de 315 µl (tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0 contendo EDTA 2,5 mM e β-mercaptoetanol 25 mM). PfKTI-2 foi usado neste ensaio, nas mesmas condições que PfKTI-4 e PfKTI-7, como parâmetro comparativo de um inibidor que não apresenta atividade inibitória sobre proteases cisteínicas. A reação foi então iniciada pela adição de 35 µl de BANA (5 mM) em 10% de DMSO. Após incubação a 37 °C por 30 min a reação foi parada pela adição de 500 µl de HCl 2% em etanol e a

coloração foi obtida pela adição de 500µl de p-dimetilaminacinnamaldeído 0,06% em etanol. A leitura de absorbância foi feita utilizando um espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm. A atividade inibitória foi detectada a partir do declínio da hidrólise do BANA pelo homogenato intestinal quando em presença dos inibidores. A concentração do extrato dos intestinos médios utilizada nos experimentos foi determinada através de ensaio de atividade de protease cisteínica sendo usada a concentração de extrato de intestino que resultava em uma leitura de aproximadamente 0,2 de absorbância.

3.15 Ensaio de inibição da atividade proteolítica das enzimas digestivas de larvas de *Diatraea saccharalis*.

As larvas foram imobilizadas em gelo e o intestino médio foi removido na presença de NaCl 250 mM a 4 °C. Dez intestinos médios foram homogeneizados em 500 µL de NaCl 150 mM e centrifugados a 10.000 x g por 30 min a 4 °C. Logo após a centrifugação, foi coletado o sobrenadante e descartando o material precipitado. A amostra obtida foi quantificada de acordo com o item 3.5. Em seguida foi realizado ensaio da atividade enzimática como descrito por Garcia *et al.* (2004), com modificações. O efeito da atividade proteolítica do extrato dos intestinos médios da larva foi medido usando BApNA (1 mM) como substrato. Neste ensaio utilizamos Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 como tampão de reação. O extrato dos intestinos médios foi pré-incubado por 5 min a 37 °C na presença de diferentes concentrações dos inibidores obtidos como descrito no item 3.7. Após este procedimento foi adicionado o substrato incubando a reação por 30 min a 37 °C. A reação foi parada adicionando-se ácido acético 30% e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 405 nm. A concentração do extrato dos intestinos médios utilizada no experimento foi aquela que apresentou uma leitura de 0.5 de absorbância, quando realizado o ensaio enzimático na ausência de inibidores.

3.16 Efeito dos inibidores no desenvolvimento e sobrevivência de larvas de *D. saccharalis*.

O bioensaio realizado com *D. saccharalis* foi realizado de acordo com metodologia descrita por Pompermayer *et al.* (2001). Os experimentos foram desenvolvidos em sala climatizada ajustada a 25 ± 1 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa de $70\pm 10\%$. Folhas de papel sulfite contendo ovos de *D. saccharalis* foram acondicionadas em recipiente plástico, contendo algodão úmido para evitar o ressecamento dos ovos até a eclosão das lagartas. Dez lagartas recém nascidas foram transferidas com o auxílio de um pincel de cerdas macias para tubos de ensaio de fundo chato (8,5 x 2,5 cm) (10 larvas/tubo). As larvas foram alimentadas com dieta artificial (fornecida pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campos dos Goytacazes, Brasil) na presença de uma fração enriquecida com inibidores (0,1 e 0,5%) por 15 dias após o nascimento. Como controle para este experimento, alimentamos larvas somente com a dieta artificial e acrescida de inibidor (0,5%) previamente aquecido a 100 °C por 60 minutos. Neste ensaio foram analisados a sobrevivência (através da contagem do número larvas após término do experimento) e o desenvolvimento larval (através da pesagem de cada larva que sobreviveu ao experimento). Foram realizadas três repetições por tratamento, sendo cada tubo de ensaio considerado uma repetição.

3.17 Análise estatística.

As análises de variância (ANOVA) (Sokal e Rohlf, 2011) foram usados para examinar se houve diferenças significativas entre as médias dos tratamentos, e todas as comparações pareadas foram realizadas pelo teste de Tukey. Os dados de três experimentos independentes foram utilizados para cada análise estatística. Essas análises foram feitas em colaboração com o professor Dr Leandro Rabello Monteiro (CBB-UENF).

Resultados

4.1 Indução e purificação de inibidores de proteinase em folhas de maracujá

Antes de iniciarmos o processo de purificação dos inibidores de proteinase (IPs), realizamos um estudo para estipular o melhor tempo de exposição a MeJa (48 ou 96 horas) que resultaria em uma maior indução desses IPs nas plantas de maracujá. Após a exposição, as plantas foram analisadas através de ensaios de inibição de tripsina *in gel* sobre condições semi-desnaturantes (item 3.6). Neste gel observamos um aumento substancial na atividade inibitória contra tripsina na região entre 20 a 30 kDa para ambos os tempos de exposição aos vapores de MeJa (figura 3). No entanto, podemos notar uma maior indução da atividade inibitória contra tripsina em plantas tratadas com vapores de MeJa por 96 horas quando comparadas as plantas tratadas por 48 horas. Sendo assim, para maior rendimento no processo de purificação, optamos por utilizar plantas induzidas por MeJa por um período de 96 horas.

A partir disso, as proteínas foliares foram extraídas e precipitadas pela adição de sulfato de amônio resultando na fração F30-55, sendo esta submetida à cromatografia de filtração em gel (Sephadex G-100). As frações que obtiveram atividade inibitória contra tripsina foram reunidas, passando por processo de diálise e liofilização (resultado não mostrado). Para darmos continuidade ao processo de purificação, submetemos à amostra à técnica de cromatografia de fase reversa em alta pressão (RP-HPLC) conforme descrito no item 3.7. A figura 4 mostra a eluição das proteínas durante o processo, onde os picos obtidos foram coletados e analisados quanto o seu conteúdo protéico através de SDS – PAGE 12,5% (figura 5). Dos 6 picos coletados, todos apresentaram proteínas detectáveis em nossas análises. Como podemos observar, as proteínas de cada pico se apresentaram praticamente homogêneas, com exceção do pico 5.

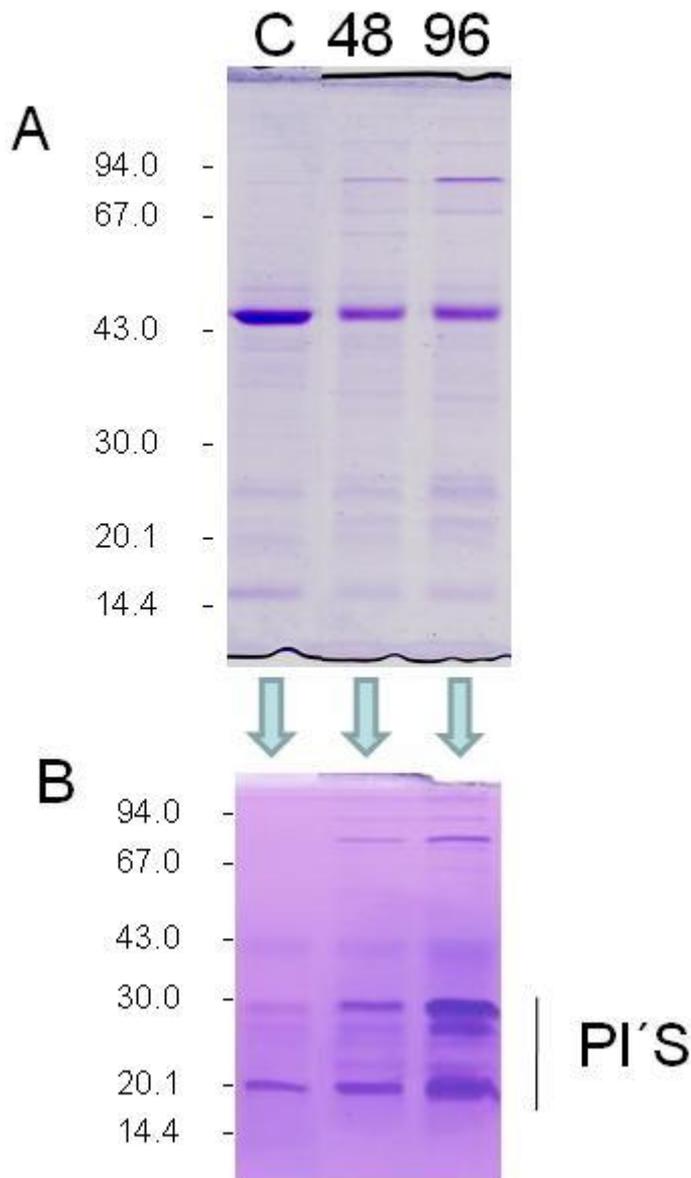


Figura 3: (A) Visualização eletroforética do extrato protéico foliar de plantas induzidas por metil jasmonato em gel de poliacrilamida 10% semi desnaturante (B) Visualização eletroforética do extrato protéico do tecido foliar de plantas induzidas por metil jasmonato em gel de poliacrilamida 10% contendo gelatina , as bandas variando entre 20 e 30 kDa com atividade inibitória contra tripsina estão indicadas como PI's. C: Extrato protéico de plantas controle; 48: Extrato protéico de plantas expostas a MeJa por 48 h; 96: Extrato protéico de plantas expostas a MeJa por 96 h. Cada raia foi carregada com 7 μ g de proteína do extrato bruto. Ambos os géis foram corados com Coomassie brilliant blue.

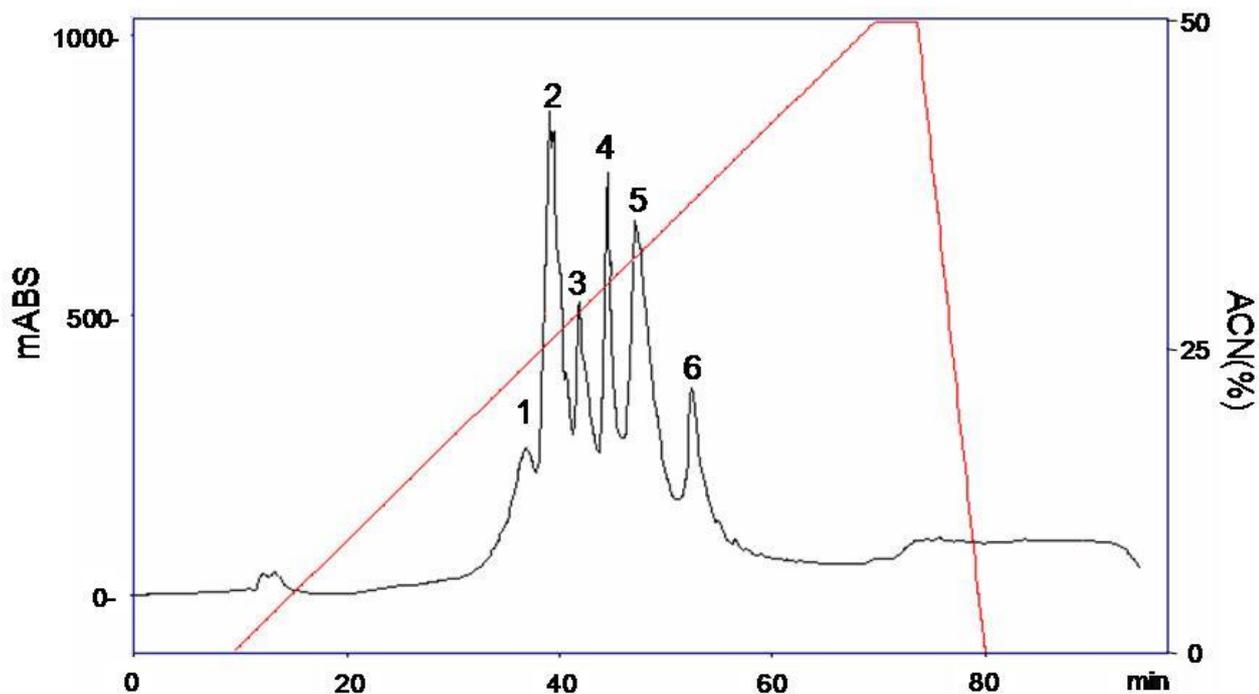


Figura 4 : Cromatograma da fração F30-55 em coluna de fase reversa C18 em sistema de alta performance (HPLC). A eluição dos picos foi acompanhada por absorbância a 220 nm. A linha obliqua indica o gradiente de acetonitrila (0-50%) em 10 mM de Fosfato de potássio usado para a eluição dos picos.

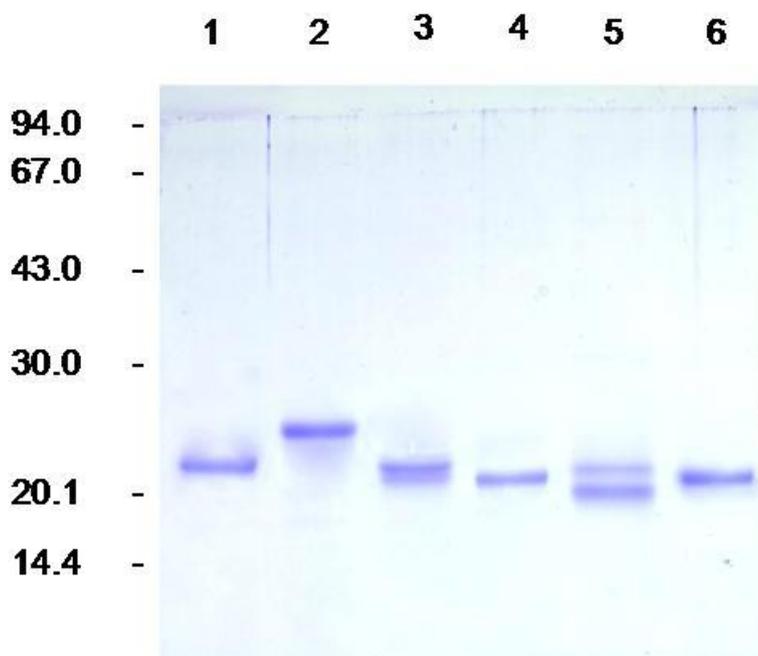


Figura 5: Visualização eletroforética dos picos (1 a 6) presentes na figura 3 em gel de poliácridamida desnaturante 12,5%. Em cada raia foi aplicado 1 μ g de amostra. Gel corado com Coomassie.

Para confirmarmos a homogeneidade das amostras, os picos 1, 2, 3, 4 e 6 foram submetidas a uma segunda etapa cromatográfica, feito conforme descrito no item 3.7. A eluição de cada pico coletado e a confirmação de uma única banda protéica através de análise por SDS-PAGE é demonstrado nas figuras 6, 7, 8, 9 e 12. O pico 5 também foi submetido ao mesmo processo das demais frações. Contudo, por não apresentar uma única banda protéica nas análises eletroforéticas, optamos por coletar este pico de forma diferenciada. Após isso, as novas frações do pico 5 foram submetidas a uma terceira etapa cromatográfica, onde foram completamente separadas (figuras 10 e 11).

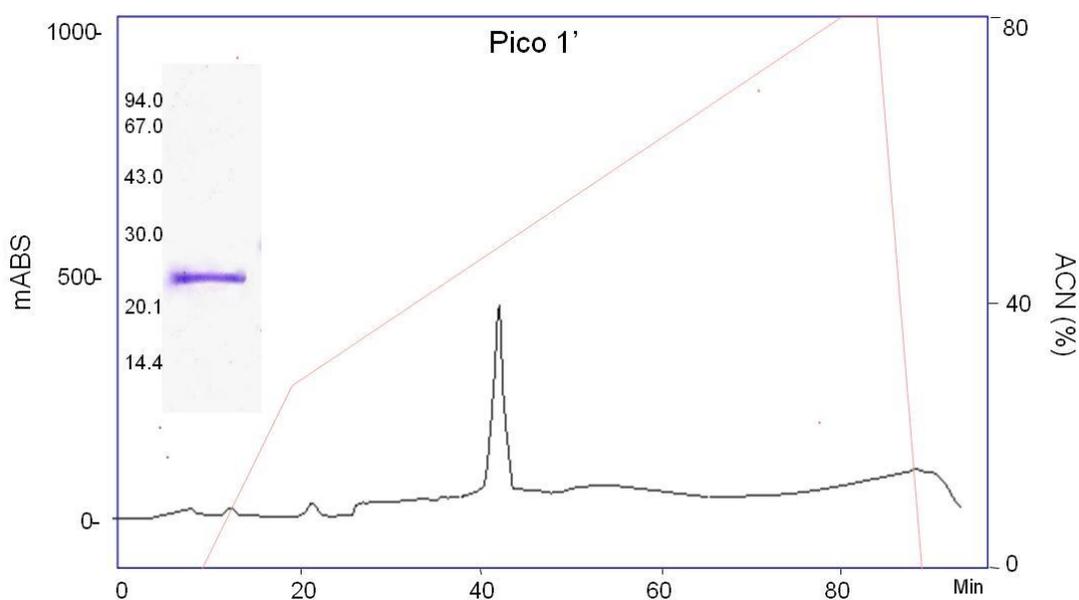


Figura 6: Cromatograma do pico 1 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4) recromatografado na mesma coluna C18 em sistema de HPLC. A linha obliqua indica o gradiente de acetonitrila. Inserção: Visualização eletroforética do pico 1' em gel de poliacrilamida desnaturante 12,5%; Gel corado com Coomassie.

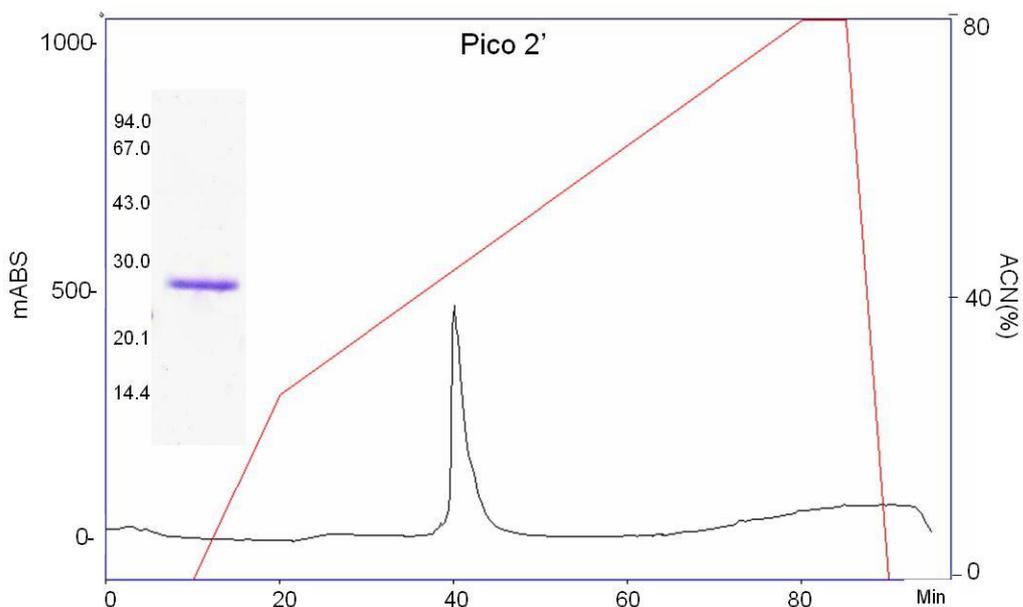


Figura 7: Cromatograma do pico 2 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4) recromatografado na mesma coluna C18 em sistema de HPLC. A linha oblíqua indica o gradiente de acetonitrila. Inserção: Visualização eletroforética do pico 2' em gel de poliacrilamida desnaturante 12,5%; Gel corado com Coomassie.

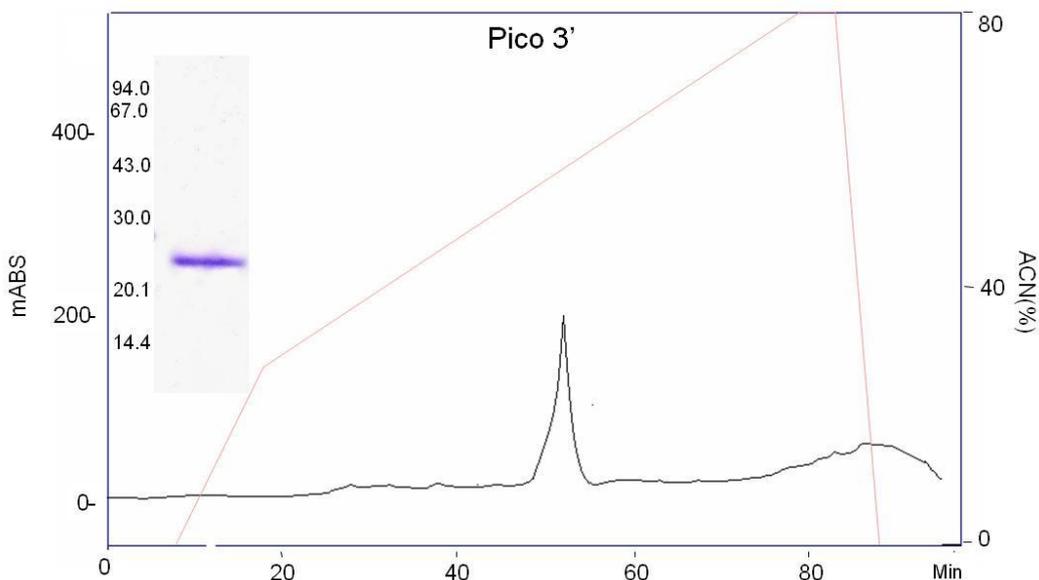


Figura 8: Cromatograma do pico 3 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4) recromatografado na mesma coluna C18 em sistema de HPLC. A linha oblíqua indica o gradiente de acetonitrila. Inserção: Visualização eletroforética do pico 3' em gel de poliacrilamida desnaturante 12,5%; Gel corado com Coomassie.

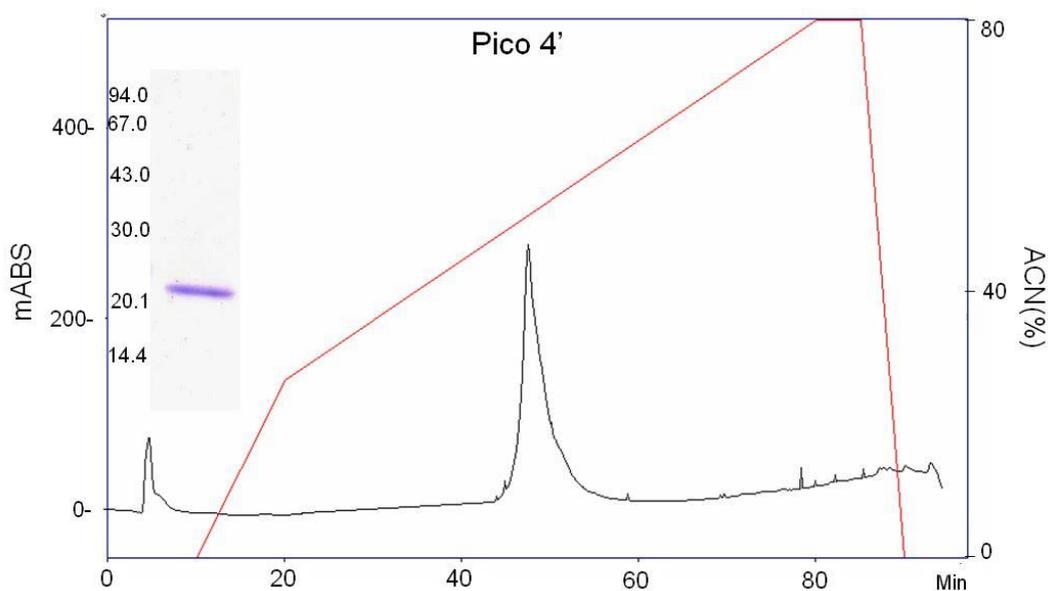


Figura 9: Cromatograma do pico 4 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4) recromatografado na mesma coluna C18 em sistema de HPLC. A linha obliqua indica o gradiente de acetonitrila. Inserção: Visualização eletroforética do pico 4' em gel de poliacrilamida desnaturante 12,5%; Gel corado com Coomassie.

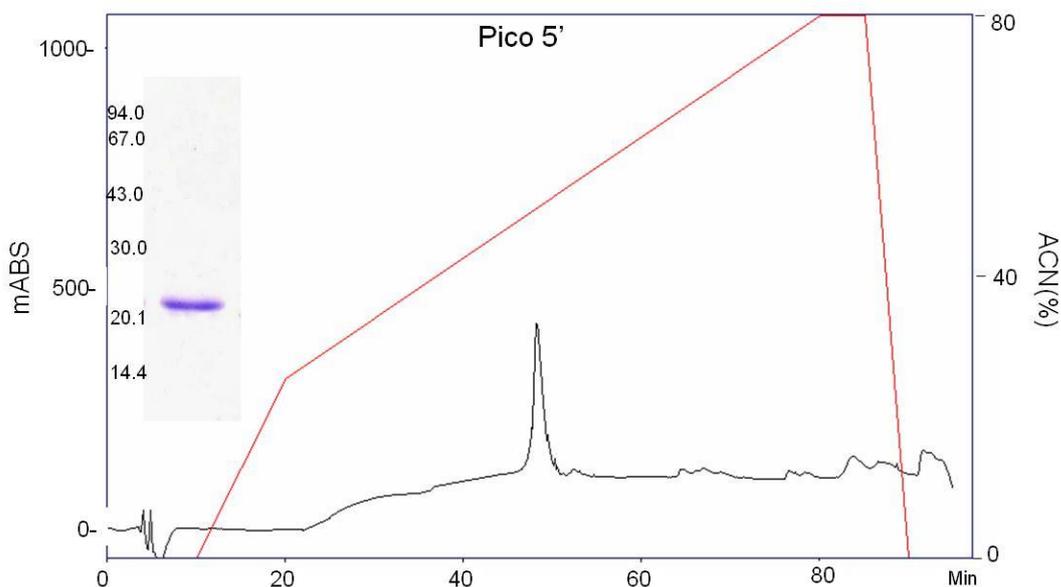


Figura 10: Cromatograma da parte inicial (subida) do pico 5 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4) recromatografado na mesma coluna C18 em sistema de HPLC. A linha obliqua indica o gradiente de acetonitrila. Inserção: Visualização eletroforética do pico 5' em gel de poliacrilamida desnaturante 12,5%; Gel corado com Coomassie.

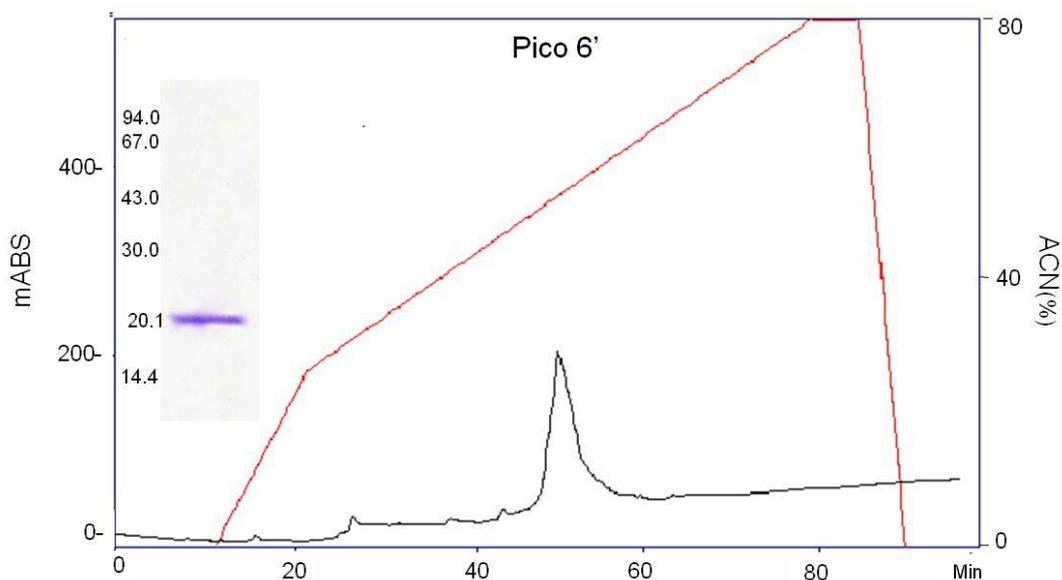


Figura 11: Cromatograma da parte final (descida) do pico 5 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4) recromatografado na mesma coluna C18 em sistema de HPLC. A linha oblíqua indica o gradiente de acetonitrila. Inserção: Visualização eletroforética do pico 6' em gel de poliacrilamida desnaturante 12,5%; Gel corado com Coomassie.

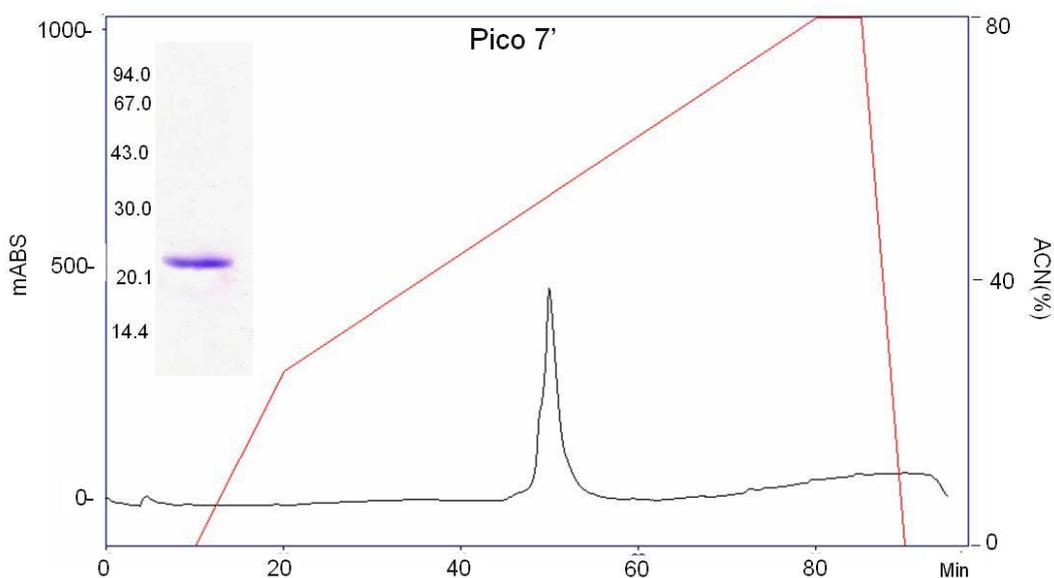


Figura 12: Cromatograma do pico 6 da primeira cromatografia de fase reversa (figura 4) recromatografado na mesma coluna C18 em sistema de HPLC. A linha oblíqua indica o gradiente de acetonitrila. Inserção: Visualização eletroforética do pico 7' em gel de poliacrilamida desnaturante 12,5%; Gel corado com Coomassie.

Todas as 7 proteínas purificadas apresentaram atividade inibitória contra tripsina através de ensaio *in vitro* (Resultado não mostrado).

4.2 Sequência de aminoácidos da região N-terminal e identificação de isoformas dos PfKTIs.

O sequenciamento parcial de aminoácidos da região N-terminal de cada inibidor purificado foi realizado conforme descrito no item 3.8. A tabela 1 demonstra a sequências dos inibidores que apresentaram em suas sequências apenas um único resíduo de aminoácido em cada posição e a homologia com alguns inibidores da família Kunitz de outras espécies vegetais. A partir desta caracterização, junto com a observação da atividade biológica de inibição contra tripsina, estas proteínas foram denominadas PfKTIs (do inglês, Passiflora flavicarpa Kunitz Trypsin Inhibitors): PfKTI-1 (23 kDA), PfKTI-2 (25 kDA), PfKTI-3 (23 kDA), PfKTI-4 (22 kDA), PfKTI-5 (23 kDA), PfKTI-6 (20 kDA), PfKTI-7 (22 kDA). Contudo, uma análise mais cuidadosa revela que estas sequências (tabela 1) só apresentam identidade com a segunda parte (em negrito) de dois padrões de sequências da região N-terminal de inibidores do tipo Kunitz: 1) (L,I,V,M)-X-D-(X₂)-G-(X)₂-(L,I,V,M)-(X)₅-Y-X-(L,I,V,M) (Major *et al.*, 2008); 2) (L,I,V,M)-X-D-X-(E,D,N,T,Y)-(D,G)-(R,K,H,D,E,N,Q)-X-(L,I,V,M)-(X)₅-Y-X-(L,I,V,M) (Selvakumar *et al.*, 2011). Nestas sequências as letras entre parênteses indicam que nestas posições as sequências podem ter qualquer um dos aminoácidos indicados e o X indica que nesta posição pode ser encontrado qualquer aminoácido. Os números indicam a repetição do padrão.

Tabela 1: Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos da região N-terminal dos inibidores de proteinase de folhas de maracujá com alguns inibidores de proteinase membros da família Kunitz.

	Posição inicial	Sequencia/homologia	Numero de acesso	Referências
PfKTI-1	1	SELRTGVPPYYM	—	Deste trabalho
PfKTI-2	1	ELRTYVPPYYL	—	Deste trabalho
PfKTI-5	1	ELRTGVPPYYL	—	Deste trabalho
PfKTI-6	1	ELRTGVPPYYL	—	Deste trabalho
PfKTI-7	1	ELRTETPPYYM	—	Deste trabalho
<i>Theobroma bicolor</i>	8	ELRTGVEYYV	AAL85661.1	Não publicado
<i>Herrania mariae</i>	8	ELRTGVQYYI	AAL85637.1	Não publicado
<i>Glycine soja</i>	10	PLENGGTYII	—	Wang <i>et al.</i> , 2012
<i>Inga laurina</i>	10	MLRNGGKYYL	AFG2855.1	Macedo <i>et al.</i> , 2007
<i>Derris trifoliata</i>	10	QVRNGGTYII	—	Bhattacharyya e Badu, 2009
<i>Adenanthera pavonina</i>	9	FLRNGGSYYI	—	Migliolo <i>et al.</i> , 2010
<i>Prosopis juliflora</i>	10	ILRNGGSYYI	—	Franco <i>et al.</i> , 2002
		:.. **:		

Os alinhamentos foram realizados utilizando o programa CLUSTALW2. Os asteriscos representam aminoácidos idênticos, enquanto um e dois pontos indicam os aminoácidos com semelhanças fracas e fortes, respectivamente.

Os inibidores PfKTI-3 e PfKTI-4 apresentaram em alguns pontos de sua sequência a presença de mais de um resíduo de aminoácido (tabela 2). Apesar disso, esses inibidores também apresentaram regiões conservadas de aminoácidos, quando comparadas com padrões de sequência de inibidores do tipo Kunitz descritos acima. Interessantemente, alguns resíduos de aminoácidos presentes no inibidor PfKTI-4 (T e P) não apresentaram consenso com os padrões de sequência do tipo Kunitz. A identificação de aminoácidos secundários, cuja eluição se deu em conjunto com o aminoácido principal (picos minoritários detectados no mesmo ciclo de eluição do pico do aminoácido principal), em determinados pontos das sequências, podem indicar a presença de co-migração de isoformas.

Tabela 2: Sequência N-terminal dos aminoácidos presentes nos picos que não apresentaram homogeneidade. Abaixo da sequência principal são mostrados os aminoácidos.

	Posição inicial	Seqüência/homologia
<i>PfKTI-3</i>	2	ELPIIVPYYM V TF
<i>PfKTI-4</i>	1	YLLTTLPYYL ETVI V VP E P G Y

Com a finalidade de identificar a ocorrência de isoformas nos *PfKTI*'s optamos por realizar uma eletroforese em gel de gelatina em condições nativas (PAGE 10%). Através desta técnica, além de podermos discriminar isoformas, conseguimos revelar sua atividade biológica através da inibição de tripsina *in gel*. Em nossas análises, todos os inibidores purificados apresentaram em média de duas a sete isoformas conforme demonstrado na figura 13. Este resultado corrobora com o resultado da detecção de aminoácidos secundários (tabela 2) pela técnica de degradação de Edman.

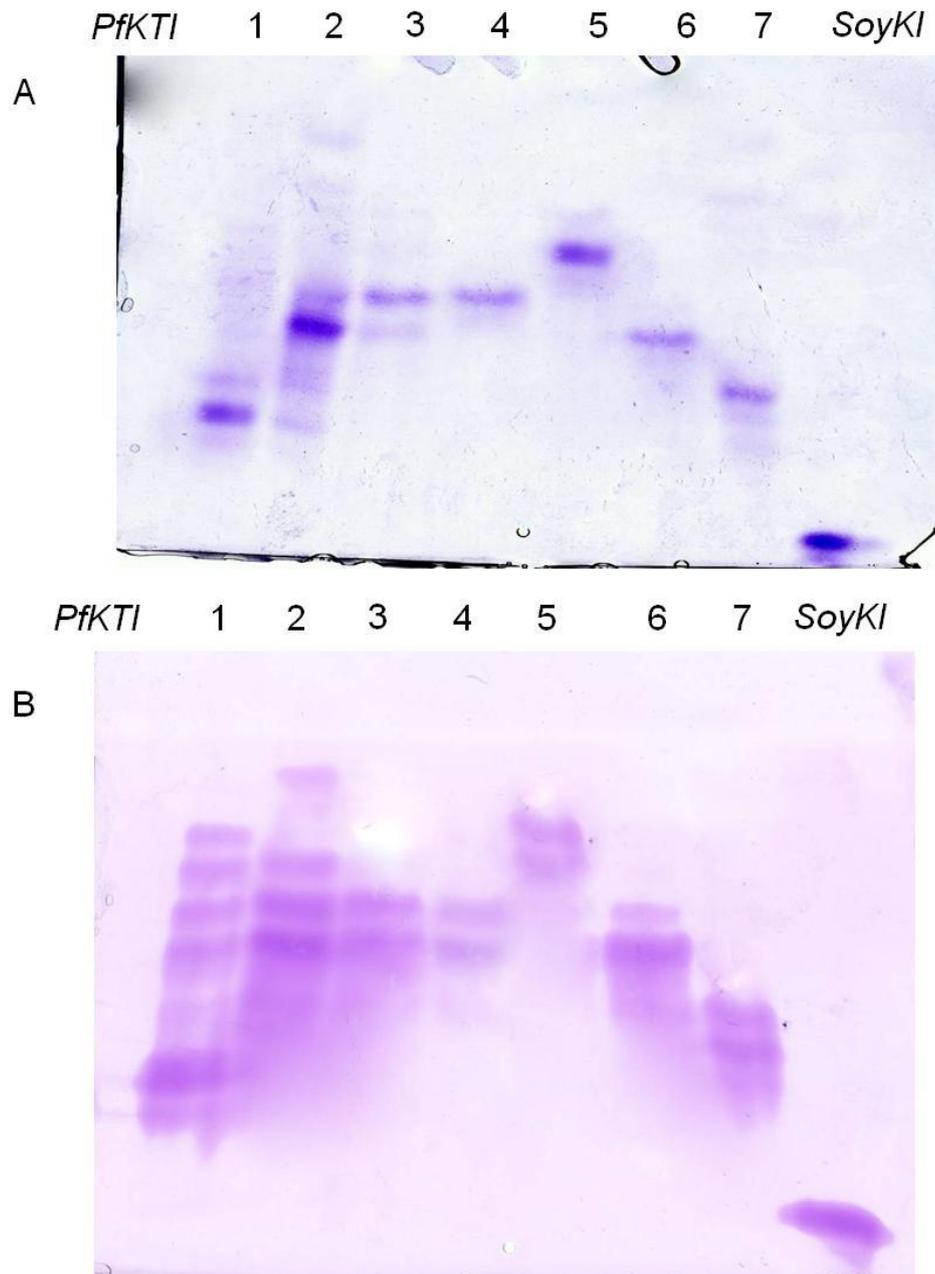


Figura 13: (A) Visualização eletroforética dos sete inibidores obtidos da segunda cromatografia de fase reversa em coluna C18 em gel de poliacrilamida em condições nativas (PAGE 10%). Note a presença de outras bandas protéicas nas mesmas raias onde os inibidores, em gel desnaturante, apresentavam apenas uma banda. (B) Visualização eletroforética dos sete inibidores obtidos da segunda cromatografia de fase reversa em coluna C18 em gel de poliacrilamida 10% contendo gelatina e em condições nativas. Para ambos os géis foram aplicados 3 μ g de amostra em cada raia. Os números de 1 a 7 indicam onde foi aplicado os respectivos inibidores purificados (PfKTI 1-7). Como controle positivo utilizamos o inibidor de proteinase comercial SoyKI.

4.3 Estudo da atividade dos PfKTIs contra diferentes enzimas comerciais.

Para iniciarmos a caracterização bioquímica dos PfKTI's, realizamos titulação de cada inibidor contra proteases serínicas (tripsina e quimiotripsina). Também, com a finalidade de caracterizarmos inibidores com potencial bifuncional, avaliamos estas proteínas contra uma protease cisteínica (papaína). Para efeito de comparação, um inibidor comercial do tipo Kunitz foi utilizado nos ensaios contra tripsina e quimiotripsina (soyKTI), enquanto que contra papaína, foi utilizada uma cistatina comercial (eggCys).

Os setes inibidores purificados apresentaram forte atividade contra tripsina, apresentando de forma geral atividade próxima a observada por soyKTI (figura 14). Contudo, os inibidores purificados apresentaram considerável variação entre suas atividades inibitórias. A concentração dos inibidores que foi capaz de anular a atividade da tripsina variou entre 0,06 a 0,65 μM .

De forma similar aos ensaios com tripsina, os inibidores purificados também apresentaram alta atividade contra quimiotripsina, com exceção de PfKTI-1 que demonstrou incapacidade de inibição nas condições de nossos ensaios (figura 15). Em nossas análises, o inibidor comercial soyKTI apresentou forte atividade inibitória contra quimiotripsina. No entanto, 3 inibidores (PfKTI-2, PfKTI-5 e PfKTI-6) apresentaram potencial inibitório maior que soyKTI. Dentre todos os inibidores, PfKTI-6 foi o que teve melhor potencial contra esta enzima, onde a atividade se apresentou praticamente nula a uma concentração de aproximadamente 0,08 μM deste inibidor.

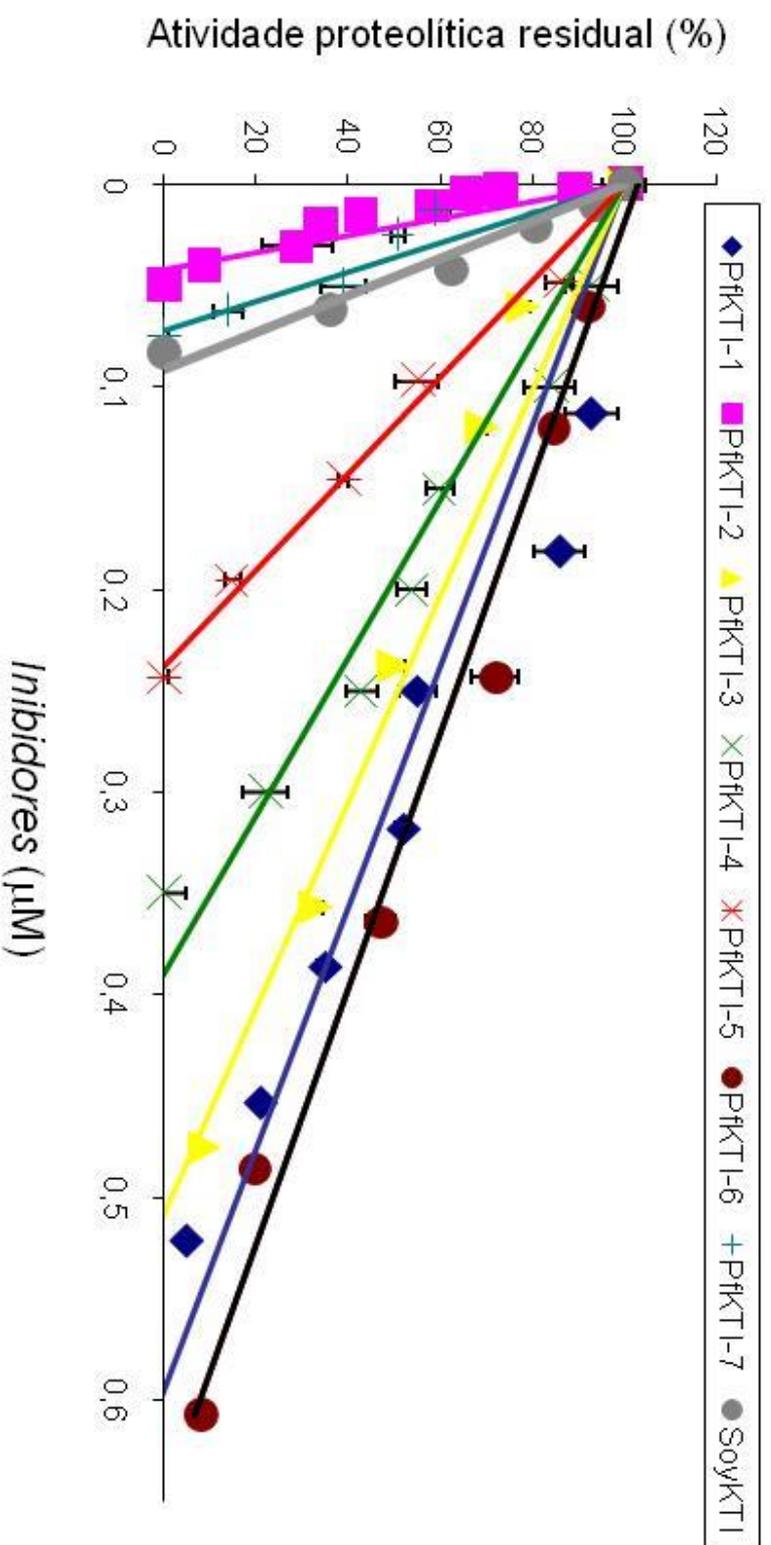


Figura 14: Visualização gráfica da atividade inibitória dos PfkTIs contra tripsina *in vitro*. Diferentes concentrações (μM) dos inibidores foram adicionados a quantidade constante de tripsina (0,5 μg). Cada ponto representa a média de três ensaios ($n=3$).

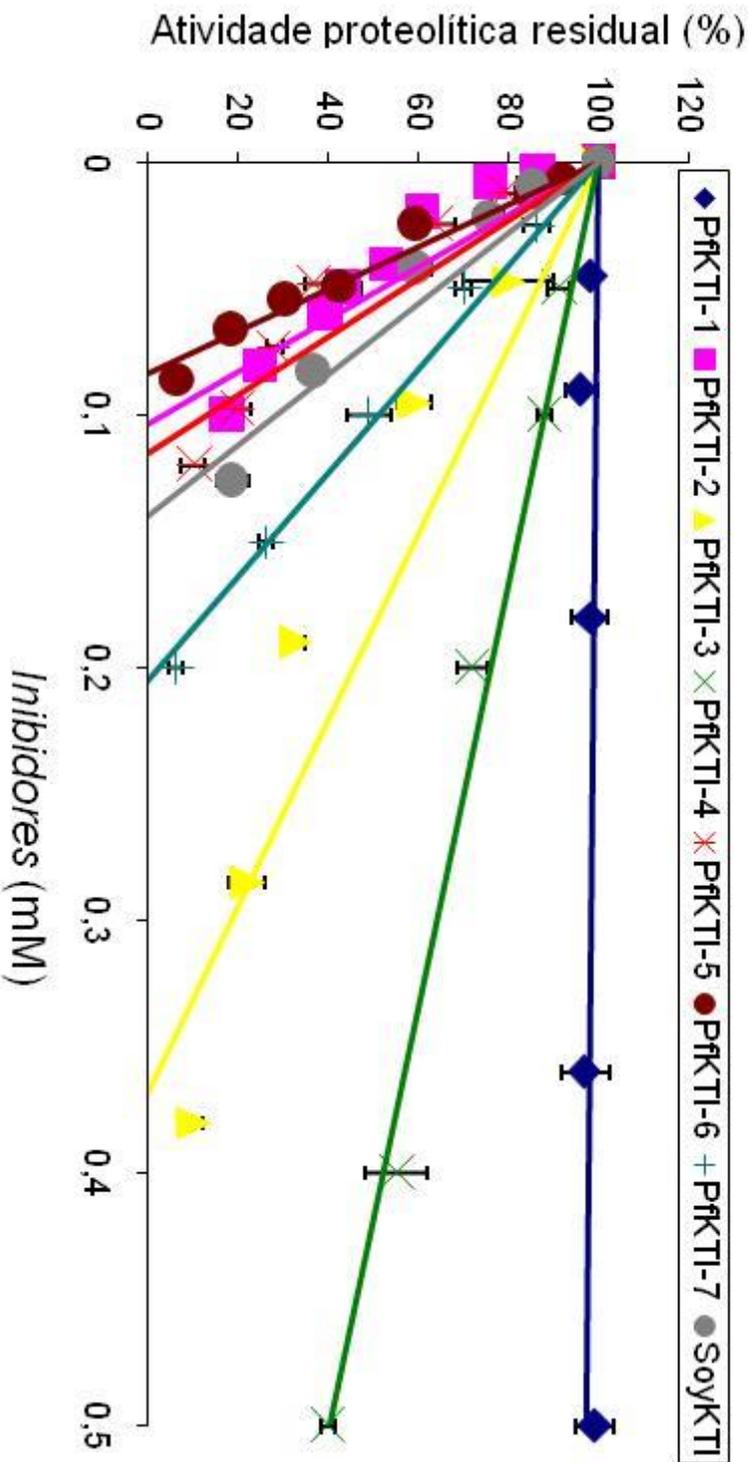


Figura 15: Visualização gráfica da atividade inibitória dos PfkTIs contra quimiotripsina *in vitro*. Diferentes concentrações (μM) dos inibidores foram adicionados a quantidade constante de quimiotripsina ($1 \mu\text{g}$). Cada ponto representa a média de três ensaios ($n=3$).

Estudos da atividade dos PfKTIIs contra papaína (figura 16) demonstraram que dois destes inibidores (PfKTI-4 e PfKTI-7) obtiveram atividade sobre esta enzima. Os inibidores PfKTI-4 e PfKTI-7 apresentaram uma inibição da atividade de papaína de cerca de 40 e 20%, respectivamente, quando em nossas condições de análise estavam presentes em uma concentração de 2,8 μM . Comparativamente, estes inibidores apresentaram um atividade significativamente baixa em relação a atividade do inibidor de cisteína comercial (eggCys). Contudo, é relevante a observação da existência de atividade inibitória contra proteases cisteínicas por esses inibidores, já que de forma geral, membros da família Kunitz não são inibidores naturais deste tipo de protease. Os outros inibidores avaliados não apresentaram qualquer atividade contra papaína até a concentração máxima utilizada no experimento.

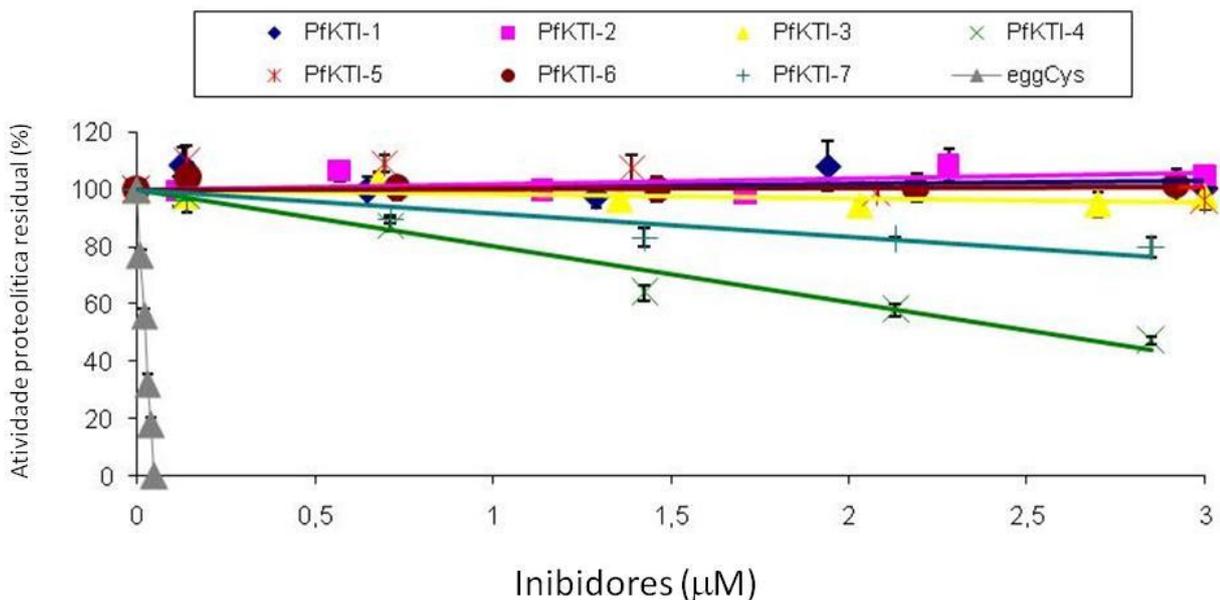


Figura 16: Visualização gráfica da atividade inibitória *in vitro* dos PfKTIIs sobre papaína. Inibidor de cisteínica comercial (eggCys) foi utilizado como controle positivo. Cada ponto representa a média de três ensaios ($n=3$).

Para uma melhor comparação da diversidade na capacidade inibitória dos PfKTIs, calculamos a capacidade de inibir 50% da atividade proteolítica (IC_{50}) de cada inibidor a partir dos dados obtidos nos ensaios de titulação contra tripsina, quimiotripsina e papaína (descritos no ítem 3.9, 3.10 e 3.11 respectivamente). A tabela 3 demonstra a diferença na eficiência da inibição de cada inibidor. Segundo esses resultados, PfKTI-2 e PfKTI-7 foram mais efetivos contra tripsina, enquanto PfKTI-2, PfKTI-5 e PfKTI-6 foram os mais potentes contra quimiotripsina. Por outro lado, PfKTI-1 foi específico para atividade contra tripsina. Apesar da atividade inibitória contra papaína pela cistatina comercial (eggCys) ser de aproximadamente 100 vezes maior que a apresentada por PfKTI-4, é importante enfatizar que este inibidor não é específico para esta classe de protease. Sendo assim, também não podemos ignorar a atividade inibitória contra papaína presente em PfKTI-7.

Tabela 3: Concentração dos IPs com capacidade de inibir 50% da atividade proteolítica (IC_{50} ^a). Sem atividade (SA).

Inibidor	Tripsina	Quimiotripsina	Papaína
		μM	
<i>SoyKTI</i>	0.054	0,083	SA
<i>eggCys</i>	SA	SA	0,024
<i>PfKTI-1</i>	0.298	SA	SA
<i>PfKTI-2</i>	0.019	0.047	SA
<i>PfKTI-3</i>	0.254	0.184	SA
<i>PfKTI-4</i>	0.207	0.416	2.53
<i>PfKTI-5</i>	0.118	0.051	SA
<i>PfKTI-6</i>	0.336	0.041	SA
<i>PfKTI-7</i>	0.036	0.102	6.06

^aICs foram calculados da porção linear da atividade residual das proteinases contra as diferentes concentrações dos inibidores.

4.4 Estudo da termoestabilidade dos PfKTIs na atividade contra tripsina.

A termoestabilidade dos 7 inibidores purificados também foi avaliada. A figura 17 demonstra que a atividade inibitória sobre tripsina é reduzida drasticamente quando os inibidores foram submetidos a 100 °C por um período de 30 min, sendo que PfKTI-1, PfKTI-3 e PfKTI-7 perderam completamente a atividade quando incubados nesta temperatura. Contudo, os inibidores PfKTI-1, PfKTI-2, PfKTI-4, PfKTI-6 e PfKTI-7 ainda mantiveram considerável atividade inibitória (aproximadamente de 50 a 70%) quando incubados a 80 °C pelo mesmo período.

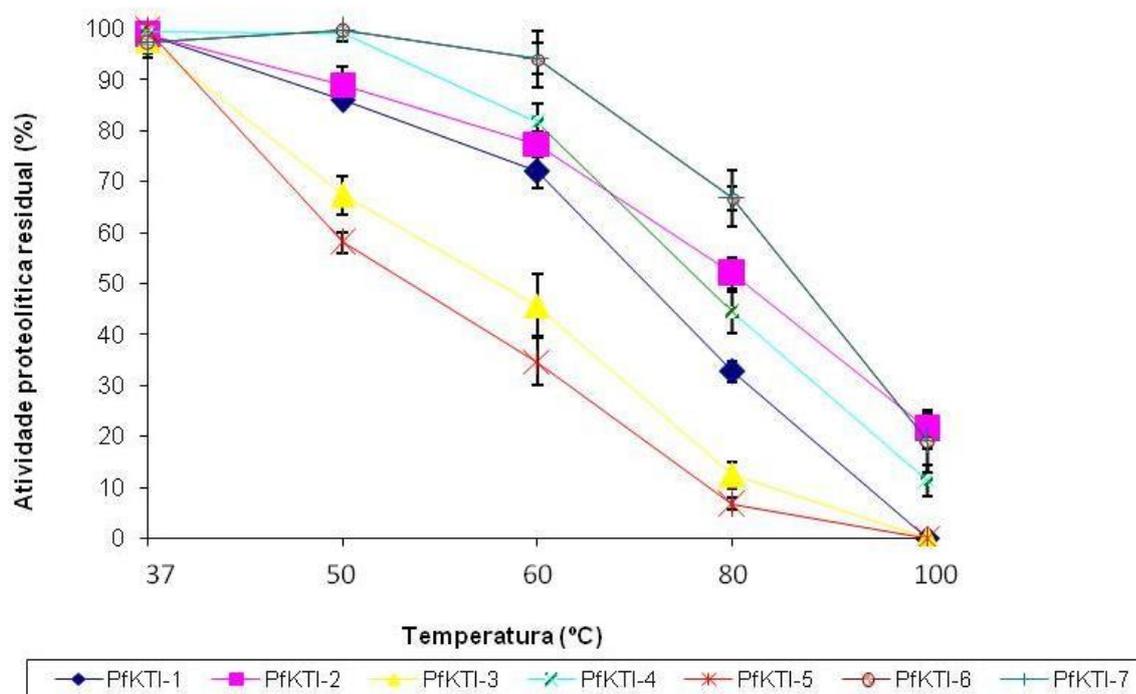


Figura 17: Visualização gráfica da estabilidade térmica dos IPs incubados em diferentes temperaturas (37°C a 100 °C) por 30 min, determinada pela atividade inibitória contra tripsina. Os pontos indicam as médias da atividade dos inibidores (n=3).

4.5 Análise do potencial biopestida dos PfKTIs.

Para o estudo do potencial biopesticida dos PfKTIs utilizamos inicialmente como inseto modelo o lepidóptero da broca da cana de açúcar (*Diatraea saccharalis*). Esse inseto apresenta majoritariamente proteases serínicas em seu sistema digestivo (Parde *et al.*, 2010). Com interesse de testarmos a atividade inibitória dos PfKTIs contra enzimas digestivas de larvas desta praga, foi realizado ensaio enzimático *in vitro* conforme o item 3.15. O resultado expresso na figura 18 demonstra que todos os inibidores apresentaram alta atividade contra enzimas digestivas dessas larvas, abolindo a atividade destas em diferentes concentrações.

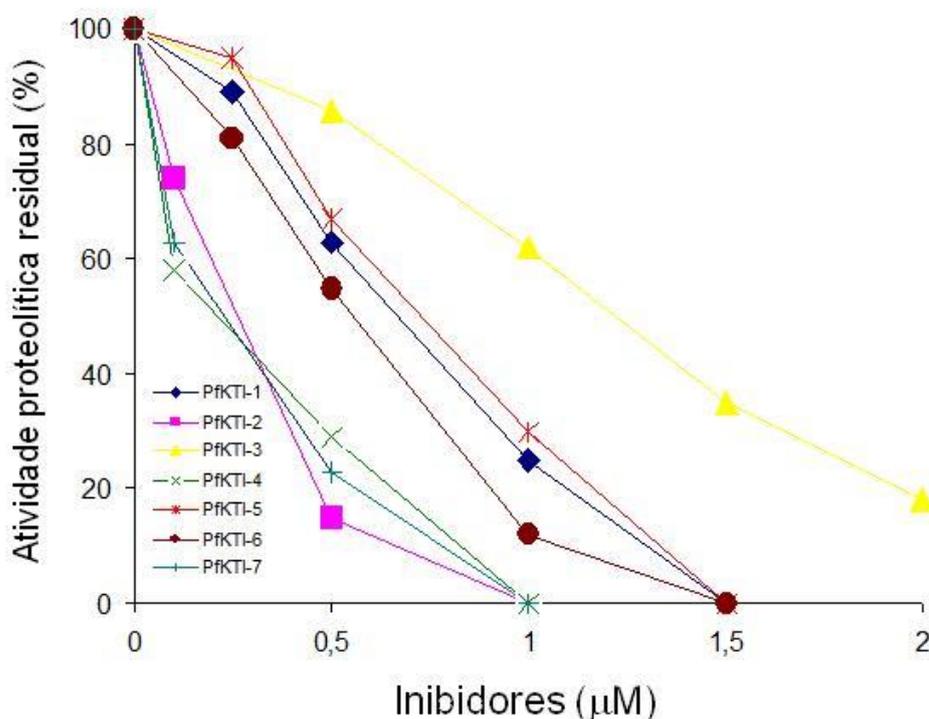


Figura 18: Visualização gráfica da inibição *in vitro* de enzimas digestivas de extrato do intestino médio de larvas do inseto *Diatraea saccharalis* (broca da cana) com os PfKTIs. BApNA foi utilizado como substrato. Desvio padrão (n=3).

Adicionalmente testamos as atividades inibitórias dos PfKTIIs sobre enzimas proteolíticas do intestino médio de larvas e adultos de *Aedes aegypti* *in vitro*. Algumas enzimas digestivas já foram identificadas e caracterizadas nesta espécie de inseto, incluindo tripsina (Barillas-Mury e Wells, 1993) e quimiotripsina (Jiang e Kanost, 1997). Na figura 19 observamos que a atividade proteolítica das enzimas do intestino médio de larvas e adultos diminuiu significativamente na presença 1 μ g dos inibidores. Os inibidores PfKTI-2, PfKTI-3, PfKTI-6 e PfKTI-7 praticamente aboliram a atividade enzimática do extrato intestinal tanto de larvas quanto de adultos em nossas condições de ensaio. PfKTI-4 e PfKTI-5 apresentaram menor capacidade inibitória em relação aos outros inibidores para ambos extratos protéicos (larvas e adultos). PfKTI-1 apresentou melhor desempenho contra enzimas do intestino de larvas quando comparado com sua atividade contra enzimas presentes no mosquito adulto.

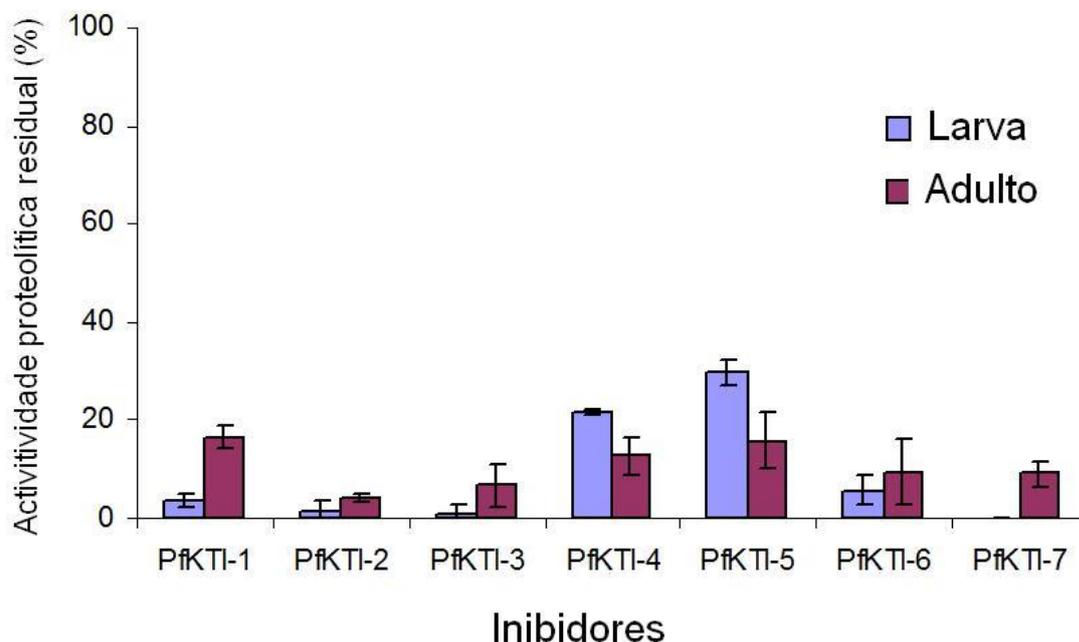


Figura 19: Análise da inibição da atividade do extrato do intestino médio de larvas e adultos de *Aedes aegypti* *in vitro* na presença de PfKTIIs (1 μ g). Desvio padrão (n=3).

Callosobruchus maculatus apresenta como maioria de suas enzimas digestivas proteases cisteínicas, sendo esta uma praga de grande importância econômica (Hines *et al.*, 1991). Com isso, tivemos o interesse de testarmos a atividade dos inibidores PfKTI-4 e PfKTI-7 contra enzimas digestivas das larvas desta praga, pois estes inibidores foram os únicos que apresentaram atividade contra papaína em nossas análises (figura 15). PfKTI-2 também foi utilizado neste ensaio como parâmetro comparativo. Em nossas análises iniciais realizamos experimento conforme descrito no item 3.14. Como observado na figura 20, na concentração de 20 µg dos inibidores, observamos uma pequena diminuição da atividade enzimática (10%) somente na presença de PfKTI-4. Quando se aumentou a concentração dos inibidores (40 µg), a atividade enzimática diminuiu 40% na presença de PfKTI-4 e 20% quando em contato com PfKTI-7. O inibidor PfKTI-2 não apresentou atividade inibitória contra o extrato intestinal em nenhuma das concentrações analisadas.

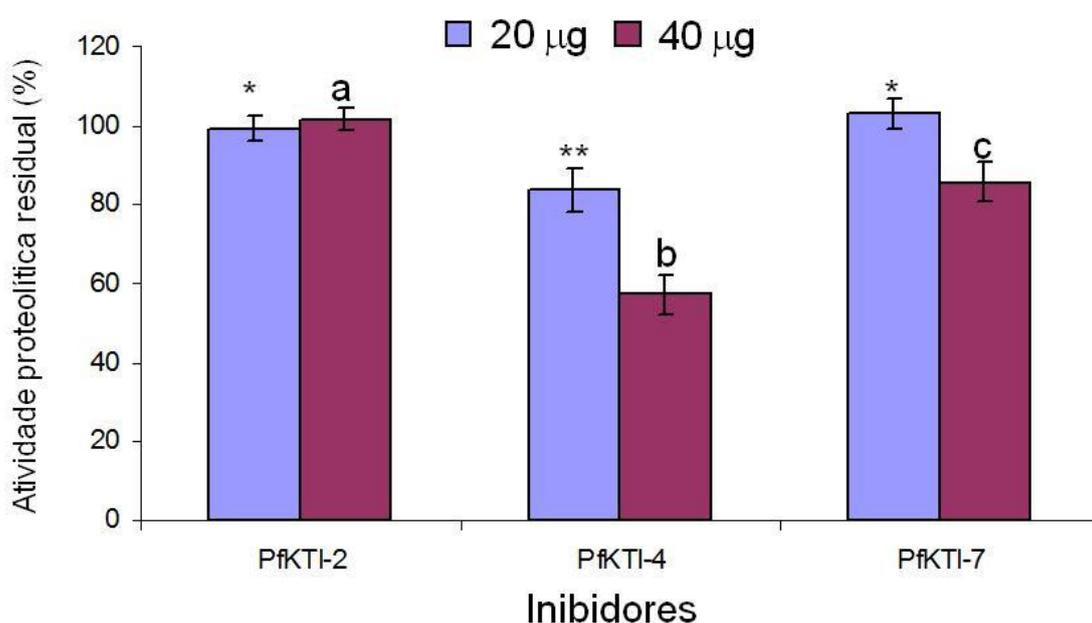


Figura 20: Análise da inibição da atividade do extrato do intestino médio de larvas de *Callosobruchus maculatus* *in vitro* por inibidores purificados. As letras e asteriscos acima das caixas indicam valores de significância de $P > 0,05$ para cada tratamento de acordo com teste Tukey (ANOVA).

Para investigarmos o efeito *in vivo* dos inibidores no desenvolvimento e sobrevivência de *D. saccharalis*, realizamos um bioensaio conforme descrito no item 3.16. Utilizamos para cada ensaio inibidores parcialmente purificados (fração enriquecida com inibidores), estudando assim o efeito destes inibidores em conjunto. A figura 21 demonstra que a presença da fração enriquecida com inibidores na dieta (0,1% e 0,5%) foi significativa na diminuição do desenvolvimento larval, assim como afetaram a sobrevivência da população estudada. As larvas alimentadas com dieta na presença da fração enriquecida fervida não apresentaram efeitos negativos sobre sua sobrevivência e desenvolvimento, quando comparadas as larvas controle.

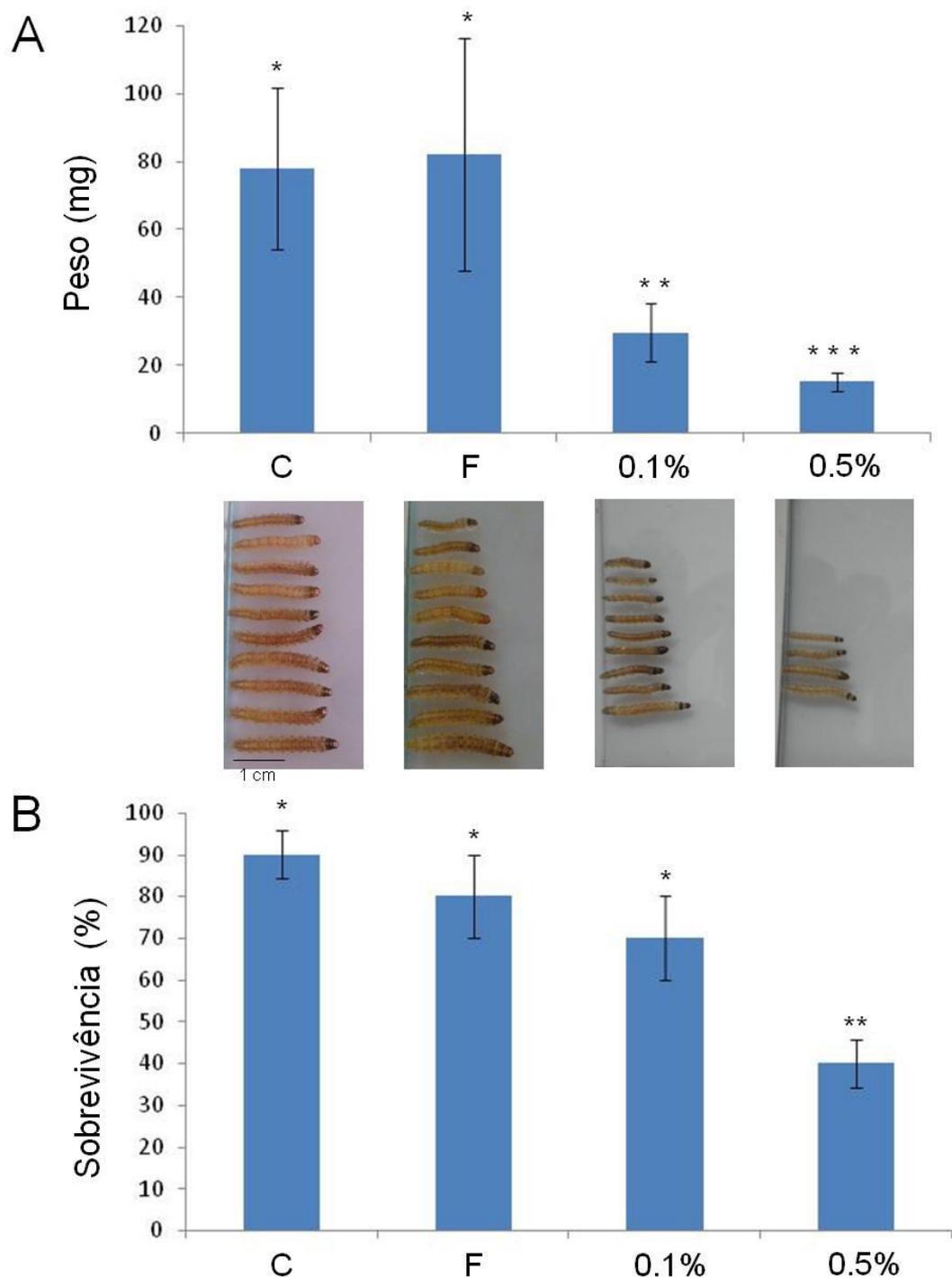


Figura 21: Visualização gráfica do efeito sobre o peso (A) e sobrevivência (B) de larvas de *Diatraea saccharalis* quando alimentadas com dieta acrescida da fração enriquecida com inibidor. **C:** dieta na ausência de inibidores; **F:** dieta com 0,5% de inibidores previamente fervidos; **0,1:** dieta com 0,1% de inibidores; **0,5:** dieta com 0,5% de inibidores. Os asteriscos acima das barras indicam valores de significância de $P > 0,05$ para cada tratamento de acordo com teste Tukey (ANOVA). Abaixo de cada tratamento da figura A é mostrado as larvas obtidas no final do experimento.

Discussão

Inúmeros mecanismos de defesa vegetal estão envolvidos nas respostas das plantas a estresses bióticos e abióticos. Dependendo do tipo de stress, as plantas podem ativar várias vias de sinalização para a produção de um conjunto ideal de moléculas protetoras (Rodriguez-Saona *et al.*, 2010).

Os jasmonatos têm sido considerados como moléculas de sinalização que estimulam a formação de produtos químicos induzidos (Rohwer e Erwin, 2008). A literatura tem demonstrado que a ativação de vias de sinalização dos jasmonatos pode elevar a produção de metabolitos secundários de plantas e proteínas relacionadas com a defesa e que estas podem impedir a capacidade de insetos de utilizar os nutrientes ingeridos (Farmer e Ryan, 1990; Rodriguez-Saona *et al.*, 2010; Thaler *et al.*, 2002). Numerosos estudos demonstraram que MeJa exógeno é uma ferramenta útil para aumentar a resistência da planta contra herbívoros, especialmente em espécies de plantas, como tomate, pimentão e tabaco (Délano-Frier *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2011).

As proteínas envolvidas nas respostas de defesa da planta induzidas podem incluir polifenol oxidases, peroxidases, PIs, entre outros (Tan *et al.*, 2011). Dentre as proteínas de defesa, os SPI têm sido alvo de estudo devido o seu papel antinutricional provocando o retardo no desenvolvimento de insetos herbívoros. Em geral, SPI são frequentemente expressos constitutivamente em baixos níveis no tecido foliar (Hare e Walling, 2006). Sua função defensiva já foi documentada em várias espécies de plantas (Zavala *et al.*, 2004; Quilis *et al.*, 2014; Chandrashekharaiyah, 2013; bode *et al.*, 2013) e sua produção pode ser aumentada através do ataque de inseto herbívoro ou exposição ao metil jasmonato (Thaler *et al.*, 2002).

Dentre os diferentes mecanismos de defesa vegetal induzidos em plantas de maracujá, pouco é conhecido sobre as proteínas de defesa e seus correspondentes genes. A partir disso, e com base nos dados bibliográficos acima descritos, iniciamos o estudo da indução de PIs em folhas de maracujá expostas à MeJa. Em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa descreveu um aumento de até oito vezes na indução de SPIs em folhas maracujá expostas a MeJa por 48 horas (Botelho-Júnior *et al.*, 2008.). Estrategicamente, verificamos se uma exposição a MeJa por período mais longo (96 horas) iria

aumentar o acúmulo destes inibidores facilitando a sua purificação. Análises através de eletroforese em gel de gelatina sob condições semi-desnaturante revelaram um aumento substancial da actividade inibitória de tripsina quando as plantas foram tratadas com MeJa por 96 horas (figura 3). Outros grupos de pesquisa demonstraram efeitos similares com outras espécies de plantas como Valueva *et al.* (2003) que observaram valores de indução da atividade inibitória em folhas de batata proporcionais aos encontrados em nossos trabalhos, Lomate e Hivrale (2012) observaram um aumento de até duas vezes nos níveis de SPI em folhas de guando quando expostos aos vapores de MeJa, Fujimoto *et al.* (2011) relataram um aumento na expressão gênica de PIs em folhas de tomate expostos aos vapores de MeJa por períodos de 72 horas e Kang *et al.* (2001) identificaram um SPI com peso de 27 kDa em folhas de batata através da indução por ácido abscísico, etileno e MeJa.

Depois de otimizado o processo de indução de PIs por MeJa em folhas de maracujá, demos continuidade com o processo de purificação dessas proteínas. A partir de nossas observações, concluímos que para se obter um maior acúmulo desses inibidores, as plantas utilizadas no processo de purificação dos PIs seriam expostas a vapores de MeJa durante quatro dias (96 horas). Com isso, através de técnicas cromatográficas, obtivemos a purificação de 7 proteínas (figura 4 a 12) com atividade inibitória contra tripsina (dado não demonstrado). A análise desses inibidores por SDS-PAGE 12,5% revelaram proteínas com faixa de peso entre 20 e 25 kDa. A purificação de mais de um SPIs induzidos em tecidos foliares de algumas espécies de plantas já foi descrito na literatura (Murdock *et al.*, 2002). Pearce *et al.* (1993) purificaram 6 SPIs induzidos através de fermento mecânico pertencentes a família *Potato II* em folhas de tabaco. Moura e Ryan (2001) também isolaram sete inibidores de folhas de pimenta induzidos por MeJa utilizando cromatografia de fase reversa. Similarmente três inibidores de proteinase serínica foram purificados e caracterizados do látex de *Hevea brasiliensis* por Sritanyarat *et al.* (2006).

Com o interesse de se identificar e caracterizar os PIs obtidos, sequenciamos a região N-terminal de cada um deles através da técnica de degradação de Edman. Todos os inibidores purificados apresentaram homologia com sequências de inibidores da família Kunitz de outros vegetais

tais como: *Threoboma bicolor*, *Herrania mariae*, *Glycine soja*, *Inga laurina*, *Derris trifoliata* e *Prosopis juliflora* (tabela 1 e 2). Contudo, a região N-terminal desses inibidores apresentaram padrões de sequências truncadas com padrões de sequências que caracterizam os inibidores do tipo Kunits. Apesar disso, é improvável afirmar que estas sequências truncadas sejam resultados da digestão parcial ao longo do processo de purificação, pois existem relatos de KTIIs possuindo todo o padrão de sequência Kunitz que foram purificados por meio de estratégias muito semelhantes às nossas (Walsh e Twitchell, 1991; Bhattacharyya e Babu, 2009). Além disso, a ocorrência de resíduos que não apresentaram consenso com o padrão de sequência Kunitz em PfKTI-4 (tabela 2), também foram relatados em outras espécies de plantas (Goodwin *et al.*, 2012; Patil *et al.*, 2012). A partir destes relatos é possível sugerir um provável padrão de sequência Kunitz específico para uma determinada família de plantas.

Nossa constatação da presença de mais de um KPI induzido em folhas de maracujá combinado com o estudo de vários inibidores encontrados em flores neste mesmo vegetal (Pereira *et al.*, 2011) pode ser tomado como um indicativo de que o genoma do maracujá apresente vários genes que codificam para PIs do tipo Kunitz. Estes resultados estão de acordo com trabalhos anteriores que mostram que inibidores do tipo kunitz são codificados por famílias multigênicas em diferentes espécies vegetais, como batata (Heibges *et al.*, 2003a), choupo (Major e Constabel 2008; Philippe *et al.*, 2009) e *Arabidopsis thaliana* (Ma *et al.*, 2011).

Todos os PIs obtidos neste trabalho apresentaram um grande número de isoformas (figura 13). Lomate e Hivrale (2012) enfatizaram que isoformas de PIs em plantas pode ser considerada uma regra em vez de uma exceção. Recentemente, a constatação da presença de isoformas de KPIs em várias espécies vegetais continua sendo descrita na literatura. Tripathi *et al.* (2014) observaram a existência de duas isoformas de KPIs em *Senna tora*. Isoformas de KPIs também foram descritas em sementes de *Erythrina velutina* e *Pithecellobium dumosum* (Machado *et al.*, 2013; Rufino *et al.*, 2013). Alguns eventos moleculares podem influenciar no polimorfismo dos PIs, tais como duplicação gênica seguido de divergência adaptativa (Christeller, 2005),

portanto, este processo pode ter gerado a diversificação de PfKTIs . No entanto, tal como foi recentemente relatado por Speranskaya *et al.* (2012), reações de recombinação também podem ser de grande relevância para a variação genética dentro de genes de PIs. Apesar disso, somente uma análise mais aprofundada com foco na estrutura dos genes certamente vai ajudar a descobrir a natureza da diversidade dos PfKTIs.

Com base em vários estudos, é possível observar que a capacidade inibitória dos KPIs varia dentro das diversas espécies vegetais (Rufino *et al.*, 2013). Alguns KPIs desta família são específicos para a quimotripsina (Joubert *et al.*, 1981) ou tripsina (Macedo *et al.*, 2007). Outros são potentes inibidores de tripsina, que também podem simultaneamente inibir quimotripsina em diferentes graus (Bhattacharyya e Badu, 2009). Em conformidade com os dados da literatura, todos os PfKTIs purificados neste trabalho apresentaram forte atividade inibitória contra tripsina (figuras 14). Esses PIs também foram efetivos contra quimotripsina, com exceção de PfKTI-1 que aparentemente se revelou um inibidor específico para tripsina (figuras 15). De forma geral, observamos uma variabilidade na capacidade inibitória entre os PfKTIs. Esses resultados sugerem que a indução de diferentes inibidores seria uma alternativa evolutiva da planta em resposta a diversidade de proteases de uma mesma classe presente em insetos herbívoros.

Em alguns casos, KPIs também apresentam capacidade de inibir proteases de diferentes classes, tais como os PIs encontrados em sementes de *Adenantha pavonina* (Migliolo *et al.*, 2010), *Piptadenia moniliformis* (Cruz *et al.*, 2013) e em tubérculos de batata (Heibges *et al.*, 2003b), que inibem fortemente tripsina, mas apresentaram uma menor atividade contra papaína. De forma similar, dentre todos os inibidores purificados neste trabalho, dois deles (PfKTI-4 e PfKTI-7) revelaram potencialidade bifuncional, apresentando atividade inibitória contra papaína (figura 16), sendo que a atividade inibitória contra tripsina se manteve mais efetiva (figura 14). Por outro lado, um inibidor bifuncional de sementes de algaroba apresentava predominante inibição contra papaína (Franco *et al.*, 2002).

Na Literatura, exemplos de inibidores de papaína/tripsina do tipo Kunitz mencionados acima foram igualmente correlacionados com papéis defensivos nos tecidos ao qual foram armazenados. Pelo que se sabe até então, os inibidores bifuncionais avaliados neste trabalho são os únicos exemplos descritos em tecido foliar, em resposta a um fito-hormônio envolvido no estresse biótico.

A presença de inibidores bifuncionais em plantas é bem fundamentada como sendo parte de um processo de co-evolução entre hospedeiro e predadores. Acredita-se que em plantas, como em outros organismos, PIs poderiam sofrer um processo de “recrutamento” com o objetivo de ao longo do tempo alterar sobre a classe de proteases ao qual atuem (Christeller, 2005). Križaj *et al.* (1993) estudando uma cistatina de batata demonstrou que apesar desse inibidor ser específico para proteases cisteínicas, sua sequência principal revela homologia com inibidor do tipo Kunitz. Outro exemplo de “recrutamento” é o caso de um SPI do tipo *Squash* o qual apresenta similaridades de características com cistatinas (Heady *et al.*, 2010). No entanto, estudos adicionais são necessários para desvendar os mecanismos evolutivos da condução das inibições observadas para PfKTI - 4 e PfKTI - 7.

Os KPIs também são conhecidos por apresentar grande termoestabilidade (Rufino *et al.*, 2013). Nossas análises demonstraram que os sete PfKTIs apresentaram termorresistência variável (figura 17). Entre eles, PfKTI-6 demonstrou ser o mais estável, mantendo sua atividade inibitória em torno de 70% sobre a atividade da tripsina quando incubado a uma temperatura de 80 °C por 30 minutos. Este resultado corrobora com outros inibidores de tripsina já caracterizados (Macedo *et al.*, 2000; Osman *et al.*, 2002). A estabilidade funcional das proteínas diante de agentes desnaturantes físico e químicos, como temperatura e pH ocorre devido as pontes dissulfeto entre as cadeias polipeptídicas, presentes na estrutura de inibidores de proteases (Macedo *et al.*, 2003). Contudo, a atividade inibitória contra tripsina foi abolida em PfKTI-3 e PfKTI-5 quando pré incubados a temperatura de 100 °C por 30 minutos, sendo que os outros PfKTIs apresentaram baixa atividade contra tripsina (~20%) quando colocados à mesma temperatura.

KPIs têm sido estudados em diversas plantas e contextos, muitas vezes com foco em seu potencial para controle de pragas de importância para a agricultura. No entanto, a diversidade de KPIs dentro de uma espécie de planta não tem sido extensivamente examinado. O papel defensivo dos KPIs foi inferido principalmente pela inibição de proteases digestivas de pragas levando ao retardo do crescimento e desenvolvimento larval através de dieta artificial (Major e Constabel, 2008; Ramos *et al.*, 2012). De acordo com os estudos acima descritos, os PfKTIs tiveram seu potencial inseticida demonstrado através de ensaios *in vitro* e *in vivo* contra larvas de *D. saccharalis* (figuras 18 e 21). Esses resultados foram consistentes para todos os inibidores, demonstrando que os PfKTIs fazem parte de um "arsenal induzível" contra a predação. O trabalho realizado por Silva *et al.* (2012) demonstraram o potencial bioinseticida de inibidores de *Adenantha pavonina* (ApTI). Estes inibidores impediram a atividade proteolítica de enzimas digestivas de *D. saccharalis* demonstrando bastante similaridade com os nossos estudos. Eles ainda analisaram o desenvolvimento de larvas alimentadas com dieta artificial acrescida de ApTI observando um retardo significativo no crescimento desta praga.

A utilização de PIs na transformação de plantas tem sido muito utilizada com a finalidade de se obter plantas resistentes ao ataque de insetos herbívoros. Falco e Silva-Filho (2003) superexpressaram dois SPIs de sementes de soja (SKTI e SBBI) em cana-de-açúcar, obtendo plantas com a capacidade de retardar o desenvolvimento das larvas de *D. saccharalis*. Considerando os benefícios do agronegócio, nossos resultados demonstram a atratividade de cada inibidor como candidatos para estudos em transgênicos com o intuito de aumentar a resistência a estresses bióticos em plantas cultivadas. Contudo, devido à capacidade do inseto de adquirir resistência aos inibidores, alternativamente, outras estratégias podem ser associadas a essa para um melhor resultado, como por exemplo, o controle biológico utilizando inimigos naturais de *D. saccharalis* (White *et al.*, 2012).

Para reforçar nossos estudos sobre a função defensiva destes inibidores contra pragas, realizamos ensaio *in vitro* utilizando PfKTI-4 e PfKTI-7 (inibidores bifuncionais) contra enzimas cisteínicas presentes no intestino

médio de *C. maculatus* (figura 20). As atividades inibitórias obtidas foram próximas às observadas contra papaína comercial (figura 16). Alguns trabalhos demonstram que KPIs são capazes de inibir proteases serínicas do intestino médio deste inseto (Cruz *et al.*, 2013). No entanto, *C. maculatus* apresenta proteases cisteínicas em seu trato digestivo de forma majoritária. Alves *et al.* (2009) demonstraram que PKIs também podem ser efetivos na redução do desenvolvimento de *C. maculatus*. Como a produção de compostos é uma tarefa que exige energia, a síntese de PIs bifuncionais pode ser uma maneira de otimizar o processo de defesa da planta. Neste ponto de vista, a produção de inibidores que atuem sobre tripsina, quimotripsina e papaína em maracujá podem ter vantagens claras contra proteases serínicas e cisteínicas, pois essas enzimas possuem funções importantes no sistema digestivo de insetos lepidópteros e coleópteros, respectivamente.

Além disso, foi demonstrado que os PIs da planta podem oferecer outras opções para a pesquisa voltada no controle de insetos vetores. Os PIs descritos no presente estudo foram altamente ativos para proteases do intestino médio de *A. aegypti* (figura 19). Possibilidades de progressos neste domínio são particularmente atraentes para combater a dengue, já que nenhuma vacina eficaz está disponível e, por isso, os programas de prevenção dependem essencialmente de inseticidas organofosforados para evitar situações endêmicas de dengue (Coller e Clements, 2011).

Nossos resultados somados a observação do acúmulo KPIs em todas as partes da flor (Pereira *et al.*, 2011), indicam a importância de KPIs como membros na estratégia de defesa do maracujá. Recentemente, Cutri e Dornelas (2012) descreveram dados relacionados ao PASSIOMA (genoma do maracujá), onde a maioria dos transcritos representados eram proteínas relacionadas a stress. Assim, esta base de dados pode ser útil para entender a complexidade dos KPIs em maracujá. A superexpressão de PfKPIs individualmente certamente pode facilitar a análise de suas propriedades bioquímicas e aplicações biotecnológicas.

Conclusões

- Em nossos estudos, inibidores de proteinase serínica apresentaram uma indução mais forte em tecido foliar mediante tratamento com metil jasmonato por um período de 96 horas quando comparados com plantas induzidas por 48 horas;
- A purificação de inibidores de proteinase serínica presentes em folhas de maracujá induzidas por MeJa através de técnicas cromatográficas revelaram a presença de 7 inibidores;
- Todos os sete inibidores purificados apresentaram similaridade de sua sequência de aminoácidos da região N-terminal com KPIs de diferentes espécies vegetais. Contudo, foi observado que estas moléculas apresentaram padrão de sequência Kunitz truncada para esta mesma família de inibidores;
- Foi constatada a presença de isoformas em todos os inibidores purificados. Esses resultados, junto com dados da literatura, sugerem uma flexibilidade no mecanismo de defesa de plantas de maracujá em resposta ao ataque de insetos herbívoros;
- De forma geral, os PfKTIs purificados neste trabalho apresentaram forte atividade inibitória contra tripsina e quimiotripsina. Esses inibidores apresentaram variabilidade no potencial inibitório destas proteases quando comparados entre si. Curiosamente, um único inibidor (PfKTI-1) apresentou-se específico contra tripsina;
- A capacidade bifuncional de dois inibidores (PfKTI-4 e PfKTI-7) foi revelada quando através de ensaios *in vitro* foram capazes de inibir tanto proteases serínicas (tripsina e quimiotripsina) quanto proteases cisteínicas (papaína). A atividade inibitória destas moléculas contra proteases cisteínicas do intestino médio de larvas de *Callosobruchus maculatus* reforçam suas características bifuncionais;

- O potencial bioinseticida de todos PfKTIs foram indicados pela atividade inibitória sobre as proteinases serínicas contidas no homogenato intestinal de larvas de quarto estágio do inseto lepidóptero *Diatraea saccharalis*. Ensaio *in vivo* adicionando uma fração enriquecida com estes inibidores em dieta artificial para *D. saccharalis* confirmaram a capacidade destas proteínas de reduzir o crescimento/desenvolvimento e sobrevivência destas pragas;
- Os PIs purificados neste trabalho apresentaram forte atividade inibitória contra enzimas digestivas de *Aedes aegypti*. Esse resultado indica que estes inibidores também podem ser alvo de estudo, como ferramentas biotecnológicas no controle de insetos vetores de doenças.

Bibliografia

Abbas, A., Abbas, R. Z., Khan, J. A. Integrated Strategies for the Control and Prevention of Dengue Vectors with Particular Reference to *Aedes aegypti*. *Pakistan Veterinary Journal* 34: 1-10, 2014.

Abe, M., Abe, K., Iwabuchi, K., Domoto, C., Arai, S. Corn cystatin I expressed in *Escherichia coli*: investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels. *The Journal of Biochemistry* 116: 488-492, 1994.

Ahuja, I., Kissen, R., Bones, A. M. Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science* 17: 73-90, 2012.

Almeida, A. L., Cunha, M. A. P., Maracujá, produção e qualidade na passicultura. Brasília: *Embrapa Informações tecnológicas* 2004.

Almeida, F. A. C., Almeida, S. A., Santos, N. R., Gomes, J. P., Araújo, M. E. R. Efeitos de extratos alcoólicos de plantas sobre o caruncho do feijão vigna (*Callosobruchus maculatus*). *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 9: 585-590, 2005.

Almeida, I. P., Duarte, M. E. M., Rangel, M. E., Mata, M. C., Freire, R. M. M., Guedes, M. A. Armazenamento de feijão macassar tratado com mamona: estudo da prevenção do *Callosobruchus maculatus* e das alterações nutricionais do grão. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais* 7: 133-140, 2005.

Almeida, S. A., Almeida, F. A. C., Santos, N. R., Medeiros, S. S. A., Alves, H. S. Controle do caruncho *Callosobruchus maculatus* (fabr., 1775) (coleóptera:

bruchidae) utilizando extratos de *Piper nigrum* L. (piperaceae) pelo método de vapor. *Ciências agrotécnicas* 30: 793-797, 2006

Alves, D. T., Vasconcelos, I. M., Oliveira, J. T. A. Identification of four novel members of Kunitz-like alpha-amylase inhibitors family from *Delonix regia* with activity toward Coleopteran insects. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 95: 166-172, 2009.

Avanci, N. C., Luche, D. D., Goldman, G. H., Goldman M. H. S. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genetics and Molecular Research* 9: 484-505, 2010.

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

Barreto, C. F. *Aedes aegypti* - Resistência aos inseticidas químicos e as novas alternativas de controle. *Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos* 1: 62-73, 2005.

Bateman, K. S., James, M. N. G. Plant Protein Proteinase Inhibitors: Structure and Mechanism of Inhibition . *Current Protein e Peptide Science* 12 : 341 347, 2011.

Bazok, R., Barcic, J. I., Edwards, C. R. Effects of proteinase inhibitors on western corn rootworm life parameters. *Blackwell Verlag* 129: 185-190, 2005.

Bernacci, I. C., Soares-scott, M. D., Junqueira, N. T. V., Passos, I. R. S., Meletti, L. M. M. *Passiflora edulis* Sims: the correct taxonomic way to cite the yellow passion fruit (and of others colors). *Revista Brasileira de Fruticultura*. 30: 566-576, 2008.

Bhattacharyya, A., Babu, C. Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: insight into structural and antimalarial features. *Phytochemistry* 70: 703-12, 2009.

Bhattacharyya, A., Leighton, S. M., Badu, C. R. Bioinsecticidal activity of *Archidendron ellipticum* trypsin inhibitor on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Spodoptera litura*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 145: 666-677, 2007.

Blast (NCBI): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Bode, R. F., Halitschke, R., Kessler, A. Herbivore damage-induced production and specific anti-digestive function of serine and cysteine protease inhibitors in tall goldenrod, *Solidago altissima* L. (Asteraceae). *Planta* 237: 1287-1296, 2013.

Boiça Jr., Pragas de cultura do maracujazeiro. In: Simpósio sobre a cultura do maracujazeiro, Jaboticabal. *Anais Jaboticabal: FUNEP* 117-203, 1998.

Boller, T., He, S. Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plant and effectors in microbial pathogens. *Science* 324: 742-744, 2009.

Bonardi, V. Dangi, J. L. How complex are intracellular immune receptor signaling complexes? *Frontiers in Plant Science* 3:doi:10.3389/fpls., 2012.

Bortoli, S. A., Dória, H. O. S., Albergaria, N. M. M. S., Botti, M. V. Aspectos biológicos e dano da *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) em sorgo cultivado sob diferentes doses de sódio e potássio. *Ciências Agrotécnicas* 2: 267-273, 2005.

Botelho-Júnior, S., Siqueira-Júnior, C. L., Jardim, B. C., Machado, O. L. T., Neves Ferreira, A. G. C., Perales, J., Jacinto, T. Trypsin inhibitors in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) leaves: accumulation in response to methyl jasmonate, mechanical wounding, and herbivory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9404-9409, 2008.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254, 1976.

Braga, I. A., Valle, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16: 279-293, 2007.

Bravo, J. P., Felipes, J., Zanatta, D. B., Silva, J. L. C., Fernandez, M. A. Sequence and analysis of the mitochondrial DNA control region in the sugarcane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 51: 345-361, 2008.

Brito, J. P., Oliveira, J. E. M., Bortoli, S. A. Toxicidade de óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. sobre *Callosobruchus maculatus* (Fabr., 1775) (Coleoptera: Bruchidae). *Revista de Biologia e Ciências da Terra* 6: 96-103, 2006.

Bruckner, C. H. E., Picanço, M. C. Maracujá - Tecnologia de produção, Pós-colheita, *Agroindústria, Mercado* 3: 102-110, 2001.

Carvalho, R. O., Lima, A. C. S., Alves, J. M. A. Resistência de genótipos de feijão-caupi ao *Callosobruchus maculatus* (Fabr.) (Coleoptera: Bruchidae). *Revista AgroAmbiente* 5: 50-56, 2011.

Castro M. J. P., Baldin' E. L. L., Cruz, P. L., Souza, C. M., Silva, P. H. S. Caracterização da resistência de genótipos de feijão-caupi a *Callosobruchus maculatus*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 48: 332-342, 2013.

Chandrasekaran, V., Lee, C. J., Lin, P., Duke, R. E., Pedersen, L. G. A computational modeling and molecular dynamics study of the Michaelis complex of human protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) and factor Xa (FXa). *Journal of Molecular Modeling* 15: 897-911, 2009.

Chandrashekharaiyah, K. S. Antimicrobial Activity of Trypsin-Chymotrypsin Inhibitor from the Seeds of *Mucuna pruriens*. *Journal of Pure And Applied Microbiology* 7: 2405-2410, 2013.

Chen, R., Vasilakis, N. Dengue - Quo tu et quo vadis? *Viruses-Basel* 3: 1562-1608, 2011.

Chougule, N. P., Doyle, E., Fitches, E., Gatehouse, J. A. Biochemical characterization of midgut (cabbage moth; Lepidoptera: Noctuidae) and effect of soybean Kunitz inhibitor (SKTI) in feeding assays. *Journal of Insect Physiology* 54: 563-572, 2008.

Christeller, J. T. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS Journal* 272: 5710-5722, 2005.

Chung, S. H., Felton, G. W. Specificity of Induced Resistance in Tomato Against Specialist Lepidopteran and Coleopteran Species. *Journal of Chemical Ecology* 37:378–386, 2011.

Cohen, S., Flescher, E. Methyl jasmonate: a plant stress hormone as an anti-cancer drug. *Phytochemistry* 70: 1600-1609, 2009.

Coll, N. S., Epple, P., Dangl, J. L. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death and Differentiation* 18: 1247-1256, 2011.

Coller, B. A. G., Clements, D. E. Dengue vaccines: progress and challenges. *Current Opinion in Immunology* 23: 391-398, 2011.

Coller, B. A. G., Clements, D. E. Dengue vaccines: progress and challenges. *Current Opinion in Immunology* 23: 391-398, 2011.

CONAB, Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana de açúcar. *Boletim técnico*, 1: 1-20, 2014

Constabel, C. P., Barbehenn, R. Defensive roles of polyphenol oxidase in plants. em: Schaller, A. (ed) Induced plant resistance to herbivory. *Springer Science Business Media*, chapter 12, 2008.

Cruz, A. C. B., Massena, F. S., Migliolo, L., Macedo, L. L. P., Monteiro, N. K. V., Oliveira, A. S., Macedo, F. P., Uchoa, A. F., Sá, M. F. G., Vasconcelos, I. M., Murad, A. M., Franco, O. L., Santos, E. A. Bioinsecticidal activity of a novel Kunitz trypsin inhibitor from *Catanduva (Piptadenia moniliformis)* seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 70: 61-68, 2013.

CRUZ, B. C. C., SANTOS-CRUZ, C. L., PIRES, A. J. V., ROCHA, J. B., SANTOS, S., BASTOS, M. P. V. Composição bromatológica da silagem de capim-elefante com diferentes proporções de casca desidratada de maracujá (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa*). *Revista Brasileira Ciência Agrárias*, 3: 434-440, 2010.

Cunha, E. M. Efeito de produtos vegetais e da fosfina no controle do *Callosobruchus maculatus* e na qualidade fisiológica de sementes de caupi (*Vigna unguiculata*). Dissertação (Mestrado) Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2002.

Cutri, L., Dornelas, M. C. PASSIOMA: Exploring expressed sequence tags during flower development in *Passiflora* spp. *International Journal of Genomics*, 1-11, 2012.

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

De Wit, P. J. How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Science* 18: 72-84, 2007.

De'lano-Frier, J. P., Marti'nez-Gallardo, N. A., Marti'nez-De La Vega, O., Salas-Araiza, M. D., Barbosa-Jaramillo, E. R., Torres, A., Vargas, P., Borodanenko, A. The effect of exogenous jasmonic acid on induced resistance and productivity in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) is influenced by environmental conditions. *Journal of Chemical Ecology* 30: 1001–1034,2004.

Dinardo-Miranda, L. L., Fracasso, J. V., Perecin, D. Variabilidade espacial de populações de *Diatraea saccharalis* em canaviais e sugestão de método de amostragem. *Bragantia* 70: 547-552, 2011.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Boletim técnico, 2011. Disponível em: <http://www.embrapa.br/>. Acesso em: 10 de março de 2014.

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

Falco, M. C., Silva-Filho, M. C. Expression of proteinase inhibitor in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41: 761-766, 2003.

Fan, S. G., Wu, G. H. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 46: 273-292, 2005.

Farmer, E. E., Ryan, C. A. Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87: 7713-7716, 1990.

Felicioli, R., Garzelli, B., Vaccari, L., Melfi, D., Balestreri, E. Activity staining of protein inhibitors of proteases on gelatin containing polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 244: 176–178, 1997.

Felton, G. W., Indigestion is a plant's best defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 18771-18772, 2005.

Franco, O. L., Sá, M. F. G., Sales, M. P., Mello, L. V., Oliveira, A. S., Rigden, D. J. Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*. *Proteins* 49: 335-341, 2002.

Fujimoto, T., Tomitaka, Y., Abe, H., Tsuda, T., Futai, K., Mizukubo, T. Expression profile of jasmonic acid-induced genes and the induced resistance against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in tomato plants (*Solanum lycopersicum*) after foliar treatment with methyl jasmonate. *Journal of Plant Physiology* 10:1084-1097, 2011.

Gallo, D., Nakano, O., Silveira Neto, S., Carvalho, R. P. L., Baptista, G. C., Berti Filho, E., Parra, J. R. P., Zucchi, R. A., Alves, S. B., Vendramim, J. D., Marchini, L. C., Lopes, J. R. S., Omoto, C. *Entomologia Agrícola*. Piracicaba: Fealq, 2002.

Garcez, W. S., Garcez, F. R., Silva, L. M. G. E., Sarmiento, U. C. Substâncias de origem vegetal com atividade larvívica contra *Aedes aegypti*. *Revista Virtual de Química* 5: 363-393, 2013.

Garcia, V. A., Freire, M. G. M., Novello, J. C., Marangoni, S., Macedo, M. L. R. Trypsin inhibitor from *Poecilanthe parviflora* seeds: Purification, characterization, and activity against pest proteases. *The Protein Journal* 23: 243-350, 2004.

Gfeller, A., Dubugnon, L., Liechti, R., Farmer, E. E. Jasmonate biochemical pathway. *Science Signaling* 3: 109-115, 2010.

Gomes, C. E. M., Barbosa, A. E. A. D., Macedo, L. L. P., Pitanga, J. C. M., Moura, F. T., Oliveira, A. S., Moura, R. M., Queiroz, A. F. S., Macedo, F. P., Andrade, L. B. S., Vidal, M. S., Sales, M. P. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitidis capitata* (fruit fly). *Plant Physiology and Biochemistry* 43: 1095-1102, 2005.

Goodwin, P. H., Xie, W., Valliani, M. Three genes of miraculin-like proteins from *Nicotiana benthamiana* with dissimilar putative structures show highly similar patterns of induction following bacterial and fungal infections. *European Journal of Plant Pathology* 134: 795-810, 2012.

Hardham, A. R., Jones, D. A., Takemoto, D. Cytoskeleton and cell wall function in penetration resistance. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 342-348, 2007.

Hare, J. D., Walling, L. L. Constitutive and jasmonate-inducible traits of *Datura wrightii*. *Journal of Chemical Ecology* 23: 29-47, 2006.

Heady, A. J., MacAskill, U. K., Wright, M. A., Claridge, J. K., Edwards, P. J. B., Farley, P. C., Christeller, J. T., Laing, W. A., Pascal, S. M. Solution structure of the squash aspartic acid proteinase inhibitor (SQAPI) and mutational analysis of pepsin inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 285: 27019-27025, 2010.

Heibges, A., Glaczinski, H., Ballvora, A., Salamini, F., Gebhardt, C. Structural diversity and organization of three gene families for Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 269: 526–534, 2003a.

Heibges, A., Salamini, F., Gebhardt, C. Functional comparison of homologous members of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 269: 535-541, 2003b.

Higaki, T., Kurusu, T., Hasezawa, S., Kuchitsu, K. Dynamic intra-cellular reorganization of cytoskeletons and the vacuole in defense responses and hypersensitive cell death in plants. *Journal of Plant Research* 124: 315-324, 2011.

Hines, M. E., Osuala, C. I., Nielsen S. S. Isolation and partial characterization of a soybean cystatin cysteine proteinase inhibitor of coleopteran digestive proteolytic activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39: 1515-1520, 1991.

Howe, G. A., Jander, G. Plant immunity to insect herbivores. *Annual Review of Plant Biology* 59: 41–66, 2008.

Huang, Y., Xiao, B., Xiong, L. Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice. *Planta* 226: 73-85, 2007.

IBGE – Instituto brasileiro de geografia e estatística. Produção Agrícola, 2012. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 16 de março de 2014.

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

Jiang, H., Kanost, M. R. Characterization and functional analysis of 12 naturally occurring reactive site variants of serpin-1 from *Manduca sexta*. *The Journal of Biological Chemistry* 272: 1082-1087, 1997.

Jiménez-Durán, K., McClure, B., García-Campusano, F., Rodríguez-Sotres, E., Cisneros, J., Busot, G., Cruz-García, F. NaStEP: A proteinase inhibitor essential to self incompatibility and a positive regulator of HTB stability in *Nicotiana glauca* pollen tubes. *Plant Physiol* 161: 97-107, 2013.

Joshi, R. S., Mishra, M., Suresh, G. G., Gupta, V. S., Giri, A. P. Complementation of intramolecular interactions for structural-functional stability of plant serine proteinase inhibitors. *Biochimica et Biophysica Acta* 11: 5087-5094, 2013.

Joulbert, F. J., Carlsson, F. H., Haylett, T. Hoppe-Seyler's Zeitsch. *Physiology Chemistry* 362: 531–538, 1981.

Kader, J. C. Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 627-654, 1996.

Kang, S., Choi, J., Suh, S. A leaf-specific 27 kDa protein of potato Kunitz type proteinase inhibitor is induced in response to abscisic acid, ethylene, methyl jasmonate, and water deficit. *Molecules and Cell* 13: 144-147, 2001.

Kim, J., Park, S. C., Hwang, I. Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *International Journal of Molecular Sciences* 10: 2860-2872, 2009.

Koiwa, H., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. *Trends in Plant Science* 2: 379-384, 1997.

Kombrink, E. Chemical and genetic exploration of jasmonate biosynthesis and signaling paths *Planta* 236: 1351-1366, 2012.

Konarev, A. V., Anisimova, I. N., Gavrilova, V. A., Vachrusheva, T. E., Konechnaya, G. Y., Lewi, M., Shewry, P. R. Serine proteinase inhibitors in the Compositae: distribution, polymorphism and properties. *Phytochemistry* 59: 279- 291, 2002.

Križaj, I., Drobnic-KoSorok, M., Brzin, J., Jerala, R., Turk, V. The primary structure of inhibitor of cysteine proteinases from potato. *FEBS Letters* 333: 15 20, 1993.

Kunitz, M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybeans. *Science* 101: 668 – 669, 1945.

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

Lefevre, A. M. C., Lefevre, F., Scandar, S. A. S., Yasumaro, S., Sampaio, S. M. P. Representações dos agentes de combate ao *Aedes aegypti* sobre a estratégia de retirada do inseticida nas ações de controle do vetor. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 6: 359-372, 2003.

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

Li, J., Brader, G., Palva, E. T. Kunitz trypsin inhibitor: An antagonist of cell death triggered by phytopathogens and fumonisin B1 in *Arabidopsis*. *Molecular plant* 3: 482-495, 2008.

LIMA, T. B., SILVA, O. N., MIGLIOLO, L., SOUZA-FILHO, C. R., GONÇALVES, E. G., VASCONSELOS, I. M., OLIVEIRA J. T. A., AMARAL, A. C., FRANCO, O. L. A Kunitz proteinase inhibitor from corms of *Xanthosoma blandum* with bactericidal activity. *Journal of Natural Products* 74: 969-975, 2011.

Lomate, P. R., Hivrale, V. K. Wound and methyl jasmonate induced pigeon pea defensive proteinase inhibitor has potency to inhibit insect digestive proteinases. *Plant Physiology and Biochemistry* 57: 193-199, 2012

Luna, J. E. D., Martins, M. F., Anjos, A. F., Kuwabara, E. F., Navarro-Silva, M. A. Susceptibilidade de *Aedes aegypti* aos inseticidas temephos e cipermetrina. *Revista Brasileira de Saúde Pública* 38: 842-843, 2004.

Ma, Y., Zhao, Q., Lu, M., Wang, J. Kunitz-type trypsin inhibitor gene family in *Arabidopsis* and *Populus trichocarpa* and its expression response to wounding and herbivore in *Populus nigra*. *Tree Genet Genomes* 7: 431-441, 2011.

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

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

Macedo, M. L. R., Matos, D. G. G., Machado, O. L. T., Marangoni, S., Novello, J. C. Trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds: purification and properties. *Phytochemistry* 53: 553-558, 2000.

Machado, R. J. A., Monteiro, N. K. V., Migliolo, L., Silva, O. N., Pinto, M. F. S., Oliveira, A. S., Franco, O. L., Kiyota, S., Bemquerer, M. P., Uchoa, A. F., Morais, A. H. A., Santos, E. A. Characterization and pharmacological properties of a novel multifunctional Kunitz inhibitor from *Erythrina velutina* seeds. *PLoS One*.5: e63571, 2013.

Major, I. T., Constabel, C. P. Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in Poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores. *Plant Physiology* 146: 888-903, 2008.

Marangoni, S. Copaíba contra o caruncho. *Revista Pesquisa FAPESP*, São Paulo 71: 10-12, 2002.

Marcoris, M. L. G., Angrighetti, M. T. M., Glasser, C. M., Garbeloti, V. C., Cirino, V. C. B. Alteração de resposta de suscetibilidade de *Aedes aegypti* a inseticidas organofosforados em municípios do Estado de São Paulo. *Revista de Saúde Pública* 3: 521-522, 1999.

Marsaro-Júnior, A. L., Vilarinho, A. A. Resistência de cultivares de feijão-caupi ao ataque de *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) em condições de armazenamento. *Revista Acadêmica de Ciências Agrárias e Ambientais* 9: 51-55, 2011.

Mazaro, S. M. Indução de resistência à doenças em morangueiro pelo uso de elicitores. Tese (Doutorado em Produção Vegetal)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

Meletti, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura* E: 083-091, 2011.

Miersch O, Wasternack C. Octadecanoid and jasmonate signaling in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) leaves: endogenous jasmonates do not induce jasmonate biosynthesis. *Biological Chemistry* 81: 715 – 722, 2000.

Migliolo, L., de Oliveira A. S., Santos, E. A., Franco, O. L., de Sales, M. P. Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward

serine- and cysteine-proteinases. *Journal of Molecular Graphics and Modelling* 29: 148-156, 2010.

Mithoefer, A., Boland, W. plant defense against herbivores: Chemical aspects. *Annual Review of Plant Biology* 63: 431-450, 2012.

Monath, T. P. Dengue: the risk to developed and developing countries. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 2395-2400, 1994.

Mondaini, I., Kinpara, D. L. Avaliação financeira da produção de maracujá. *Embrapa Informações tecnológicas* 2003.

Moura, D. S., Ryan, C. A. Wound-inducible proteinase inhibitors in peppers. Differential regulation upon wounding, systemin, and methyl jasmonate. *Plant Physiology* 126: 289-298, 2001.

Murdock, L. L., Shade, R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 6605-6611, 2002.

Muricken, D. G., Gowda, L. R. Molecular engineering of a small trypsin inhibitor based on the binding loop of horsegram seed Bowman-Birk inhibitor. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 26: 553-560, 2011.

Neuteboom, L. W., Matsumoto, K. O., Christopher, D. A. An extended AE-rich N-terminal trunk in secreted pineapple cystatin enhances inhibition of fruit

bromelain and is post translationally removed during ripening. *Plant Physiol* 151: 515-527, 2009.

Norton, G., D'Mello, J. P. F., Duffus, C. M., Duffus, J. M. Proteinase Inhibitors. *Toxic Substances in Crop Plants* 4: 69-106, 1991.

Oliva, M. L., Silva, M. C. C., Sallai, R. C., Brito, M. V., Sampaio, M. U. A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie* 11: 1667-1673, 2010.

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

Oliveira, G. B. Kunz, D., Peres, T. V. Variant vicilins from a resistant *Vigna unguiculata* lineage (IT81D-1053) accumulate inside *Callosobruchus maculatus* larval midgut epithelium. *Comparative Biochemistry And Physiology B Biochemistry e Molecular Biology* 168: 45-52, 2014.

OMS, Organização Mundial da Saúde. Dengue and Severe Dengue. Fact Sheet N° 117, 2012.

OPAS/OMS, Organização Pan Americana da Saúde. Sítio do Programa Regional da dengue. Disponível em: <<https://new.paho.org/bra/>>. Acesso em: 21 de abril de 2012.

Osman, M. A., Reid, P. M., Weber, C. W. Thermal inactivation of tepary bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean protease inhibitors: effect of acidic and basic pH. *Food Chemistry* 78: 419-423, 2002.

Pando, S. C., Oliva, M. L. V., Sampaio, C. A. M., Ciero, L. D., Novello, J. C., Marangoni, S. Primary sequence determination of a kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds. *Phytochemistry* 57: 625-631, 2001.

Parde, V. D., Sharma, H. C., Kachole, M. S. In vivo inhibition of *Helicoverpa armigera* gut pro-proteinase activation by non-host plant proteinase inhibitors. *Journal of Insect Physiology* 56: 1315-1324, 2010.

Patil, D. N., Chaudhary, A., Sharma, A. K., Tomar, S., Kumar, P. Structural basis for dual inhibitory role of tamarind Kunitz inhibitor (TKI) against factor Xa and trypsin. *FEBS Journal* 279: 4547-4564, 2012.

Pearce, G., Johnson, S., Ryan, C. A. Purification and characterization from tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves of six small, wound-inducible, proteinase inhibitors of the potato inhibitor II family. *Plant Physiology* 102: 639-644, 1993.

Pearce, G., Strydom, D., Johnson, S., Ryan, C. A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitors proteins. *Science* 253: 895-898, 1991.

Pereira, A. C., Oliveira, J. V., Junior, M. G. C., Câmara, C. A. G. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos. Atividade inseticida de óleos essenciais e fixos sobre *Callosobruchus maculatus* (FABR.,1775) (Coleoptera: Bruchidae)

em grãos de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. *Ciência e agrotecnologia, Lavras* 3: 717-724, 2008.

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

Philippe, R. N., Ralph, S. G., Kulheim, C., Jancsik, S. I., Bohlmann, J. Poplar defense against insects: genome analysis, full-length cDNA cloning, and transcriptome and protein analysis of the poplar Kunitz-type protease inhibitor family. *New Phytologist*, 184: 865-884, 2009.

Pires, A. A. Efeito da adubação alternativa do Maracujazeiro-amarelo nas características químicas e físicas do solo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 5: 1977-2005, 2008.

Polanczyk, R. A., Garcia, M. O., Alves, S. B. Potencial de *Bacillus thuringiensis Berliner* no controle de *Aedes aegypti*. *Revista da Saúde Pública* 37: 813-816, 2003.

Pompermayer, P., Lopes, A. R., Terra, W. R., Parra, J. R. P., Falco, M. C., Silva Filho, M. C. Effects of soybean proteinase inhibitors on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*. *Entomologia Experimental et Applicata* 99: 79-85, 2001.

Quilis, J., Lopez-Garcia, B., Meynard, D. Inducible expression of a fusion gene encoding two proteinase inhibitors leads to insect and pathogen resistance in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 12: 367-377, 2014

Ramos, V. S., Cabrera, O. G., Camargo, E. L. O., Ambrósio, A. B., Vidal, R. O., Silva, D. S., Guimarães, L. C., Marangoni, S., Parra, R. P., Pereira, G. A. G., Macedo, L. R. Molecular cloning and insecticidal effect of *Inga laurina* trypsin inhibitor on *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 156: 148-158, 2012.

Ranasinghe, S. McManus, D. P. Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. *Developmental and Comparative Immunology* 39: 219-227, 2013.

Rangel, M., Machado, O. L. T., Cunha, M., Jacinto, T. Accumulation of chloroplast targeted lipoxygenase in passion fruit leaves in response to methyl jasmonate. *Phytochemistry* 60: 619-625, 2002.

Rao, K. N., Suresh, C. G. Bowman-Birk protease inhibitor from the seeds of *Vigna unguiculata* forms a highly stable dimeric structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1774: 1264-1273, 2007.

Rawlings, N. D., Waller, M., Barrett, A. J., Bateman, A. *MEROPS*: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Research* 42: 503-509, 2014.

Rizzi, L. C., Rabello L. R., Morosini Filho, W., Savazaki, E. T. Kavati, R. Cultura do maracujá azedo (Boletim técnico nº235). Campinas-SP, Cati, 2: 145, 1998.

Roberts, T. H., Ahn, J. W., Lampl, N., Whisstock, J. C; Bird, P. I. Plants and the study of serpin biology . *Methods in Enzymology* 499: 347-366, 2011.

Rochel, R., Gould, E. A. Understanding the Dengue Viruses and Progress towards Their. *BioMed Research International* 5: 8-28, 2013.

Rodrigues, J. S. Q., Pineli, L. L. O., Rodrigues, N. G., Lima., H. C., Costa, A. M., Silva, C. C. O., Junqueira, N. T. V., Chiarello, M. D. Qualidade sensorial de néctares de maracujás BRS Ouro Vermelho produzidos em diferentes sistemas de cultivo. *Revista Ceres* 5: 60-67, 2013.

Rodriguez-Saona, C. R., Musser, R. O., Vogel, H., Hum-Musser, S. M., Thaler, J. S. Molecular, biochemical, and organismal analyses of tomato plants simultaneously attacked by herbivores from two feeding guilds. *Journal of Chemical Ecology* 36:1043-1057, 2010.

Rohwer, C. L., Erwin, J. E. Horticultural applications of jasmonates: a review. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 83: 283–304, 2008.

Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V., Mysore, K. S. Rufino, F. P. S., Pedroso, V. M. A., Araujo, J. N. Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) seeds against insect-pests' digestive proteinases. *Plant Physiology and Biochemistry* 63: 70-76, 2013.

Rufino, F. P. S., Pedroso, V. M. A., Araujo, J. N., França, A. F. J., Rabêlo, L. M. A., Migliolo, L., Kiyota, S., Santos, E. A, Franco, O. L., Oliveira, A. S. Inhibitory effects of a Kunitz-type inhibitor from *Pithecellobium dumosum* (Benth) seeds against insect-pests' digestive proteinases. *Plant Physiology and Biochemistry* 63: 70-76, 2013.

Sabotic, J., Kos, J. Microbial and fungal protease inhibitors-current and potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93: 1351-1375, 2012.

Schaller, A., Stintzi, A. Enzymes in jasmonate biosynthesis – Structure, function, regulation. *Phytochemistry* 70: 1532–1538, 2009.

Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., Pascholati, S. F. Mecanismos bioquímicos e defesa vegetal. in: Pascholati, S. F., Leite, B., Stangarlin, Jr., Cia, P. (ed.). *Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular. Piracicaba: FEALQ. 6: 227-248, 2008.*

Sckenkel, E. P., Gosmann, G., Petrovick, P. R. Em Farmacognosia: da planta ao medicamento. Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. Ed. Universidade/UFRGS. Ed. da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 15, 2000.

Selvakumar, P., Gahloth, D., Tomar, P. P. S., Sharma, N., Kumar, Sharma, A. K. Molecular evolution of miraculin-like proteins in soybean Kunitz super-family. *Journal of Molecular Evolution* 73: 369–379, 2011.

Shewry, P. R., Lucas, J. A. Plant proteins that confer resistance to pests and pathogens. *Advances In botanical research incorporating advances in plant*

pathology 26: 135-192, 1997.

Sidhu, J. K., Stout, M. J., Blouin, D. C. Effect of silicon soil amendment on performance of sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae) on rice. *Bulletin of Entomological Research* 103: 656-664, 2013.

SIDRA - Sistema IBGE de Recuperação Automática. Disponível em: <www.sidra.ibge.gov.br>. Acesso em 22 de janeiro de 2014.

Silva, H. H. G., Silva, I. G., Oliveira, C. L. N. S., Elias, C. N. Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. *Entomologia e Vectores* 6: 383-391, 1999.

Silva, H. H. G., Silva, I. G., Oliveira, C. L. N. S., Elias, C. N. Adaptação do *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) em criadouros artificiais com água poluída. *Entomol. Vectores* 6: 383-391, 1999.

Silva, R. M., Aguiar, A. V. M., Cardoso, E. A., Oliveira, L. A. A., Lima, J. G. A. Germinação e crescimento inicial de mudas de cinco espécies de maracujá (*Passiflora spp.*) visando obtenção de porta-enxerto. *Revista verde de agroecologia e desenvolvimento sustentável* 6: 131 – 135, 2011.

Silva, W., Freire, M. G. M., Parra, J. R. P., Marangoni, S., Macedo, M. L. R. Evaluation of the *Adenantha pavonina* seed proteinase inhibitor (ApTI) as a bioinsecticidal tool with potential for the control of *Diatraea saccharalis*. *Process Biochemistry* 47: 257-263, 2012.

Sjostrom, G., Rosa, J. F. L. Estudos sobre as características físicas e composição química do maracujá amarelo, *Passiflora edulis f. flavicarpa*. Congresso Brasileiro de Fruticultura 265-273, 1978.

Sokal, R. R., Rohlf, F. J. Biometry, 4th edn. W.H. Freeman & Co, New York.

Speranskaya, A. S., Krinitsina, A. A., Kudryavtseva, A. V., Poltronieri, P., Santino, A., Oparina, N. Y., Dmitriev, A. A., Belenikin, M. S., Guseva, M. A., Shevelev, A. B. Impact of recombination on polymorphism of genes encoding Kunitz-type protease inhibitors in the genus *Solanum*. *Biochimie* 94: 1687-1696, 2012.

Sritanyarat, W., Pearce, G., Siems, W. F., Ryan, C. A., Wititsuwannakul, R., Wititsuwannakul., D. Isolation and characterization of iso inhibitors of the potato protease inhibitor I family from the latex of the rubber trees, *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* 67: 1644-1650, 2006.

Tan, C. W., Lo, J. C., Yadav, J., Ravuiwasa, K. T., Hwang, S. Y. Methyl jasmonate induced responses in four plant species and its effect on *Spodoptera litura* Fab. performance. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 14:263–269, 2011.

Tan, W., Chiang, S., Ravuiwasa, K. T., Yadav, J., Hwang, S. Jasmonate induced defenses in tomato against *Helicoverpa armigera* depend in part on nutrient availability, but artificial induction via methyl jasmonate does not. *Arthropod-Plant Interactions* 6:531–541, 2012.

Tatiane, S. S., Torquato, R. J. S., Lemos, F. J. A., Tanaka, A. S. Selective inhibitors of digestive enzymes from *Aedes aegypti* larvae identified by phage display. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43: 9-16, 2013.

Teixeira, M. G., Barreto, M. L. Avaliação de impacto de ações de combate ao *Aedes aegypti* na cidade de Salvador, Bahia. *Ciência da Saúde Coletiva* 5: 108-115, 1996.

Teles, R. C. L., Souza, E. M. T., Calderon, L. A., Freitas, S. M. Purification and pH stability characterization of a chymotrypsin inhibitor from *Schizolobium parahyba* seeds. *Phytochemistry* 65: 793-799, 2004.

Thaler, J. S. Effect of jasmonate-induced plant responses on the natural enemies of herbivores. *Journal of Animal Ecology* 71: 141-150, 2002.

Torres, M. A. ROS in biotic interactions. *Plant Physiology* 138: 414-429, 2010.

Trewavas, A. What is plant behavior? *Plant Cell and Environment* 32: 606-616, 2009.

Tripathi, V. R., Sahasrabudhe, A. A., Kumar, S., Garg, S. K. Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Senna tora* active against midgut protease of podborer. *Process Biochemistry* 49: 347-355, 2014.

Vacari, A..M., Genovez, G. S., Laurentis, V. L., Bortoli, S. A. Fonte proteica na criação de *Diatraea saccharalis* seu reflexo na produção e no controle de qualidade de *Cotesia flavipes*. *Bragantia* 3: 71-76, 2012.

Valueva, T. A., Revina, T. A., Gvozdeva, E. L., Gerasimova, N. G., Ozeretzkovskaya, O. L. Role of protease inhibitors in potato protection. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 29: 444-448, 2003.

van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162, 2006.

Volpicella, M., Leoni, C., Costanza, A. Cystatins, serpins and other families of protease inhibitors in plants. *Current Protein e Peptide Science* 12 : 386-398, 2011.

Walsh, T. A., Twitchell, W. P. Two Kunitz-type proteinase inhibitors from potato tubers. *Plant Physiology* 97: 15-18, 1991.

Wang, K. J., Li, X. H., Yamashita, T., Takahata, Y. Single nucleotide mutation leading to an amino acid substitution in the variant Tik soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) identified in Chinese wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.). *Plant Systematics and Evolution* 298:1-7, 2012.

Wang, K. J., Takahata, Y., Kono, Y., Kaizuma, N. Allelic differentiation of Kunitz trypsin inhibitor in wild soybean (*Glycine soja*). *Theoretical and Applied Genetics* 117:565-573, 2008.

Wang, L., Wu, J. The essential role of jasmonic acid in plant-herbivore interactions - using the wild tobacco *Nicotiana attenuata* as a model. *Journal of Genetics and Genomics* 40: 597-606, 2013.

Wang, L., Zhao, F., Li, M., Zhang, H., Gao, Y., Cao, P., Pan, X., Wang, Z., Chang, W. Conformational changes of rBTI from buckwheat upon binding to trypsin: implications for the role of the P89 residue in the potato inhibitor I family. *Plos one* 6: 1-7, 2011.

Wasternack, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Annals of Botany* 100: 681-697, 2007.

Wasternack, C., Forner, S., Strnad, M., Hause, B. Jasmonates in flower and seed development. *Biochimie* 95: 79-85, 2013.

White, W. H., Erwin, T. L., Viator, B. J. *Leptotrachelus dorsalis* (coleoptera: carabidae): a candidate biological control agent of the sugarcane borer in Louisiana. *The Florida Entomologist* 95: 261-267, 2012.

WHO, World Health Organization. Dengue and Severe Dengue. Fact Sheet N°117, 2012.

Wu W. M., Li, H. B., Navaneetham, D., Reichenbach, Z. W., Tuma, R. F., Walsh, P. N. The Kunitz protease inhibitor domain of protease nexin-2 inhibits factor XIa and murine carotid artery and middle cerebral artery thrombosis. *Blood* 120: 671-677, 2012.

Yoshizaki, L., Troncoso, M. F., Lopes, J. L. S., Hellman, U., Beltramini, L. M., Wolfenstein-Todel, C. *Calliandra selloi* Macbride trypsin inhibitor: isolation, characterization, stability, spectroscopic analyses. *Phytochemistry* 68: 2625-2634, 2007.

Zavala, J. A., Patankar, A. G., Gase K., Hui, D. Q., Baldwin, I. T. Manipulation of endogenous trypsin proteinase inhibitor production in *Nicotiana attenuate* demonstrates their function as antiherbivore defenses. *Plant Physiology* 134: 1181-1190, 2004.

Anexo

Defense response in non-genomic model species: methyl jasmonate exposure reveals the passion fruit leaves' ability to assemble a cocktail of functionally diversified Kunitz-type trypsin inhibitors and recruit two of them against papain

Sylvio Botelho-Júnior · Olga L. T. Machado · Kátia V. S. Fernandes · Francisco J. A. Lemos · Viviane A. Perdizio · Antônia E. A. Oliveira · Leandro R. Monteiro · Mauri L. Filho · Tânia Jacinto

Received: 13 February 2014 / Accepted: 17 April 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract

Main conclusion Multiplicity of protease inhibitors induced by predators may increase the understanding of a plant's intelligent behavior toward environmental challenges.

Information about defense mechanisms of non-genomic model plant passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) in response to predator attack is still limited. Here, via biochemical approaches, we showed its flexibility to build-up a broad repertoire of potent Kunitz-type trypsin inhibitors (KTI) in response to methyl jasmonate. Seven inhibitors (20–25 kDa) were purified from exposed leaves by chromatographic

techniques. Interestingly, the KTIs possessed truncated Kunitz motif in their N-terminus and some of them also presented non-consensus residues. Gelatin-Native-PAGE established multiple isoforms for each inhibitor. Significant differences regarding inhibitors' activity toward trypsin and chymotrypsin were observed, indicating functional polymorphism. Despite its rarity, two of them also inhibited papain, and such bifunctionality suggests a recruiting process onto another mechanistic class of target protease (cysteine-type). All inhibitors acted strongly on midgut proteases from sugarcane borer, *Diatraea saccharalis* (a lepidopteran insect) while *in vivo* assays supported their insecticide properties. Moreover, the bifunctional inhibitors displayed activity toward midgut proteases from cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (a coleopteran insect). Unexpectedly, all inhibitors were highly effective against midgut proteases from *Aedes aegypti* a dipteran insect (vector of neglected tropical diseases) opening new avenues for plant-derived PIs for vector control-oriented research. Our results reflect the KTIs' complexities in passion fruit which could be wisely exploited by influencing plant defense conditions. Therefore, the potential of passion fruit as source of bioactive compounds with diversified biotechnological application was strengthened.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00425-014-2085-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. Botelho-Júnior · F. J. A. Lemos · V. A. Perdizio · T. Jacinto (✉)

Laboratório de Biotecnologia, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-600, Brazil
e-mail: jacintot_uenf@yahoo.com.br; tania@uenf.br

O. L. T. Machado · K. V. S. Fernandes · A. E. A. Oliveira
Laboratório de Química de Função de Proteínas e Peptídeos, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-600, Brazil

L. R. Monteiro
Laboratório de Ciências Ambientais, Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ 28013-600, Brazil

M. L. Filho
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Dr. Leonel Miranda, Campos dos Goytacazes, RJ 28020-560, Brazil

Keywords Defense response · Jasmonate · Kunitz protease inhibitor · Passion fruit · Recruitment

Abbreviations

BANA *N*-Benzoyl-L-arginine-2-naphthylamide
BAPNA *N*-Benzoyl-DL-arginyl-p-nitroanilide
BSA Bovine serum albumin
BTEE *N*-Benzoyl tyrosine ethyl ester
eggCys Egg cystatin
EST Expressed sequence tags
KPIs Kunitz-type protease inhibitors

KTI	Kunitz-type trypsin inhibitors
MeJa	Methyl jasmonate
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PIs	Proteinase inhibitors
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SoyKTI	Soybean Kunitz inhibitor
TFA	Trifluoroacetic acid
TIs	Trypsin inhibitors

Introduction

Protein-based proteinase inhibitors (PIs) are ubiquitously found in living organisms, constituting a varied and structurally complex group of proteins. A compelling list of over 70 inhibitor families distinguished based on comparisons of protein primary structure has been published at MEROPS database (Rawlings et al. 2014; <http://merops.sanger.ac.uk/inhibitors>). In general, PIs are effective to block one of four principal mechanistic classes of proteolytic enzymes (serine, cysteine, aspartic and metalloprotease) (Otlewski et al. 2005), while inhibitors towards threonine and glutamic proteases have not been described to date. Thus, based on specificities against various proteases, the inhibitors can be classified as serine, cysteine, aspartic or metalloprotease PIs (Christeller 2005). PIs operate through direct molecular contact with target enzymes which can be of different interaction modes, like the standard mechanism (canonical ones) i.e., when inhibitors bind to the active site of cognate protease in a substrate-like manner (Laskowski and Qasim 2000; Gáspári et al. 2010). Plant PIs are a diverse group of proteins comprising at least ten inhibitor families named: Kunitz inhibitor, Bowman–Birk inhibitor, cysteine protease inhibitor (phytolectin), potato I inhibitor, potato II inhibitor, squash inhibitor, cereal trypsin/ α -amylase inhibitor, metalloprotease inhibitor, serpin, mustard inhibitor (De Leo et al. 2002; Rawlings et al. 2014).

In plants, serine PIs are more abundant and consequently they have been studied in most detail, being the soybean Kunitz inhibitor the first described. Usually, Kunitz-type protease inhibitors (KPIs) are single chain proteins, in a range of ~18–24 kDa, with two disulfide bridges and one reactive site (Oliva et al. 2010). The majority of KPIs were studied on an individual basis, consequently far fewer research groups addressed the complexity of this kind of inhibitor in a given plant species as described for potato and the woody model poplar, for instance (Heibges et al. 2003a; Major and Constabel 2008; Philippe et al. 2009). A singular feature of KPIs is that some members can be active against aspartic and cysteine proteases, e.g., the cathepsin D inhibitor from potato tubers (which also inhibits trypsin) (Ritonja et al. 1990) and bifunctional ones effective toward trypsin-papain found in legume seeds and potato tubers (Heibges et al. 2003b;

Migliolo et al. 2010). Intrinsic structures of the Kunitz family namely β -trefoil fold seem to be essential for evolutionary process to gain multiple functions (Azarkan et al. 2011).

Plants' PIs are found in high amounts in storage organs and reproductive tissues are believed to play key developmental and defensive roles (Ryan 1990; Pereira et al. 2011). The defense-related tasks of PIs can be accounted for by the activity against proteases of invading organisms as pest insects and pathogenic microflora. Moreover, the accumulation of PIs in plant tissues as a response to mechanical wounding, herbivory and jasmonates is a distinctive attribute of their defensive roles against predation (Howe and Jander 2008). Consistently, transgenic approaches illustrate the importance of PIs for plant's resistance against aggressors (Srinivasan et al. 2009; Carrillo et al. 2011). Different aspects underlie the renewed interest in PIs isolation/characterization: (1) they are invaluable tools to achieve a better understanding of fundamental principles of protein–protein interaction (Chandrasekaran et al. 2009; Wang et al. 2011); (2) their regulatory action in physiological process via protease inhibitor balance (Neuteboom et al. 2009; Jiménez-Durán et al. 2013); (3) their polymorphisms are attractive features to study molecular evolution (Christeller 2005; Wang et al. 2008; Azarkan et al. 2011); (4) their potential in therapeutics application (Muricken and Gowda 2011; Wu et al. 2012).

It is currently agreed that the protease inhibitor interaction system is the result of a co-evolution battle between plant and a wide diversity of attackers, leading ultimately to a diversification of proteolytic and inhibitory processes in the interacting organisms (Martinez and Diaz 2008). Therefore, wider research could identify PIs with novel properties, enhancing the potential applications in crop protection and biomedicine. Passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) is a tropical crop plant that grows practically all over Brazil, being its production largely destined to juice industry (based on its distinctive/exotic scent) and expanding to overseas markets (Oliveira et al. 2012). Owing the importance of non-model organisms to help uncover general patterns of natural variations and adaptation, the aim of this work was to gain a better understanding of passion fruit defensive mechanisms. The relevance of our findings to the possible physiological function including the emerging “plant intelligence” concept as well as biotechnological application was discussed.

Materials and methods

Plant material and trypsin inhibitors purification

Passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) was acquired at the local market and seeds were collected, dried at room temperature and stored at 4 °C in the dark. Plants were grown in peat pots and maintained in environmental chambers

for 17 h under $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light at 28°C and for 7 h in the dark at 18°C . MeJa exposed leaves (96 h) were obtained basically as described before as well as the PIs-enriched fraction via chromatography through a Sephadex G-100 column (Botelho-Júnior et al. 2008). The resulting proteins were then subjected to reversed-phase HPLC on a C18 column (Vydac) previously equilibrated with 10 mM potassium phosphate pH 6.0 (solvent A), followed by a 60-min linear gradient from 0 to 100 % (v/v) of solvent B (50 % acetonitrile in 10 mM potassium phosphate pH 6.0). Eluted proteins were detected by monitoring absorbance at 280 nm. Peaks were collected and the volume reduced by vacuum centrifugation. The proteins recovered were rechromatographed on a C18 column, essentially as described below. The two solvents used were 0.1 % (v/v) TFA in water (solvent A) and 80 % (v/v) acetonitrile in water (solvent B). During elution, we used a linear gradient, in which the solvent composition changed from 0 to 100 % B (v/v) in 80 min. The eluent was monitored at 280 nm, and the active fractions were collected and lyophilized.

Protein quantification

Protein concentration was determined using the Bradford assay kit (BioRad) and bovine serum albumin (BS) as standard protein according to the manufacturer's instructions.

Proteinase inhibitor assays

The inhibition of trypsin was determined by measuring the residual enzymatic activity toward the substrate BANE (*N*-benzoyl-DL-arginyl-*p*-nitroanilide, Sigma) after contact with purified inhibitors. Different concentrations of inhibitors were pre-incubated for 5 min at 37°C with $0.5 \mu\text{g}$ of trypsin prior to substrate addition (20 mM) in 50 mM Tris-HCl buffer, CaCl_2 20 mM, pH 8.0, for 30 min at 37°C in a 200 μL final volume. The reaction was interrupted by adding 100 μL of 30 % acetic acid (v/v). Substrate hydrolysis was followed by measuring the absorbance of released *p*-nitroaniline at 405 nm. Assay of chymotrypsin inhibitory activity as described previously (Xu et al. 2004), in which chymotrypsin inhibitory activity was estimated by the remaining esterolytic activity of bovine chymotrypsin using *N*-benzoyl tyrosine ethyl ester (BTEE, Sigma) as a substrate. A final volume of 1.0 mL mixture containing inhibitors with 50 μL of bovine chymotrypsin (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 1 mM HCl, Sigma) and assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 20 mM CaCl_2) was pre-incubated for 3 min at room temperature in a quartz cuvette. The reaction was initiated by adding 0.5 mL of substrate (2 mM BTEE in 50 % [w/w] methanol) to the pre-incubated mixture. The resulting absorbance was read at 256 nm for 3 min. In

the standard reaction, 50 μL of bovine chymotrypsin was used for analysis in the absence of the inhibitors. Measurements of inhibition activity of purified inhibitors against papain were performed using BANA (*N*-benzoyl-L-arginine-2-naphthylamide, Sigma), following the procedure described by Abe et al. (1994). In all experiments, papain (0.4 μg) was used and inhibitory activity was detected as a drop in BANA hydrolyzing activity of papain. The resulting absorbance was read at 540 nm. All PI activity assays were done in triplicate. The PI concentrations required to inhibit 50 % of proteinase activity were calculated from the linear portion of the plot of residual proteinase activity.

Protein sequencing

N-terminal sequences were determined on a Shimadzu PPSQ-33A automated protein sequencer using Edman degradation. Phenylthiohydantoin amino acids (PTH-AA) were detected at 269 nm after separation on a reversed-phase C18 Wakopak Wakosil HPLC column (4.6 mm \times 25 cm) from Shimadzu, under isocratic conditions, using $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (40:60, v/v) containing 20 mM acetic acid and 0.014 % sodium dodecyl sulfate as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min at 40°C . Sequences obtained were utilized for protein blast searches using the NCBI system as follows: an initial blast using only the obtained amino acid sequence and a second blast using also the word "trypsin inhibitor" as an entrez query.

Polyacrylamide gel electrophoresis

Native-PAGE (10 %) and SDS-PAGE (12.5 %) of proteins were carried out according to Laemmli (1970). The proteins were detected by staining with 0.1 % Coomassie brilliant blue R-250. The molecular mass of purified inhibitors was calculated by SDS-PAGE analysis, using commercial molecular weight (MW) standards from GE Healthcare, UK, according to the manufacturer's instructions.

In gel trypsin inhibitory assay

The *in gel* trypsin inhibitory assay was performed based on the methodology described by Felicioli et al. (1997). Protein samples were separated by Native-PAGE and SDS-PAGE under semi-denaturing condition with gels containing 0.5 % gelatin. Experiments using purified inhibitors were performed with gels purchased from BioRad (zymogram) with 0.1 % of gelatin. For analysis under semi-denaturing condition, after electrophoresis, the gel was washed to remove SDS with 2.5 % Triton X-100 in 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0). The gel was incubated at 37°C in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.0 with 20 mM CaCl_2 containing trypsin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1 h. The occurrence of dark blue bands

against a clear background after staining with Coomassie brilliant blue R-250 indicates the presence of TIs.

Effects of purified PfKTIs against proteases of *Diatraea saccharalis*

The assay was performed as described before (Botelho-Júnior et al. 2008). Insects were obtained from Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campos dos Goytacazes, Brazil. Fourth-instar larvae of sugarcane borer (*D. saccharalis*) of the Crambidae family were cold-immobilized, and midgut contents were removed in cold 150 mM NaCl. The midguts were subsequently homogenized in 150 mM NaCl, centrifuged at 12,000g for 10 min, and supernatants cooled. The effect of different concentrations of purified inhibitors on the proteolytic activity of whole midgut extracts was measured using BApNA (20 mM) as substrate. The assays were run at pH 8.0 in 50 mM Tris-HCl. The purified inhibitors were incubated with aliquots of midgut extracts at 37 °C for 5 min prior to substrate addition. After 30 min of incubation, the reaction was stopped by adding 30 % acid acetic (v/v). The resulting absorbance was read at 405 nm.

Effects of PfKTIs enriched fraction on larval survivorship and development of *Diatraea saccharalis*

Effect of semi-purified KTIs on sugarcane borer, *D. saccharalis* development was evaluated using an artificial diet formulated at Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campos dos Goytacazes, Brazil. Specific amounts of KTIs enriched fraction were incorporated into artificial diet. Control ones were without inhibitors enriched fraction or fraction heated at 100 °C by 1 h. For the bioassay, neonate *D. saccharalis* ($n = 10$) kept at 25 °C were placed in petri plates (8.5 cm long \times 2.5 cm in diameter) containing the artificial diets, larval weights were recorded 15 days later (by the time larvae have reached the third-instar stage).

Effects of purified PfKTIs against proteases of *Aedes aegypti*

Third-instar larvae of *A. aegypti*, an insect of the Culicidae family, were obtained from colonies kept in an insectary at Laboratório de Biotecnologia (UENF). Larvae were cold-immobilized and midgut contents were removed in cold 150 mM NaCl. The midguts were subsequently homogenized in 150 mM NaCl, centrifuged at 12,000g for 10 min, and supernatants cooled. The effect of purified inhibitors on the proteolytic activity of whole midgut extracts was measured using BApNA (20 mM) as substrate following the procedure described by Lemos et al. (1996). The assays were run at pH 8.0 in 50 mM Tris-HCl. The purified inhibitors

(1 μ g) were incubated with aliquots of midgut extracts at 37 °C for 5 min prior to substrate addition. After 30 min of incubation, the reaction was stopped by adding 30 % acid acetic (v/v). The resulting absorbance was read at 405 nm. Assays performed with adults (5 day old mosquitoes) were as follows: females previously fed with blood for 24 h, had their midgut dissected and the content extracted as described above as well as the proteolytic inhibitory assay.

Effects of purified PfKTIs against proteases of *Callosobruchus maculatus*

Cowpea weevil (*C. maculatus* of the Chrysomelidae family) was obtained from a colony maintained at Laboratório de Química de Função de Proteínas e Peptídeos (UENF). Insects were kept in a B.O.D incubator (Biochemical Oxygen Demand incubator), reared on *Vigna unguiculata* (host seeds) in glass flasks at 28 °C and 60–80 % relative humidity. Midguts were dissected from third-instar larvae, homogenized in water, centrifuged at 12,000g for 10 min at 4 °C, and the supernatant was recovered as a crude extract. Measurements of the inhibitory activity of purified inhibitors (20 and 40 μ g) against midgut homogenates were performed using *N*-benzoyl-L-arginine-2-naphthylamide (BANA, Sigma) following the procedure described by Abe et al. (1994). Inhibitory activity was detected as a reduction of BANA hydrolyzing activity of digestive proteolytic enzymes. The resulting absorbance was read at 540 nm.

Statistical analysis

Analyses of variance (ANOVA) (Sokal and Rohlf 2011) were used to examine whether there were significant differences among treatment means, and all pairwise comparisons were performed by the Tukey Honestly Significance (HSD) test. Data from three independent experiments were utilized for each statistical analysis. For each ANOVA model fitted, the assumptions of Normality and homoscedasticity were visually assessed via diagnostic plots of residuals and fitted values. With regard to larval weight gain, due to the high degree of individual variability, logarithmic transformation of the raw data was required to meet the ANOVA assumptions. For all other ANOVAs, the residuals were visually homoscedastic and compatible with a normal distribution.

Results

Purification of MeJa-inducible PfKTIs, partial amino acid sequencing and isoforms identification

PIs characterization is an active research area specially stimulated by their regulatory role in proteolysis-dependent

cellular processes and contributions for biotechnological advances. Previously, we described a high induction (~eightfold background levels) of KTI in passion fruit leaves in response to 48 h of MeJa exposure and in a lesser extent by herbivory and mechanical wounding (Botelho-Júnior et al. 2008). Expanding our studies, MeJa-inducible inhibitors were purified by sequential C₁₈ HPLC runs. Strategically, we verified if a longer MeJa exposure (96 h) would enhance inhibitors accumulation facilitating their purification. Gelatin-SDS-PAGE under semi-denaturing condition revealed a substantial increase in trypsin inhibitory activity when plants were treated under such condition (Supplementary Fig. S1). Therefore, 96 h-MeJa-treated plants were utilized for purification processes. Partially purified inhibitors were subjected to a C₁₈ HPLC and the elution profile is shown in Fig. 1a. The peaks 1–6 contained trypsin inhibitory activity (data not shown), while SDS-PAGE analysis revealed all of them as practically homogenous, except peak 5 displaying 2 closely migrating bands (Fig. 1a, inset).

To improve samples' homogeneity peaks 1, 2, 3, 4 and 6 were subjected to a second chromatographic round using a shallow gradient. Elution profile from each peak collected and respective single protein band by SDS-PAGE analysis are shown in Fig. 1b–f. The proteins detected in peak 5 (Fig. 1a, inset) were completely separated after a third chromatographic round as shown in Fig. 1g, h. The purified inhibitors were named as follows: PfKTI-1 (23 kDa), PfKTI-2 (25 kDa), PfKTI-3 (23 kDa), PfKTI-4 (22 kDa), PfKTI-5 (23 kDa), PfKTI-6 (20 kDa) and PfKTI-7 (22 kDa).

Each purified protein was subjected to partial N-terminal sequencing to confirm their relatedness with Kunitz inhibitor family and five of them exhibited homogenous sequence data (Table 1). As anticipated, the sequences presented homologies with KPIs from different sources. The sequences from inhibitors PfKTI-5 and PfKTI-6 matched previously described ones (Botelho-Júnior et al. 2008). However, a careful examination revealed that these sequences (Table 1) basically fit into the second half (bold) of two Kunitz motif versions confined to the N-terminus of the polypeptide: (i) (L,I,V,M)-X-D-(X₂)-G-(X₂)-(L, I, V, M)-(X₅)-Y-X-(L, I, V, M) (Major and Constabel 2008; Philippe et al. 2009); (ii) (L, I, V, M)-X-D-X-(E, D, N, T, Y)-(D,G)-(R, K, H, D, E, N, Q)-X-(L, I, V, M)-(X₅)-Y-X-(L, I, V, M) (Selvakumar et al. 2011).

Table 2 shows that inhibitors PfKTI-3 and PfKTI-4 feature heterogeneous N-terminal sequences. In spite of that, they also possessed truncated Kunitz motif and alternative amino acids were within semi-conserved and variable regions shared by both versions. Identification of alternative amino acids indicates the presence of co-migrating isoforms. Interestingly, Kunitz non-consensus residues (T and

P) were also observed for inhibitor PfKTI-4. The existence of isoforms for the remaining inhibitors (Table 1) could not be excluded, as has been described for other KPIs that partial N-terminal homogeneity does not imply absence of isoforms (Bhattacharyya et al. 2006).

To verify the occurrence of isoforms, we opted to use Gelatin-Native-PAGE (instead of isoelectric focusing) since this technique can discriminate isoforms as well as reveal their biological activity by means of *in gel* inhibition of trypsin activity. This technique was very effective studying crude leaf extracts (Supplementary Fig. S2). When purified inhibitors were analyzed, it was identified ~2–7 isoforms for each of them, regardless of possessing or not homogenous N-terminal sequences (Fig. 2).

Differential proteases inhibition by purified PfKTIs

Purified inhibitors were tested for their abilities to inhibit serine (trypsin and chymotrypsin) and cysteine (papain) proteases *in vitro*. Potent and commercially available serine (soybean Kunitz inhibitor [soyKTI]) and cysteine (egg cystatin [eggCys]) PIs were utilized for comparison.

Titration assays showed that each inhibitor exhibited strong inhibitory activity against trypsin as their activities were in a comparable range of that observed for soyKTI. In addition, the purified inhibitors presented considerable variation among their inhibitory abilities. For instance, PfKTI-2 and PfKTI-7 were most efficient when comparing with the others, while PfKTI-5 had a more intermediate activity (Fig. 3a). Similarly, inhibitory activity against chymotrypsin was also very effective and varied among inhibitors, excepting PfKTI-1, which was inactive in our assay conditions (Fig. 3b). Though uncommon, PfKTI-4 and PfKTI-7 also inhibit papain activity (Fig. 3c). The inhibitory activity of PfKTI-7 reached up to ~20 %, while PfKTI-4 displayed higher activity reaching up to ~53 % of inhibition in our assay conditions. Comparatively, these inhibitors were significantly less effective than eggCys. However, considering that Kunitz members are not natural inhibitors of cysteine proteases (as cystatins are), such biological feature turn them distinguished PIs. Furthermore, their activity against papain provides evidence of a recruitment process toward inhibition of another protease class.

To have a better picture of the inhibitors' diversity, IC₅₀ values for each enzyme were obtained. As shown in Table 3, interesting differences in their efficiency of inhibition were observed. For instance, PfKTI-2, PfKTI-4 and PfKTI-7 were more effective against trypsin, while PfKTI-3, PfKTI-5 and PfKTI-6 were stronger chymotrypsin inhibitors. On the other hand, PfKTI-1 was specific toward trypsin. Even though being recognized among most potent papain inhibitors, the IC₅₀ dose displayed by eggCys was slightly higher of 100-fold of that of PfKTI-4, emphasizing

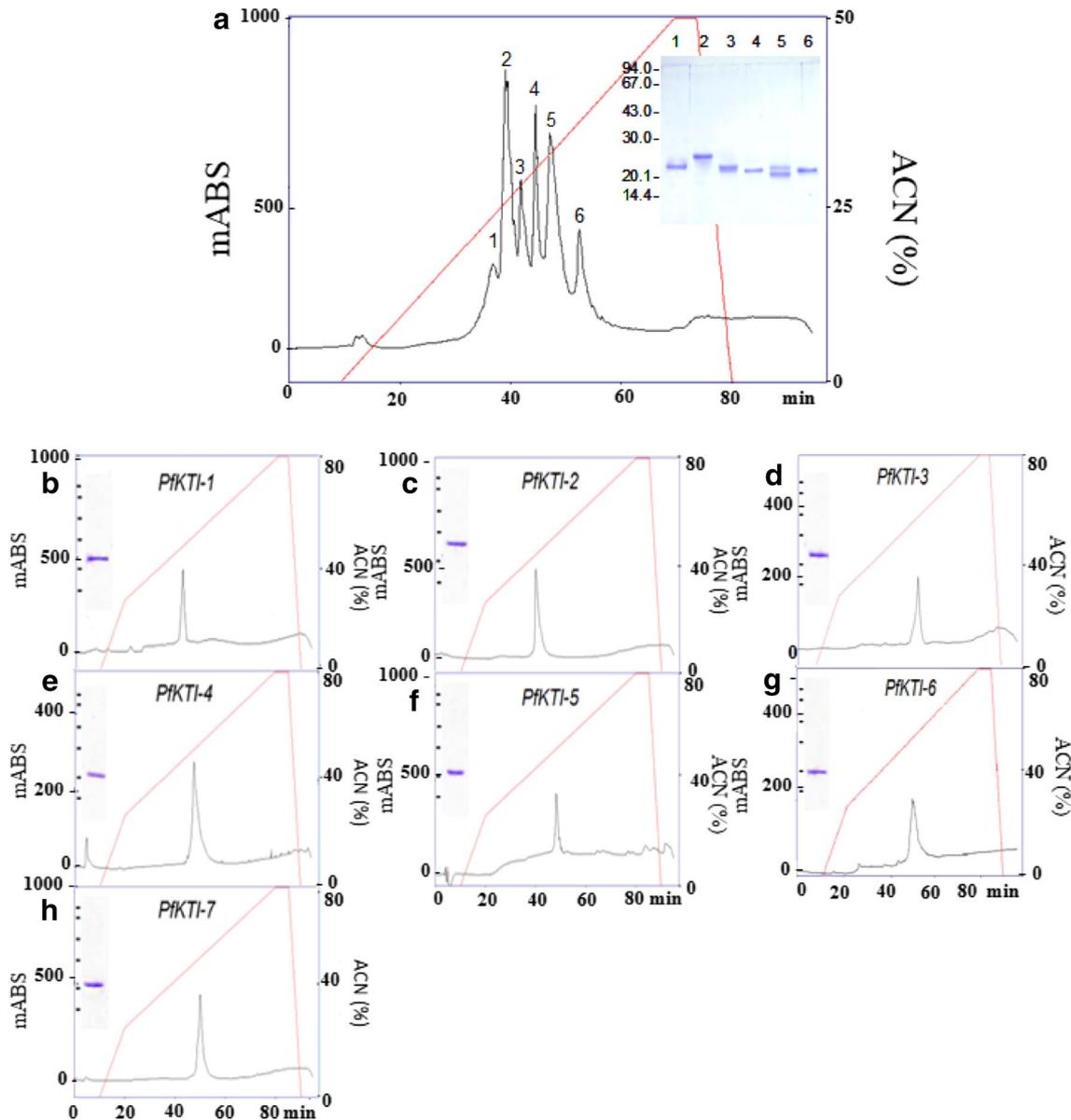


Fig. 1 **a** Elution profile of an enriched TI fraction subjected to C18 RP-HPLC. Proteins were eluted with a gradient of 0–50 % aqueous acetonitrile containing 10 mM potassium phosphate pH 6.0. The protein content from each peak (1–6) was evaluated by (12.5 %) SDS-PAGE (*inset*). Proteins obtained were rechromatographed by C18 RP-

HPLC. TFA (0.1 %) was used as an ionpairing agent and the diagonal line indicates the linear gradient of acetonitrile (0–80 %). The resulting SDS-PAGE profile from each purified inhibitor is shown in **b–h**. For all samples, 3 μ g of protein was loaded and gels stained with Coomassie brilliant blue R-250

the inhibitor's specificity against papain. Under this reasoning, the papain inhibitory activity exhibited by PfKTI-7 could not be ignored.

Effectiveness of PfKTIs on digestive enzymes of insects of agronomical and public health interest

Sugarcane borer (*D. saccharalis*) was chosen as a model lepidopteran pest due to its impact on sugarcane production and therefore affecting a renewed energy source (Brazil

uses extensively this crop for biofuel, Furtado et al. 2011). Besides, serine proteases play major digestive roles in lepidopteran insects (Srinivasan et al. 2006). Figure 4 shows that all inhibitors strongly inhibited larval midgut trypsin-like proteases, according to previously described results using PIs-enriched fraction (Botelho-Júnior et al. 2008). A bioassay was performed using partially purified PIs to investigate their effects *in vivo*. Statistical analysis based on ANOVA showed that larvae fed with both types of control diets (C and H) presented no statistical difference in

Table 1 Alignment of the N-terminal amino acid sequence of the purified PfKTI with Kunitz-type members from different sources

	Initial position	Sequence/homology	Access number	Ref.
PfKTI-1	1	SELRTGVPYYM		
PfKTI-2	1	ELRTYVPPYYL		
PfKTI-5	1	ELRTGVPYYL		
PfKTI-6	1	ELRTGVPYYL		
PfKTI-7	1	ELRTETPYM		
<i>Theobroma bicolor</i>	8	ELRTGVEYYV	AAL85661.1	Unpublished
<i>Herrania mariae</i>	8	ELRTGVQYYI	AAL85637.1	Unpublished
<i>Glycine soja</i>	10	PLENGGTYII		Wang et al., 2012
<i>Inga lawrina</i>	10	MLRNGGKYYL	AFG2855.1	Macedo et al., 2007
<i>Derris trifoliata</i>	10	QVRNGGTYLL		Bhattacharyya and Babu, 2009
<i>Adenanthera pavonina L</i>	9	FLRNGGSYYI		Migliolo et al., 2010
<i>Prosopis juliflora</i>	10	ILRNGGSYYI		Franco et al., 2002
		: . . **:		

Alignments were performed using the program CLUSTALW2. Asterisks represent identical amino acids while one and two points denote amino acids with weak and strong similarities, respectively

Table 2 N-terminal amino acid of the PfKTI-3 and PfKTI-4 showing the alternative amino acid residues

	Initial position	Sequence
PfKTI-3	1	SELPIIVPYM V TF
PfKTI-4	1	YLLITLPPYYL ETVI V VP E P G Y

The amino acids letters in italic denote Kunitz non-consensus residues

relation to their development (Fig. 5a). However, in comparison with control diets, a negative interference on larval weight gain was already statistically significant when diets contained 0.1 % of PIs-enriched fraction, while growth arrest was stronger when diets were supplemented with 0.5 % of PIs-enriched fraction (Fig. 5a). On the other hand, a statistically significant reduction on larval survival was only observed with diets containing 0.5 % of PIs-enriched fraction (Fig. 5b). Overall, these results indicate the inhibitors' anti-nutritional properties toward *D. saccharalis*, but the individual larval capacity to cope with such negative effects should be noted.

Seeking to verify if the bifunctional inhibitors (PfKTI-4 and PfKTI-7) could act on midgut cysteine proteases, we choose cowpea weevil (*C. maculatus*) as a coleopteran model since it inflicts serious post-harvest losses on legume grains. Unlike *D. saccharalis*, *C. maculatus* possesses cysteine proteases as their main digestive

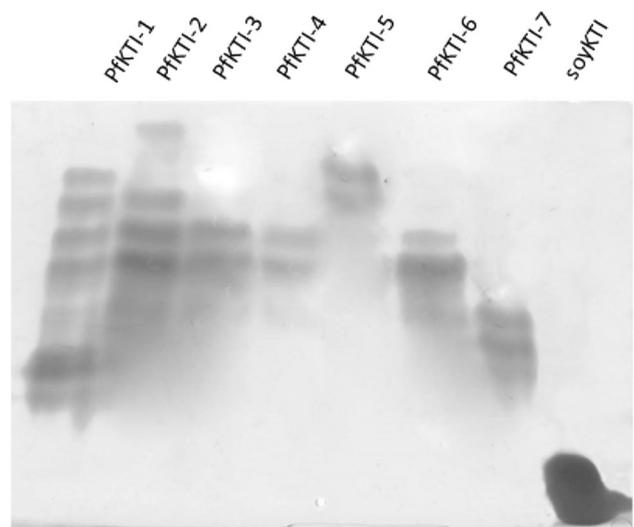


Fig. 2 Visualization of isoinhibitors of PfKTI on Gelatin-Native-PAGE (10 %). For each lane, 3 µg of inhibitors were loaded. The trypsin inhibitory activities are shown as dark bands in a clear staining background (see “Materials and methods”)

enzymes (Campos et al. 1989). For comparative parameters, PfKTI-2 was included in the analysis, as it lacks papain inhibitory activity and has lower IC₅₀ values for both trypsin and chymotrypsin (Table 3). As can be observed by ANOVA analysis, when 20 µg of inhibitors were employed PfKTI-4 showed a significant tendency to inhibit midgut enzymes, while the others were inactive (Fig. 6a). Increasing inhibitors concentration (40 µg) not only enhanced PfKTI-4' inhibitory capacity but also allowed the PfKTI-7's inhibitory ability to be statistically significant, while PfKTI-2 remained inactive in such conditions (Fig. 6b).

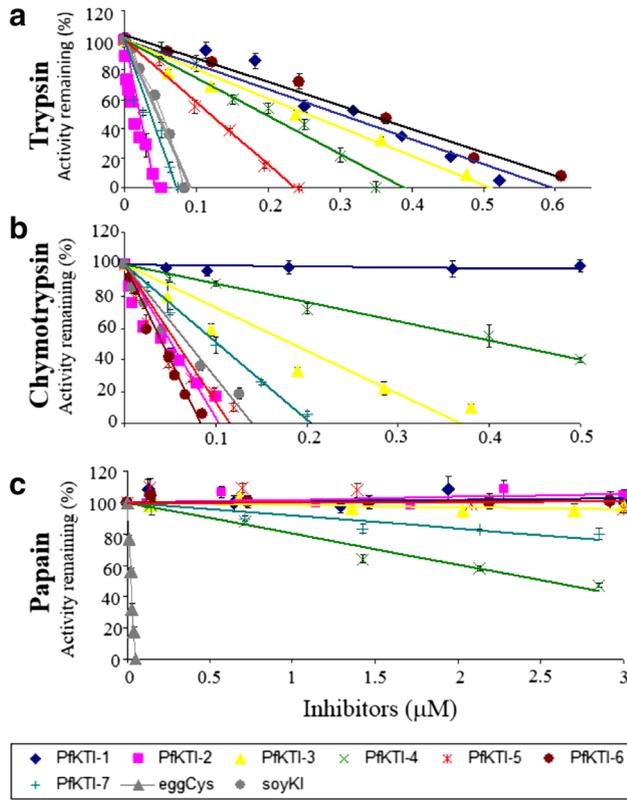


Fig. 3 Titration of trypsin (a), chymotrypsin (b), papain (c) by PfKTI-1 (◆), PfKTI-2 (■), PfKTI-3 (▲), PfKTI-4 (×), PfKTI-5 (⋈), PfKTI-6 (●) and PfKTI-7 (+). Commercial trypsin inhibitor (soyKI; ●) and papain inhibitor (eggCys; ▲) are shown for comparison. Each point is the average of three independent experiments (±SD). Linear regression is used to calculate the IC₅₀

Table 3 Summary of inhibitory activity (IC₅₀) of PfKTIs against different proteases

Inhibitor	Trypsin (μM)	Chymotrypsin (μM)	Papain (μM)
soyKTI	0.054	0.083	NA
eggCys	NA	NA	0.024
PfKTI-1	0.298	NA	NA
PfKTI-2	0.019	0.047	NA
PfKTI-3	0.254	0.184	NA
PfKTI-4	0.207	0.416	2.53
PfKTI-5	0.118	0.051	NA
PfKTI-6	0.336	0.041	NA
PfKTI-7	0.036	0.102	6.06

ICs were obtained from the linear portion of the plot of residual proteases activity against TI protein concentration (Fig. 3)

NA no activity

With the intention of increasing the inhibitors' biotechnological application, they were tested against midgut proteases from *A. aegypti*, as their digestive enzymes are

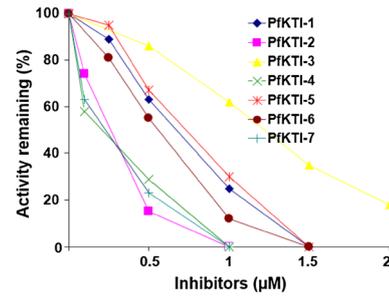


Fig. 4 In vitro inhibition of digestive trypsin-like activities from *D. saccharalis* with PfKTIs. Data are the mean of three independent experiments (±SD)

considered potential targets for vector control strategies (Soares et al. 2011). This mosquito is the vector of etiologic agents of yellow and dengue fevers, affecting tropical and subtropical areas predominantly in urban populations (World Health Organization 2009) and therefore, reaching millions of potential victims. Figure 7 shows that trypsin-like proteases from larval and adult midgut extracts were effectively suppressed by all purified inhibitors.

Discussion

Passion fruit's defense mechanisms remain poorly understood in comparison with model plants like *Arabidopsis* and tomato. Through biochemical approaches, seven native PfKTIs were purified from MeJa-treated leaves (Fig. 1b–h), which in turn revealed a large number of isoforms (Fig. 2). Such inhibitor numerousness combined with what had been found in flowers (Pereira et al. 2011) can be taken as an indicative of passion fruit genome carrying at least ~30 Kunitz-type genes. Our results (and assumptions) are in agreement with previous reports showing that KPIs are encoded by multigene families in different plant species such as potato (Heibges et al. 2003a), poplar (Major and Constabel 2008; Philippe et al. 2009) and *Arabidopsis thaliana* (Ma et al. 2011). Mosolov and Valueva (2005) emphasized that in plants PIs isoforms can be considered a rule instead of an exception. Based on molecular events influencing PIs' polymorphism (Christeller 2005), gene duplication followed by adaptive divergence is likely to be promoting expansion, and therefore, the elaborateness of KTIs in passion fruit. However, as recently reported by Speranskaya et al. (2012), recombination reactions might also be of high relevance for genetic variation within KPI genes. Therefore, further analysis focusing on gene structure will certainly help discover the nature of PfKTIs' diversity. Nevertheless, based on recent premises regarding plant behavior (Trewavas 2009), our results support the plant's capacity to assemble, in leaves, an exceptional collection of

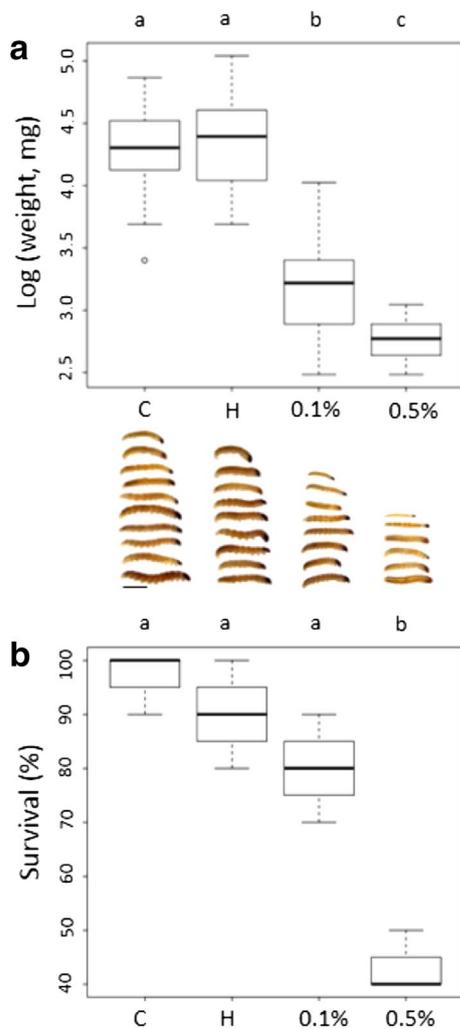


Fig. 5 **a** In vivo assays to evaluate weight gain of *D. saccharalis* larvae fed on artificial diets. C, diet without PIs-enriched fraction; H, diet containing 0.5 % of PIs-enriched fraction heated at 100 °C for 60 min; 0.1 %, diet containing 0.1 % of PIs-enriched fraction; 0.5 %, diet containing 0.5 % of PIs-enriched fraction. **b** In vivo assays to evaluate the survival of *D. saccharalis* larvae fed on artificial diets. C, H, 0.1 and 0.5 % as described above. Box and whisker diagrams show the distribution of quartiles for each treatment. The box superior and inferior limits correspond to the upper and lower quartiles, respectively. The thick horizontal line corresponds to the median, and the whisker limits correspond to extreme values (either the minimum and maximum or 1.5 times the interquartile range). Letters above the boxes indicate groups of treatments with indistinguishable statistical effects (Tukey HSD test, $P > 0.05$). Bar 0.5 cm

KTIs that could be intelligently assessed to counter predators attack.

The MeJa-inducible PFKTIs described in this work (Tables 1, 2) and five others constitutively accumulated in flower tissue (Pereira et al. 2011) bear truncated Kunitz motif at their N-terminal regions. Supported by KPIs possessing the entire motif that were purified by similar

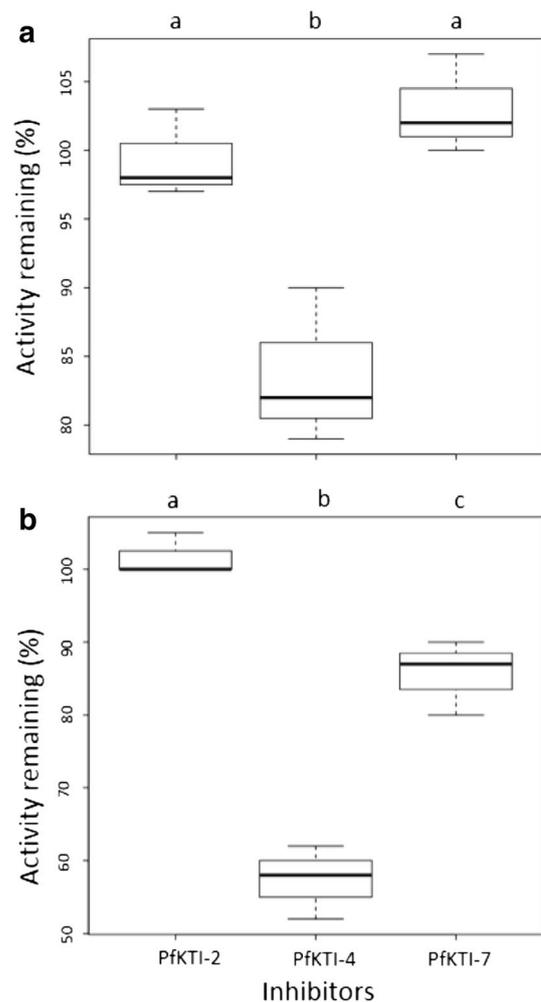


Fig. 6 In vitro inhibition of digestive papain-like activities from *C. maculatus* with PFKTI-2, PFKTI-4 and PFKTI-7. **a** 20 µg of tested inhibitors were used. **b** 40 µg of tested inhibitors were used. The graphical and statistical parameters as were described at Fig. 5a, b

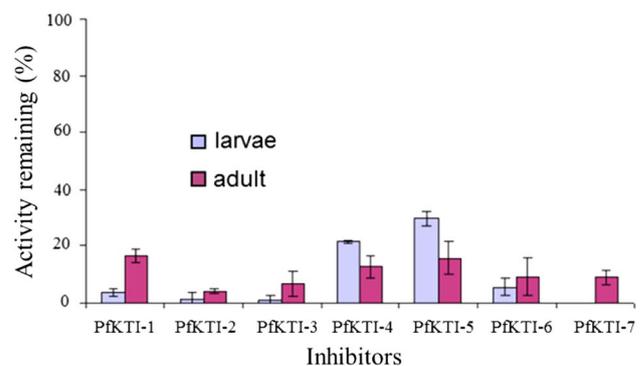


Fig. 7 In vitro inhibition of digestive trypsin-like activities from *A. aegypti* with purified PFKTIs. The experiments were made using constant amount of each inhibitor, 1 µg. Data are the mean of three independent experiments (\pm SD)

strategies (Walsh and Twitchell 1991; Bhattacharyya and Babu 2009) as well as the reproducibility of our sequence data, it is unlikely that these truncated sequences resulted from partial digestion throughout the purification course. The occurrence of Kunitz non-consensus residues, as observed for PfKTI-4 (Table 2), was also reported for other plant species (Goodwin et al. 2012; Patil et al. 2012). As suggested by Goodwin et al. (2012), a Kunitz motif particularization may become necessary for a given plant family. In addition, alteration of the “classical” Kunitz signature might be implicated in plasticity toward targeted enzymes (Patil et al. 2012). Concerning our examples (Tables 1, 2), further experiments are necessary to clarify the fate of the missing motif portion, as a possibility it could have been lost during molecular diversification. In fact, a more radical pattern of molecular evolution might have happened with a PI from *Putranjiva roxburghii* seeds, since its partial N-terminal sequence lacks homology with serine PIs and based on internal sequences, it was tentatively classified as a Kunitz member (Chaudhary et al. 2008).

Most KTIs from this work were strong trypsin and chymotrypsin inhibitors (Fig. 3a, b) in accordance with literature data. However, in contrast, considerably less is known about Kunitz-type trypsin–papain inhibitors and data comes basically from PIs accumulated in legume seeds and potato tubers. Biochemical characterization showed a variable activity toward both targeted enzymes. The inhibitors from *Adenantha pavonina* seeds (Migliolo et al. 2010) and potato tubers (Heibges et al. 2003b) were more effective against trypsin than papain. Likewise, PfKTI-4 and PfKTI-7 possessed higher trypsin inhibitory activity (Fig. 3a, c). On the other hand, the dual inhibitor from *Prosopis juliflora* seeds was a predominant papain inhibitor (Franco et al. 2002).

Literature examples of Kunitz-type trypsin–papain inhibitors mentioned above were equally correlated with defensive roles and presumably stored in these tissues/organs through perception of developmental signals. To the best of our knowledge, the bifunctional inhibitors from this work are the only examples described as accumulating in leaf tissue in response to a phyto-hormone involved in biotic stress (or by any other stimuli), and hence, linking their responsiveness to environmental cues. Moreover, as the production of defensive compounds is an energy-demanding task, the synthesis of bifunctional PIs could be a way to optimize the plant’s defense output. From the defensive point of view, production of trypsin/chymotrypsin–papain inhibitors in passion fruit can have clear advantages as serine and cysteine proteases have important functions in digestive systems of lepidopteran and coleopteran pest insects, respectively.

In plants, as in other organisms, the recruitment of PIs with the purpose of changing inhibitory classes of target

proteases is well substantiated as being part of an ongoing evolutionary “arms race” between host and predators (Christeller 2005). In this study, we identified 2 recruitment processes that could be seen occurring in different evolutionary stages (Figs. 3c, 6a, b). PfKTI-4 appears to be in a longer process allowing a better adaptation to its inhibitory capacity toward cysteine proteases for example, to overcome high herbivore pressures. In line with our thoughts, PfKTI-7 seems to be developing its efficacy for the new target during a shorter period. Over the course of evolution, these dual inhibitors may lose their original function, becoming highly active against cysteine proteases. The potato cysteine PI variant of pI 8.3 illustrates a “concluded” recruitment process. Albeit being specific toward cysteine proteases, its primary sequence reveals the ancestral Kunitz scaffold (Krizaj et al. 1993). Another example of neo-functionalization is the squash aspartic acid PI but in this case, evolved from an ancient cystatin (Heady et al. 2010). Additional studies are needed to uncover the evolutionary mechanisms driving the processes of neo-functionalization observed for PfKTI-4 and PfKTI-7.

Direct defensive role of KPIs has been mainly inferred by inhibition of digestive proteases from pest insects and/or retardation of larval growth/development through artificial diet (Major and Constabel 2008; Ramos et al. 2012). In agreement, MeJa-inducible PfKTI-4 had their insecticide potential demonstrated by in vitro and in vivo assays (Figs. 4, 5a, b). These results are consistent with all inhibitors being actively enrolled with herbivore defense and therefore making part of passion fruit’s “inducible-arsenal” against predation. This scenario aggregated with massive accumulation of KTIs during all stages of bud development as well as in all parts of flower in anthesis (Pereira et al. 2011) highlights the relevance of Kunitz inhibitor members for passion fruit’s defense strategies. Recently, Cutri and Dornelas (2012) described the PASSIOMA database, consisting of *Passiflora* floral ESTs, where the majority of transcripts represented stress-related proteins. Thus, this database could be useful to understand the KPIs’ complexity in passion fruit.

Considering agribusiness benefits, our results (Fig. 4) demonstrate the attractiveness of each inhibitor as candidates for transgenic studies to enhance resistance to biotic stresses in crop plants. The prospective of insect’s individual ability to surmount PIs’ deterrent effects (Fig. 5a, b), which can ultimately, lead to resistance in further generations may be impaired producing transgenic crops co-expressing defensive molecule acting by distinct way. Alternatively (but not exclusively), a not related strategy could be combined i.e., biological control employing *D. saccharalis* natural enemies (White et al. 2012).

Moreover, it was shown that plant’s PIs may offer other options for vector control-oriented research, as the

inhibitors described in the present study were highly active toward midgut proteases from *Aedes aegypti* (Fig. 7). Possibilities for progress in this field are particularly appealing to combat dengue fever, as no effective vaccines are available (World Health Organization 2009) and, therefore, prevention programs rely essentially on organophosphorous insecticides to avoid dengue endemic situations. The super-expression of individual PfKPIs will certainly facilitate a broad spectrum analysis toward their biochemical properties and biotechnological applications.

Conclusions

The PfKTI's distinct biochemical properties imply functional specialization of different members. This functional polymorphism probably brings an extra advantage to passion fruit to deal with predators' diversity. In natural environments, it would be reasonable to induce a context-appropriate cocktail of components according to the enemy(ies) profile, to maximize passion fruit's defensive response at the lowest energy cost. However, as an alternative strategy, the accumulation of a whole set of KTIs could reduce the chance of a specific aggressor developing resistance. In summary, the PfKTI's multiplicity might be of great usefulness to molecular mechanisms allowing plants to choose the best spatial and temporal expression pattern of different KTIs member(s) in response to discriminative stimulus during their life span.

Acknowledgments The research was supported by Brazilian agencies Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant no. 471848/2012-3) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, grant no. E-26/110.942/2013). S.B.J. was recipient of a PhD fellowship from Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) and V.A.P. was recipient of a PhD fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). We thank Dr. Turán Peter Ūrmenyi, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) for critical reading of this manuscript.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

Abe M, Abe K, Iwabuchi K, Domoto C, Arai S (1994) Corn cystatin I expressed in *Escherichia coli*: investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels. *J Biochem* 116:488–492

Azarkan M, Martinez-Rodriguez S, Buts L, Baeyens-Volant D, Garcia-Pino A (2011) The plasticity of the trefoil fold constitutes an evolutionary platform for protease inhibition. *J Biol Chem* 286:43726–43734

Bhattacharyya A, Babu CR (2009) Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from *Derris trifoliata* Lour. seeds: insight into structural and antimalarial features. *Phytochemistry* 70:703–712

Bhattacharyya A, Mazumdar S, Leighton SM, Babu CR (2006) A Kunitz proteinase inhibitor from *Archidendron ellipticum* seeds: purification, characterization, and kinetic properties. *Phytochemistry* 67:232–241

Botelho-Júnior S, Siqueira-Júnior CL, Jardim BC, Machado OLT, Neves-Ferreira AGC, Perales J, Jacinto T (2008) Trypsin inhibitors in passion fruit (*Passiflora f. edulis flavicarpa*) leaves: accumulation in response to methyl jasmonate, mechanical wounding, and herbivory. *J Agric Food Chem* 56:9404–9409

Campos FAP, Xavier-Filho J, Silva CP, Ary MB (1989) Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.). *Comp Biochem Physiol* 92B:51–57

Carrillo L, Martinez M, Ramessar K, Cambra I, Castañera P, Ortego F, Diaz I (2011) Expression of a barley cystatin gene in maize enhances resistance against phytophagous mites by altering their cysteine-proteases. *Plant Cell Rep* 30:101–112

Chandrasekaran V, Lee CJ, Lin P, Duke RE, Pedersen LG (2009) A computational modeling and molecular dynamics study of the Michaelis complex of human protein Z-dependent protease inhibitor (ZPI) and factor Xa (FXa). *J Mol Model* 15:897–911

Chaudhary NS, Shee C, Islam A, Ahmad F, Yernool D, Kumar P, Sharma AK (2008) Purification and characterization of a trypsin inhibitor from *Putranjiva roxburghii* seeds. *Phytochemistry* 69:2120–2126

Christeller JT (2005) Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability. *FEBS J* 272:5710–5722

Cutri L, Dornelas MC (2012) PASSIOMA: exploring expressed sequence tags during flower development in *Passiflora* spp. *Comp Funct Genomics* 2012:1–11

De Leo F, Volpicella M, Licciulli F, Liuni S, Gallerani R, Ceci LR (2002) PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucleic Acids Res* 30:347–348

Felicioli R, Garzelli B, Vaccari L, Melfi D, Balestreri E (1997) Activity staining of protein inhibitors of proteases on gelatin containing polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 244:176–178

Franco OL, Sá MFG, Sales MP, Mello LV, Oliveira AS, Rigden DJ (2002) Overlapping binding sites for trypsin and papain on a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Prosopis juliflora*. *Proteins* 49:335–341

Furtado AT, Scandiffio MIG, Cortez LAB (2011) The Brazilian sugarcane innovation system. *Energy Policy* 39:156–166

Gáspári Z, Várnai P, Szappanos B, Perczel A (2010) Reconciling the lock-and-key and dynamic views of canonical serine protease inhibitor action. *FEBS Lett* 584:203–206

Goodwin PH, Xie W, Valliani M (2012) Three genes of miraculin-like proteins from *Nicotiana benthamiana* with dissimilar putative structures show highly similar patterns of induction following bacterial and fungal infections. *Eur J Plant Pathol* 134:795–810

Heady AJ, MacAskill UK, Wright MA, Claridge JK, Edwards PJB, Farley PC, Christeller JT, Laing WA, Pascal SM (2010) Solution structure of the squash aspartic acid proteinase inhibitor (SQAPI) and mutational analysis of pepsin inhibition. *J Biol Chem* 285:27019–27025

Heibges A, Glaczinski H, Ballvora A, Salamini F, Gebhardt C (2003a) Structural diversity and organization of three gene families for Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Mol Genet Genomics* 269:526–534

Heibges A, Salamini F, Gebhardt C (2003b) Functional comparison of homologous members of three groups of Kunitz-type enzyme inhibitors from potato tubers (*Solanum tuberosum* L.). *Mol Genet Genomics* 269:535–541

Howe GA, Jander G (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annu Rev Plant Biol* 59:41–66

- Jiménez-Durán K, McClure B, García-Campusano F, Rodríguez-Sotres R, Cisneros J, Busot G, Cruz-García F (2013) NaStEP: a proteinase inhibitor essential to self-incompatibility and a positive regulator of HT-B stability in *Nicotiana alata* pollen tubes. *Plant Physiol* 161:97–107
- Krizaj I, Drobnic-KoSorok M, Brzin J, Jerala R, Turk V (1993) The primary structure of inhibitor of cysteine proteinases from potato. *FEBS Lett* 333:15–20
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Laskowski M, Qasim MA (2000) What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme-substrate complexes? *Biochim Biophys Acta* 1477:324–337
- Lemos FJA, Cornel AJ, Jacobs-Lorena M (1996) Trypsin and aminopeptidase gene expression is affected by age and food composition in *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Mol Biol* 26:651–658
- Ma Y, Zhao Q, Lu M, Wang J (2011) Kunitz-type trypsin inhibitor gene family in *Arabidopsis* and *Populus trichocarpa* and its expression response to wounding and herbivore in *Populus nigra*. *Tree Genet Genomes* 7:431–441
- Macedo ML, Garcia VA, Freire MG, Richardson M (2007) Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfite bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Wild. *Phytochemistry* 68:1104–1111
- Major IT, Constabel CP (2008) Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores. *Plant Physiol* 146:888–903
- Martinez M, Diaz I (2008) The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. *BMC Evol Biol* 8:198
- Migliolo L, Oliveira AS, Santos EA, Franco OL, Sales MP (2010) Structural and mechanistic insights into a novel non-competitive Kunitz trypsin inhibitor from *Adenanthera pavonina* L. seeds with double activity toward serine and cysteine-proteinases. *J Mol Graph Model* 29:148–156
- Mosolov VV, Valueva TA (2005) Proteinase inhibitors and their function in plants: a review. *Appl Biochem Microbiol* 41:227–246
- Muricken DG, Gowda LR (2011) Molecular engineering of a small trypsin inhibitor based on the binding loop of horsegram seed Bowman-Birk inhibitor. *J Enzyme Inhib Med Chem* 26:553–560
- Neuteboom LW, Matsumoto KO, Christopher DA (2009) An extended AE-rich N-terminal trunk in secreted pineapple cystatin enhances inhibition of fruit bromelain and is post translationally removed during ripening. *Plant Physiol* 151:515–527
- Oliva ML, Silva MC, Sallai RC, Brito MV, Sampaio MU (2010) A novel subclassification for Kunitz proteinase inhibitors from leguminous seeds. *Biochimie* 92:1667–1673
- Oliveira RC, Docê RC, Barros STD (2012) Clarification of passion fruit juice by microfiltration: analyses of operating parameters, study of membrane fouling and juice quality. *J Food Eng* 111:432–439
- Otlewski J, Jelen F, Zakrzewska M, Oleksy A (2005) The many faces of protease-protein inhibitor interaction. *EMBO J* 24:1303–1310
- Patil DN, Chaudhary A, Sharma AK, Tomar S, Kumar P (2012) Structural basis for dual inhibitory role of tamarind Kunitz inhibitor (TKI) against factor Xa and trypsin. *FEBS J* 279:4547–4564
- Pereira KRB, Botelho-Júnior S, Domingues DP, Machado OLT, Oliveira AEA, Fernandes KVS, Madureira HC, Pereira TNS, Jacinto T (2011) Passion fruit flowers: kunitz trypsin inhibitors and cystatin differentially accumulate in developing buds and floral tissues. *Phytochemistry* 72:1955–1961
- Philippe RN, Ralph SG, Kulheym C, Jancsik SI, Bohlmann J (2009) Poplar defense against insects: genome analysis, full-length cDNA cloning, and transcriptome and protein analysis of the poplar Kunitz-type protease inhibitor family. *New Phytol* 184:865–884
- Ramos VS, Cabrera OG, Camargo ELO, Ambrósio AB, Vidal RO, Silva DS, Guimarães LC, Marangoni SM, Parra JRP, Pereira GAG, Macedo MLR (2012) Molecular cloning and insecticidal effect of *Inga laurina* trypsin inhibitor on *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 156:148–158
- Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 42:D503–D509
- Ritonja A, Krizaj I, Mesko P, Kopitar M, Lucovnik P, Strukelj B, Pungercar J, Buttle DJ, Barrett AJ, Turk V (1990) The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. *FEBS Lett* 267:13–15
- Ryan CA (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu Rev Phytopathol* 28:425–449
- Selvakumar P, Gahlath D, Tomar PPS, Sharma N, Kumar Sharma AK (2011) Molecular evolution of miraculin-like proteins in soybean Kunitz super-family. *J Mol Evol* 73:369–379
- Soares TS, Watanabe RMO, Lemos FJA, Tanaka AS (2011) Molecular characterization of genes encoding trypsin-like enzymes from *Aedes aegypti* larvae and identification of digestive enzymes. *Gene* 489:70–75
- Sokal RR, Rohlf FJ (2011) *Biometry*, 4th edn. W.H. Freeman & Co, New York
- Speranskaya AS, Krinitsina AA, Kudryavtseva AV, Poltronieri P, Santino A, Oparina NY, Dmitriev AA, Belenikin MS, Guseva MA, Shevelev AB (2012) Impact of recombination on polymorphism of genes encoding Kunitz-type protease inhibitors in the genus *Solanum*. *Biochimie* 94:1687–1696
- Srinivasan A, Giri AP, Gupta VS (2006) Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. *Cell Mol Biol Lett* 11:132–154
- Srinivasan T, Kumar KRR, Kirti PB (2009) Constitutive expression of a trypsin protease inhibitor confers multiple stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol* 5:541–553
- Trewavas A (2009) What is plant behavior? *Plant Cell Environ* 32:606–616
- Walsh TA, Twitchell WP (1991) Two Kunitz-type proteinase inhibitors from potato tubers. *Plant Physiol* 97:15–18
- Wang KJ, Takahata Y, Kono Y, Kaizuma N (2008) Allelic differentiation of Kunitz trypsin inhibitor in wild soybean (*Glycine soja*). *Theor Appl Genet* 117:565–573
- Wang L, Zhao F, Lil M, Zhang H, Gao Y, Cao P, Pan X, Wang Z, Chang W (2011) Conformational changes of rBTI from buckwheat upon binding to trypsin: implications for the role of the P89 residue in the potato inhibitor I family. *PLoS One* 6:1–7
- Wang KJ, Li XH, Yamashita T, Takahata Y (2012) Single nucleotide mutation leading to an amino acid substitution in the variant Tik soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) identified in Chinese wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.). *Plant Syst Evol* 298:1–7
- White WH, Erwin TL, Viator BJ (2012) *Leptotrachelus dorsalis* (coleoptera: carabidae): a candidate biological control agent of the sugarcane borer in Louisiana. *Fla Entomol* 95:261–267
- World Health Organization (2009) Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Fact Sheet* 117
- Wu WM, Li HB, Navaneetham D, Reichenbach ZW, Tuma RF, Walsh PN (2012) The Kunitz protease inhibitor domain of protease nexin-2 inhibits factor XIa and murine carotid artery and middle cerebral artery thrombosis. *Blood* 120:671–677
- Xu Z, Teng W, Chye M (2004) Inhibition of endogenous trypsin- and chymotrypsin-like activities in transgenic lettuce expressing heterogeneous proteinase inhibitor SaPIN2a. *Planta* 218:623–629