

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

LARISSA COSTA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UM INIBIDOR DE
TRIPSINA PRESENTE NA LARVA DO INSETO *Tribolium castaneum***

MACEIÓ- AL

2021

LARISSA COSTA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UM INIBIDOR DE
TRIPSINA PRESENTE NA LARVA DO INSETO *Tribolium castaneum***

Trabalho de Conclusão de Curso, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia pela Universidade Federal de Alagoas.

Orientador: Prof.º Dr.º Luciano Aparecido Meireles Grillo

MACEIÓ- AL

2021

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237a Santos, Larissa Costa.
Avaliação da atividade e purificação parcial de um inibidor de tripsina presente na larva do inseto *Tribolium castaneum* / Larissa Costa Santos. – 2021.
56 f. : il. color.

Orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2020.

Bibliografia: f. 51-56.


1. Inibidores de tripsina. 2. *Tribolium castaneum*. 3. Ultrafiltração. I. Título.

CDU: 66.097.8

LARISSA COSTA SANTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE UM INIBIDOR DE TRIPSINA PRESENTE NA LARVA DO INSETO *Tribolium castaneum*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à banca avaliadora da Universidade Federal de Alagoas e aprovado no dia 04 de Fevereiro de 2021.


Prof. Dr. Luciano Aparecido M. Grillo
Coordenador PPGCF / UFAL
SIAPE 1853558

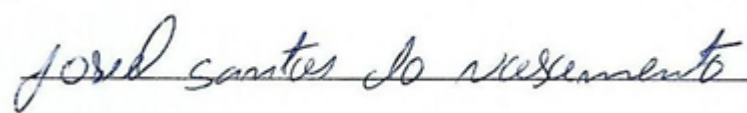
Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo
Coordenador do PPGCF/UFAL

Professor Doutor Luciano Aparecido Meireles Grillo (ICF/UFAL) (Orientador)

Banca Examinadora:



Professora Doutora Meirielly Kellya Holanda da Silva (Campus Arapiraca-UFAL)



Mestre Josiel Santos do Nascimento

Dedico esse trabalho aos meus pais, Gidivan e Lucineide; a minha tia, Luciene; e aos meus avós Josefa e José, pois sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar a minha vida, por me mostrar que estou no caminho certo e por sempre colocar pessoas de luz no meu caminho.

Agradeço imensamente a minha mãe, Lucineide, por ser a minha maior incentivadora e por não medir esforços para me ajudar a realizar meus objetivos, também ao meu pai, Gidivan, por todo apoio, incentivo e por sempre ter dado todo o suporte para os meus estudos e a minha irmã, Letícia. A minha tia Luciene agradeço por sempre ter me tratado como uma filha e por ter me dado todo o suporte para vir morar em Maceió. Agradeço aos meus avós, José, Josefa, Genésio e Josefa, que cuidam de mim desde criança e continuam a se preocupar com o meu bem estar, foram essenciais na minha formação, e também aos meus tios, tias, primos e primas que apoiaram e torceram por mim nessa caminhada.

Gratidão ao meu namorado, amigo e parceiro, Cledson, que acompanhou toda a realização desse trabalho, desde os ensaios na banca a escrita, que sempre me incentivou, me ajudou e esteve no meu lado quando mais precisei. Obrigada por todo amor, carinho, compreensão e paciência.

As minhas grandes amigas Evelyn e Shayanny, que estão comigo desde o colégio, agradeço por todo o companheirismo, e as amigas que o curso me deu Maryana, Kelly e Hilda Caroline que foram essenciais para meu desempenho nas disciplinas e sempre me deram forças para continuar.

Ao Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM) o qual me acolheu desde o segundo período do curso e virou a minha família na UFAL, ao Professor Luciano Grillo por todo suporte e por me confiar esse projeto, aos meus companheiros de bancada e amigos os quais tenho profunda admiração, Mariana, Meirielly, Camilla C., Robert e Camila R., agradeço por todos os ensinamentos e por deixar o dia a dia mais alegre. Meu muito obrigada aos meus amados amigos Erika, Luana, Valéria, Thays e Josiel que não são só mais colegas de laboratório e sim confidentes e pessoas que eu quero levar para o resto da vida.

Meu agradecimento especial ao Thomás, que além de colega de bancada e amigo, foi, praticamente, meu co-orientador, obrigada por todos os ensinamentos, toda a paciência, toda a dedicação em me ensinar e tirar minhas dúvidas, mais da metade do que eu aprendi sobre pesquisa eu devo a você.

Ao Laboratório de Metabolômica e Proteômica (LAMP) por todo suporte, em especial ao Professor Hugo, que está sempre disposto a ajudar, a Andréa e ao Cláudio por todas as dicas e incentivo.

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Alagoas, ao Instituto de Ciências Farmacêuticas e aos meus professores que foram essenciais para a minha formação, em especial ao professor Gerson, que foi meu orientador de monitoria, o qual me acolheu e me fez ficar ainda mais apaixonada pela Farmácia e aos professores Camila, Ticiano e Irinaldo que sempre estiveram com seus laboratórios de portas abertas para ajudar na realização das pesquisas.

Tudo depende do tipo de lente que você utiliza para ver as coisas.

- O Mundo de Sofia (Jostein Gaarder, 2012)

RESUMO

Inibidores enzimáticos são moléculas que têm a capacidade de diminuir ou interromper a atividade catalítica de enzimas, muitos deles são produzidos de maneira endógena com o intuito de manter a homeostase do organismo. Inibidores de tripsina têm sido estudados devido a sua importância no controle de pragas, para entender os mecanismos de inibição e até mesmo como possibilidade para novos fármacos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade de um inibidor de tripsina endógeno da larva do *Tribolium castaneum* mediante a uma purificação parcial. A primeira etapa se consistiu em um *salting out* com sulfato de amônio, a segunda etapa utilizou uma membrana de ultrafiltração. Após esse ensaios o extrato da larva teve um decréscimo de contaminantes comprovado por meio de um gel de poliacrolamida SDS-PAGE, mostrando uma purificação parcial e conseguindo inibir cerca de 58% da atividade da tripsina bovina, quando a amostra foi submetida a altas temperaturas permaneceu com sua atividade conservada. Com esses resultados conseguimos comprovar a presença de um inibidor endógeno de tripsina na larva do *T. castaneum*, que poderá ser usado para futuras aplicações biotecnológicas como o tratamento de doenças.

Palavras chaves: Inibidor de tripsina, *Tribolium castaneum*, ultrafiltração.

ABSTRACT

Enzyme inhibitors are molecules that have the ability to decrease or interrupt the catalytic activity of enzymes, many of them are produced endogenously for the purpose to maintain the organism's homeostasis. Trypsin inhibitors have been studied due to their importance in prague control, to understand the mechanisms of inhibition and even as a possibility for new drugs. The objective of this work was to evaluate the activity of an endogenous trypsin inhibitor of the *Tribolium castaneum* larva by means of a partial purification. The first stage consisted of a *salting out* with ammonium sulfate, the second stage used an ultrafiltration membrane. After saline precipitation and ultrafiltration, the larvae extract had a decrease in contaminants confirmed by a SDS-PAGE polyacrylamide gel, showing a partial purification and managed to inhibit about 58% of bovine trypsin activity, when the sample was subjected to high temperatures, its activity remained conserved. With these results we were able to prove the presence of an endogenous trypsin inhibitor in the *T. castaneum* larva, which can be used for future biotechnological applications such as disease treatment.

Keywords: Trypsin inhibitor, *Tribolium castaneum*, ultrafiltration

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Inseto <i>Tribolium castaneum</i> em fase adulta.....	15
Figura 2: Estágios de desenvolvimento do <i>Tribolium castaneum</i> : ovos, larvas, pupas e adultos.....	15
Figura 3: Ciclo de vida do <i>Tribolium castaneum</i>	16
Figura 4: Representação esquemática da atuação de endopeptidases e exopeptidases	18
Figura 5: Representação ilustrada dos sítios ativos das proteases,	19
Figura 6: Ilustração da estrutura geral da tripsina	20
Figura 7: Ilustração do mecanismo de ação da tripsina	21
Figura 8: Esquema de inibição competitiva	23
Figura 9: Esquema de inibição incompetitiva	23
Figura 10: Esquema de inibição mista.	24
Figura 11: Precipitação de Proteína utilizando Sulfato de Amônio.....	31
Figura 12: Membrana de ultrafiltração Corning® Spin-X® UF concentrators Spin-X UF 500 for samples up to 500uL; 10K MWCO.	32
Figura 13: Eletroforese.....	33
Figura 14: Ilustração de reação geral da hidrólise do BapNa pela Tripsina.	36
Figura 15: Inibição da tripsina bovina com diferentes concentrações do extrato bruto da larva do <i>T. castaneum</i>	40
Figura 16: Extrato bruto da larva do <i>T. castaneum</i> tratado com PMSF por 24 horas.	42
Figura 17: Inibição da tripsina bovina com diferentes concentrações da fração 80-100% do extrato da larva do <i>T. castaneum</i>	456
Figura 18: Gel de poliacrilamida SDS-PAGE do extrato da larva do <i>T. castaneum</i> ..	49
Figura 19: Inibição da tripsina bovina com filtrado da fração 80-100% do extrato da larva do <i>T. castaneum</i> submetido a aquecimento de 90°C.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de inibidores de peptidases aprovados para o uso clínico.	26
Tabela 2: Fracionamento salino utilizando 45 ug de proteína de cada fração para efetuar o ensaio de inibição.....	445
Tabela 3: Inibição da tripsina bovina pela fração 80-100% filtrada e concentrada do extrato da larva do <i>T. castaneum</i>	467

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍGLAS E SÍMBOLOS

(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de Amônio
BAPNA	N-α-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide
Fig.	Figuras
M	Molaridade
mg/mL	Miligrama por mililitro
Min	Minutos
pH	Potencial hidrogênioônico
PMSF	Fluoreto de Fenilmetilsulfonil
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
Tab.	Tabela
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
MWCO	Molecular weight cut-offs ou corte de peso molecular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	<i>Tribolium castaneum</i>	15
2.2	Proteases	17
2.3	Enzima Tripsina	19
2.4	Inibição enzimática	22
2.5	Inibidores de serino proteases	25
2.6	Inibidores de serinoproteinases em insetos	27
2.7	Tipos de inibidores de serino protease encontrados em insetos	28
2.7.1	Família Serpina	28
2.7.2	Família Kunitz	29
2.7.3	Família Cininogênio	29
2.7.4	Família Pacifastin	29
2.7.5	Família Kazal	30
2.8	Purificação de proteínas	30
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivos Gerais	34
3.2	Objetivos específicos	34
4	METODOLOGIA	35
4.1	Insetos	35
4.2	Preparação do extrato bruto	35
4.3	Determinação da concentração da proteína totais	35
4.4	Ensaio de inibição tripsínica	36

4.5	Tratamento do extrato bruto com PMSF.....	37
4.6	Precipitação salina com Sulfato de Amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	37
4.7	Ensaio de inibição da Tripsina com as frações salinas do extrato.....	37
4.8	Ensaio para a comprovação da presença do inibidor na fração de interesse.....	38
4.9	Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE.....	38
4.10	Membrana de Ultrafiltração.....	38
4.11	Inibição tripsínica utilizando fração salina filtrada.....	39
4.12	Ensaio de temperatura.....	39
5	RESULTADOS E DISCURSÕES.....	40
5.1	Monitoramento da atividade de um inibidor de tripsina da Larva do <i>T. castaneum</i>	40
5.2	Tratamento do extrato bruto com PMSF.....	41
5.3	Fracionamento Salino.....	43
5.4	Atividade inibitória da fração de interesse.....	44
5.5	Ultrafiltração da fração 80-100%.....	45
5.6	Eletroforese Em Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE.....	47
5.7	Resistência térmica.....	48
6	CONCLUSÃO.....	50
	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO

As serinoproteases são enzimas proteolíticas que participam de processos fisiológicos cruciais, como coagulação sanguínea, ativação do complemento, processos digestivos e degradativos, fibrinólise, fertilização, desenvolvimento embrionário e remodelação de tecidos tanto em vertebrados quanto em invertebrados (KREM, 2002).

Em invertebrados as enzimas proteolíticas se tornaram alvos de diversos estudos e uma ênfase é dada a tripsina por ser importante em vários processos fisiológicos como na hidrólise de proteínas alimentares (DÍAZ- MENDOZA et al., 2005; DELCROIX et al., 2006). Em sistemas biológicos, proteinases e inibidores de proteinases existem frequentemente como pares, a fim de manter a homeostase (JIANG e KANOST, 2000).

Insetos e crustáceos têm sido os modelos mais comumente utilizados, entre os invertebrados, para a compreensão e caracterização dos processos fisiológicos e bioquímicos nos quais as serinoproteases estão envolvidas (NORIEGA E WELLS, 1999; MAEDA-MARTÍNEZ et al., 2000; DE ALBUQUERQUE et al., 2002).

Os inibidores de protease foram rastreados e identificados em vários artrópodes, inclusive em insetos como *Bombyx mori*, *Antheraea pernyi*, *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta*, *Locusta migratoria* e *Schistocerca gregaria* (CHERQUI, 2001). No *Tribolium castaneum* trinta e um inibidores de serinaproteinases foram identificadas, incluindo um cluster de 16 genes duplicados dentro de um segmento de 50 kilobases (ZOU et al., 2007).

O *Tribolium castaneum*, também conhecido como besouro castanho ou besouro vermelho da farinha, acomete culturas de cereais como trigo, soja e aveia causando grandes perdas tanto na produção como durante o armazenamento do produto, ele tem sido um inseto muito utilizado em pesquisas ficando atrás somente da *Drosophila melanogaster* (DÖNITZ et al., 2013).

O presente estudo se propõe a analisar a atividade de um inibidor de tripsina presente nas larvas do inseto *Tribolium castaneum* e de submetê-lo a técnicas de purificação, visto a importância das proteases e seus inibidores para todas as formas de vida pois são responsáveis por regular variadas funções. Além disso os insetos

podem ser modelos valiosos para entender o papel das cascatas proteolíticas e sua regulação durante o desenvolvimento.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Tribolium castaneum*

O *Tribolium castaneum*, também conhecido como besouro vermelho da farinha ou besouro castanho (**Fig. 1**), pertence à ordem Coleoptera, ele empesta principalmente grãos moídos, como trigo, soja e aveia, e conseguem se desenvolver bem em ambientes e alimentos extremamente secos, causando grandes perdas tanto na produção quanto durante o armazenamento do produto. (DÖNITZ et al., 2013; RICHARDS et al., 2008).

Figura 1: Inseto *Tribolium castaneum* em fase adulta.



Fonte: https://www.agrolink.com.br/problemas/besouro-castanho_1928.html – Acesso em 28 de dezembro de 2019.

O *T. castaneum* é um inseto holometábolo, passa por metamorfose completa constituída por 4 fases distintas (ovo, larva, pupa e inseto adulto) (**Fig. 2**), seu ciclo de vida compreende de 30 a 40 dias, quando em temperatura favorável de 35°C e umidade relativa do ar de 70% (BERNARDO QUÍMICA, 2006).

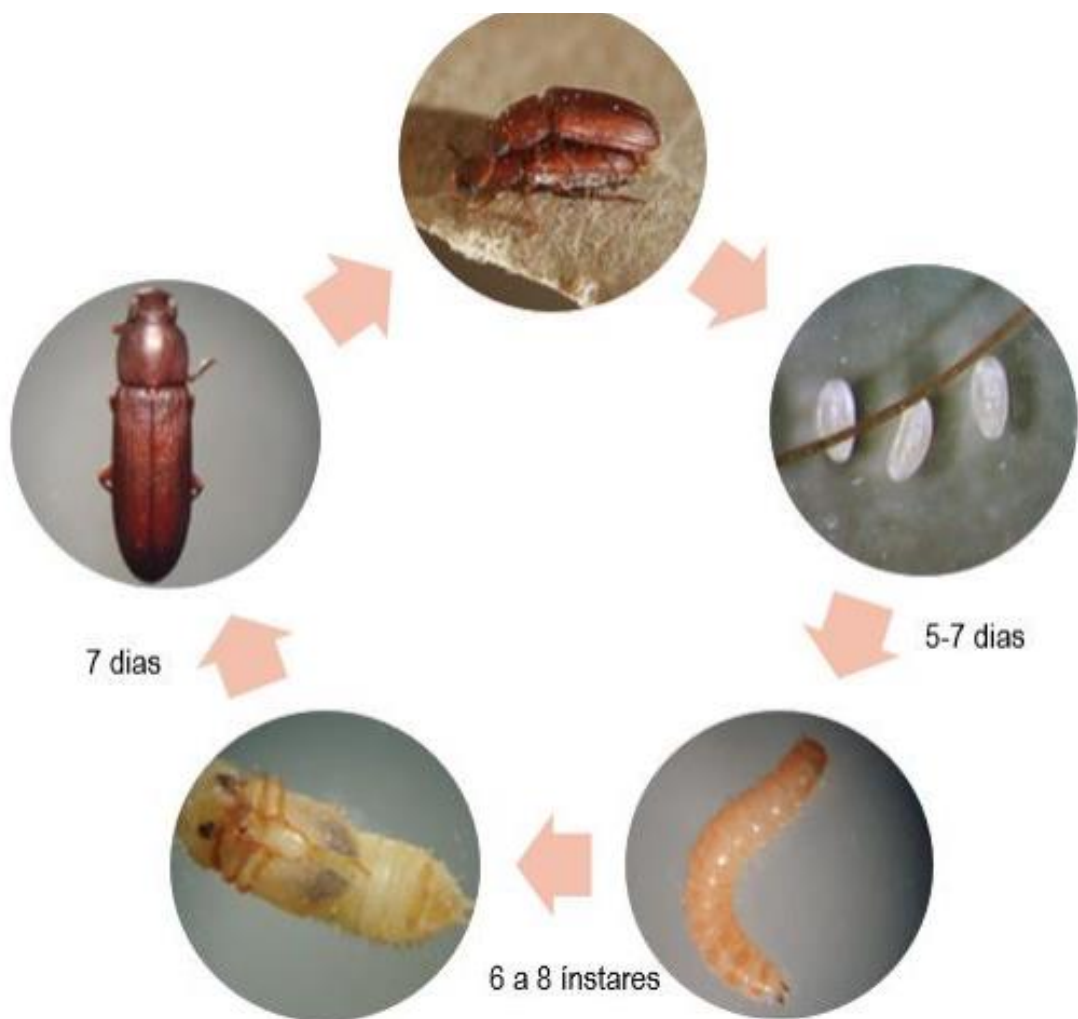
Figura 2: Estágios de desenvolvimento do *Tribolium castaneum*: ovos, larvas, pupas e adultos.



Fonte: <http://grainscanada.gc.ca> – Acesso em 28 de dezembro de 2019.

Os insetos adultos de *T. castaneum*, apresentam coloração castanho-avermelhada, medem cerca de 3-4 mm, possuem corpo achatado e duas depressões transversais na cabeça (ELIAS et al., 2008). Cada uma das fêmeas desse inseto podem ovipositar cerca de 450 ovos a cada ciclo, os ovos medem aproximadamente 0,6 x 0,3 mm de comprimento, são claros e recobertos por uma camada de substância viscosa e o período para eclosão é de cerca de 5-7 dias. (PUZZI, 1977). As larvas da espécie apresentam uma coloração amarelada, um formato cilíndrico, medindo aproximadamente 7mm e passam por 6 a 8 ínstaes até chegarem à fase de pupa ficando nesse estágio por proximamente 7 dias (GALLO et al., 2002) (**Fig. 3**).

Figura 3: Ciclo de vida do *Tribolium castaneum*



Fonte: CHICUTA, 2019. Adaptado de LORONI et. al, 2015

O *Tribolium castaneum* detém a capacidade de voar, especialmente em condições tropicais, fazendo com que ele seja um dos primeiros insetos a reinfestar os produtos após a fumigação (FARONI; SOUSA, 2006).

A segunda escolha como sistema modelo para estudos em insetos tem sido o *T. castaneum*, ficando atrás apenas da mosca-da-fruta, *Drosophila melanogaster* (DÖNITZ et al., 2013). O sucesso observado com a utilização do *T. castaneum* tem relação com a sua rápida reprodução, alta fecundidade, intervalos curtos de geração, baixos custos de manutenção, aspectos éticos aceitáveis, genoma acessível em banco de dados, além das sequências de genes apresentarem intensa relação de homologia com outras espécies, incluindo humanos, compartilhando com estes cerca de 126 grupos de genes ortólogos (RICHARDS et al., 2008). Visto essas vantagens o *Tribolium castaneum* torna-se um excelente modelo para diversos estudos genéticos e bioquímicos, incluindo pesquisa sobre enzimas, como por exemplo, as proteases e seus inibidores.

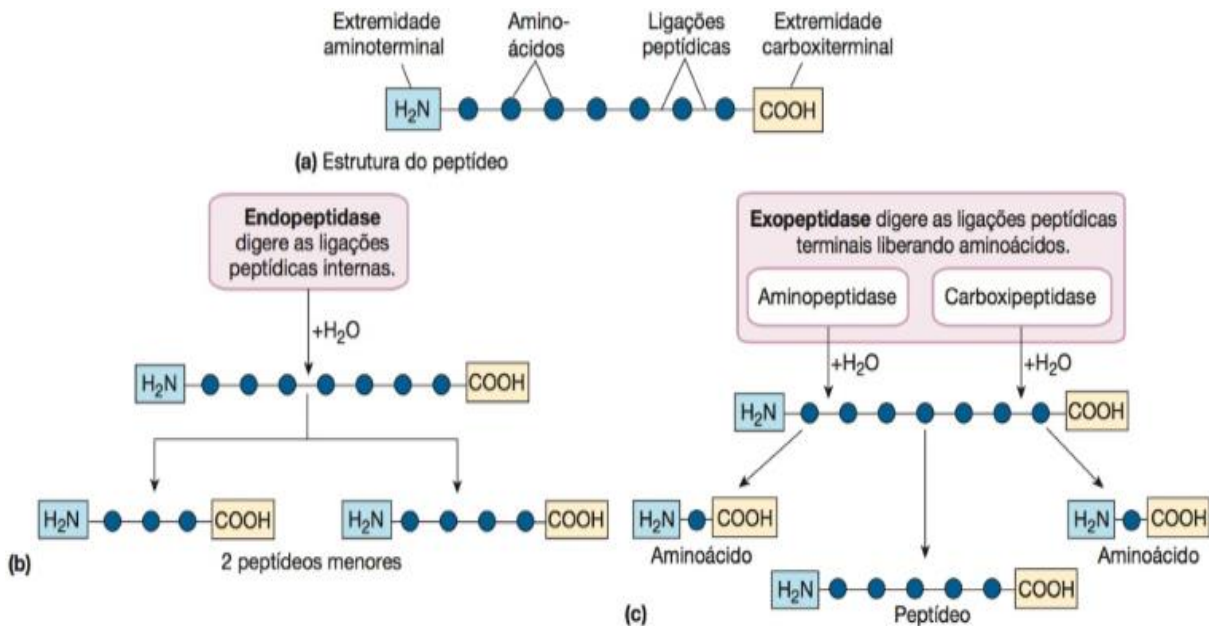
2.2 Proteases

As proteases (EC 3.4), também denominadas peptidases ou proteinases, são uma das maiores e mais diversas famílias de enzimas atualmente conhecidas (QURESHI et al., 2011). A atividade catalítica da protease está envolvida em vários processos, entre eles a digestão e apoptose. Essas enzimas são indispensáveis em todos os organismos vivos para a síntese das biomoléculas necessárias e para controlar o tamanho, a forma, a rotatividade e a composição das proteínas fundamentais (RAMACHANDRAN et al., 2012), além disso, peptidases estão envolvidas em muitas doenças humanas, com doenças neurodegenerativas, inflamatórias e infecciosas (MOURÃO, 2016).

As proteases atuam nas ligações peptídicas e incluem as proteinases endopeptidases (EC 3.4.21-24) e exopeptidases (EC 3.2.4.11-19)(TERRA et al., 1996), classificadas assim pela posição da ligação peptídica clivada. As exopeptidases executam sua atividade enzimática por hidrólise meramente nos pontos terminais de nitrogênio ou carbono da cadeia do substrato inteiramente composta de polipeptídeo (MÓTYÁN, 2013), já as endopeptidases estão envolvidas

de maneira proativa na clivagem de aminoácidos não terminais (**Fig. 4**) (SAWANT, 2014)

Figura 4: Representação esquemática da atuação de endopeptidases e exopeptidases



Fonte: adaptado de SILVERTHORN, 2010

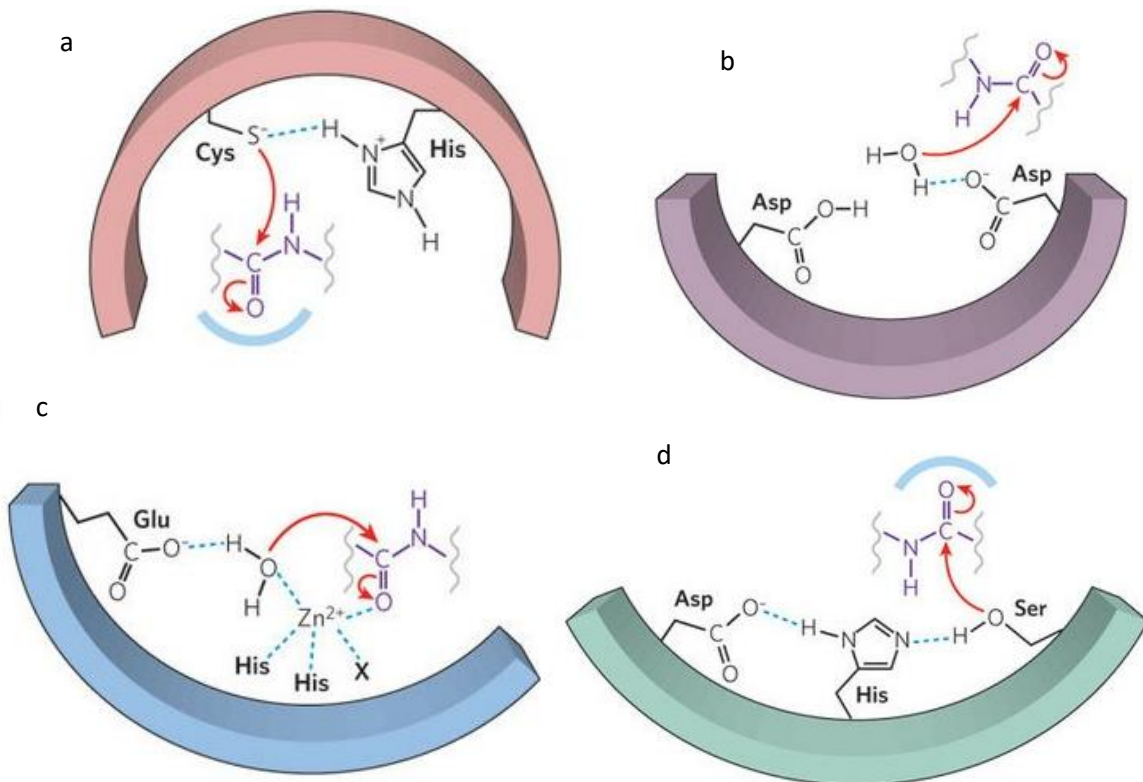
As proteinases são subdivididas em sub-classes com base no mecanismo catalítico, demonstrado pelo uso de reagentes específicos ou efeito de pH, e incluem as serino-proteinases (EC 3.4.21), as cisteíno-proteinases (EC 3.4.22) as aspartato-proteinases (EC 3.4.23) e as metaloproteinases (EC 3.4.24) (TERRA et al., 1996).

As Cisteínoproteases (**Fig. 5a**) podem ser caracterizadas como enzimas proteolíticas que atuam nas ligações peptídicas por um ataque nucleofílico do ânion sulfeto, localizado em seu sítio catalítico (KUNAKBAEVA et al., 2003). A protease do ácido aspártico (**Fig. 5 b**) é uma protease ácida que utiliza uma molécula de água ligada a um ou mais resíduos aspárticos no local catalítico da ação (SZECSI, 1992). As metaloproteases (**Fig. 5c**) são normalmente caracterizadas por exigirem a presença de um íon metálico bivalente (normalmente o Zn²⁺ ou Mn²⁺) em seu sítio catalítico (RAO et al., 1998)

A subclasse de proteases melhor caracterizada e fisiologicamente versátil é a de serinoprotease (**Fig. 5d**), que contém no sítio ativo uma tríade catalítica: Ácido aspártico (Asp), histidina (His) e serina (Ser). (KRAUT, 1977).

De modo geral, as principais enzimas encontradas no intestino dos insetos são as proteases e as carboidrases (BOWN et al., 1997) e as duas principais classes de proteinases no sistema digestivo de insetos fitófagos são as serino e cisteíno proteinases (KUBO, 2007). As serina-proteinases, particularmente tripsina e quimiotripsina, são as principais proteinases digestivas presentes na maioria dos grupos de insetos, com exceção de algumas espécies de hemípteros e coleópteros, nas quais cisteíno e aspartato proteinases predominam (LAM et al., 2000).

Figura 5: Representação ilustrada dos sítios ativos das proteases: Cisteíno protease (a), Aspártico protease (b), Metaloprotease (c) e Serino protease (d)



Fonte: © 2009 [Nature Publishing Group](#)

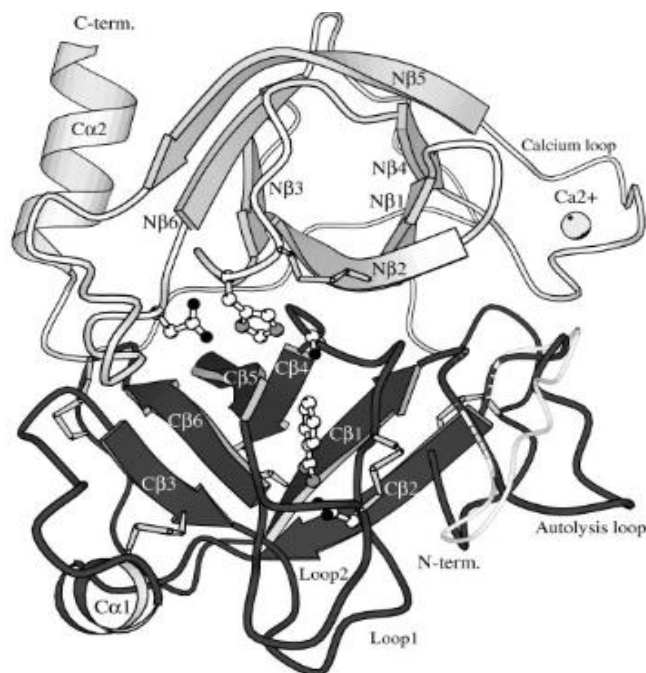
2.3 Enzima Tripsina

A Tripsina (EC 3.4.21.4) é a principal enzima intestinal que é responsável por hidrolisar proteínas alimentares. É uma serina-protease que hidrolisa ligações

peptídicas formadas pelo lado carboxi-terminal de aminoácidos básicos como a lisina ou arginina. Esta enzima tem sido alvo de diversos estudos em insetos por conta do seu potencial para o biocontrole dessas pragas (RAO, 1998).

A estrutura da tripsina é composta por duas alfa-hélices e dois barris-betas, cada um contém seis fitas; sua tríade catalítica, Ser, His, Asp; está localizada nesse local (**Fig. 6**). É possível verificar a presença de outros sítios enzimáticos, o de ligação e reconhecimento do seu substrato (Aspartato, Glicina e Glicina), outro de ligação do íon cálcio (Glutamina, Asparagina, Valina, Glutamato e Glutamato), e um outro de autólise, que contém lisina e arginina (BODE; SCHWAGER, 1975; KISHIMURA, 2008).

Figura 6: Ilustração da estrutura geral da tripsina



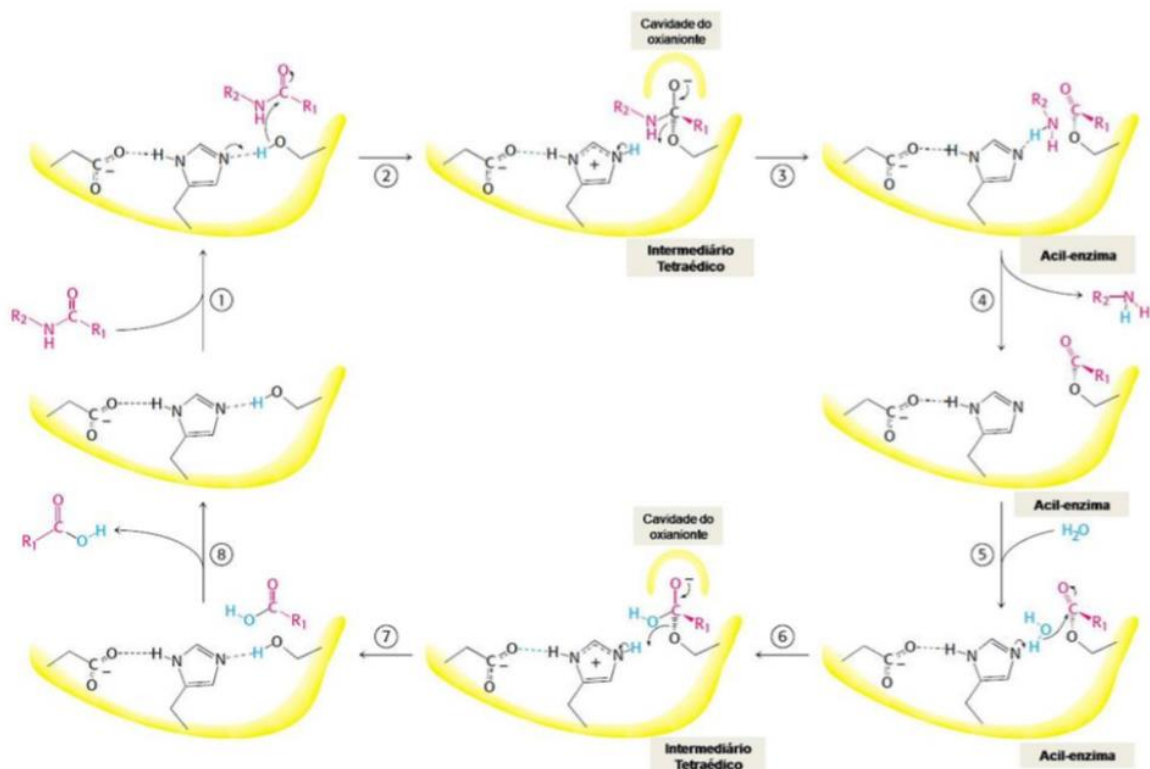
Fonte: Schröder Leiros et al.,2000

Em vertebrados, possui atuação esclarecida na digestão intestinal, lise celular de organismos invasores, bem como na coagulação sanguínea; podem agir na sinalização celular por meio de receptores ativados por proteases (KONG et al., 1997). Na sua forma inativa (Pró-enzima) é denominada de tripsinogênio, que é ativado ao chegar ao duodeno, intestino delgado, ao ser hidrolisada por uma

enteroquinase, ao retirar um hexapeptídeo amino-terminal da sua forma inativa (DEVLIN; TOMA, 2007; RIBEIRO, 2013).

A tripsina apresenta algumas etapas para exercer seu mecanismo de ação, primeiramente há o acoplamento do seu sítio ativo em seu substrato, isso é possível pelo ataque nucleofílico realizado pelo resíduo de aminoácido serina ao grupo carbonila do substrato, que instabilizará o oxigênio do grupo carbonila, favorecendo a formação de carga negativa por um período, que será estabilizada pelo hidrogênio. Há formação do complexo acil-enzima. O grupo amino dissocia-se da cadeia e forma o produto inicial da hidrólise, assim a água pode entrar no sítio ativo enzimático e promover o ataque nucleofílico, sendo responsável por formar um novo complexo acil-enzima para acontecer a dissociação do grupo carboxil, que é o segundo produto da hidrólise (**Fig. 7**) (HEDSTROM, 2002).

Figura 7: Ilustração do mecanismo de ação da tripsina



Fonte: BERG, STRYER e TYMOZKO, 2007

Enzimas proteolíticas de invertebrados se tornaram alvos de diversos estudos, uma ênfase é dada para a tripsina por ser importante em vários processos fisiológicos, e na busca para melhor compreender a hidrólise de proteínas alimentares (DÍAZ- MENDOZA et al., 2005; DELCROIX et al., 2006). Entre os invertebrados, crustáceos e insetos têm sido os modelos mais comumente usados para a compreensão e caracterização dos processos fisiológicos e bioquímicos nos quais essa enzima está envolvida (NORIEGA E WELLS 1999; MAEDA-MARTÍNEZ et. al 2000 ; ALBUQUERQUE et al., 2002).

As proteases possuem diversas vantagens, mas devem ser rigorosamente reguladas e controladas, pois o excesso de atividade dessas enzimas pode causar danos ao organismo. Para efetuar esse controle existem os inibidores proteolíticos (RAWLINGS et al., 2004).

2.4 Inibição enzimática

Inibidores de enzimas são moléculas que interferem com a catálise, diminuindo ou interrompendo as reações enzimáticas, podem agir por meio de ligação às enzimas livres por meio do complexo enzima-ligante (NELSON; COX, 2015).

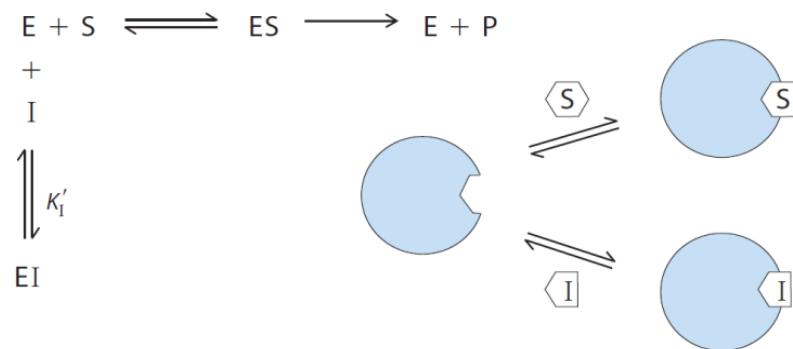
Os inibidores enzimáticos são divididos em duas classes, os reversíveis e os irreversíveis. Os inibidores irreversíveis dissociam-se muito lentamente de sua enzima-alvo, visto que está ligado firmemente à enzima. Alguns inibidores irreversíveis são fármacos importantes, como a penicilina que atua ao modificar covalentemente a enzima transpeptidase, impedindo, desse modo, a síntese das paredes bacterianas e matando, conseqüentemente, as bactérias. Os inibidores reversíveis, por sua vez, se caracterizam por uma rápida dissociação do complexo enzima-inibidor e podem ser classificados em competitivos, incompetitivos e não-competitivos (HARVEY; FERRIER, 2015; KUNITZ, 1947, STRYER, 2007).

Na inibição competitiva (**Fig. 8**), os dois ligantes (substrato (S) e inibidor (I)) competem pelo sítio ativo da enzima, quando o inibidor ocupa o sítio ele impede que a enzima se ligue ao substrato, ou seja, a enzima não pode se ligar aos dois ligantes ao mesmo tempo. Comumente os inibidores competitivos se assemelham

estruturalmente ao substrato, formando um complexo enzima-inibidor (EI), porém sem levar a catalise, conseqüentemente diminui a velocidade de catálise ao reduzir a proporção de moléculas de enzimas ligadas a um substrato (NELSON E COX, 2014; BERG, STRYER e TYMOZKO, 2007).

Figura 8: Esquema de inibição competitiva. Mostra a enzima (E) e os sítios de ligação do substrato (S) e inibidor (I). K_I é a constante de equilíbrio da ligação do inibidor a E.

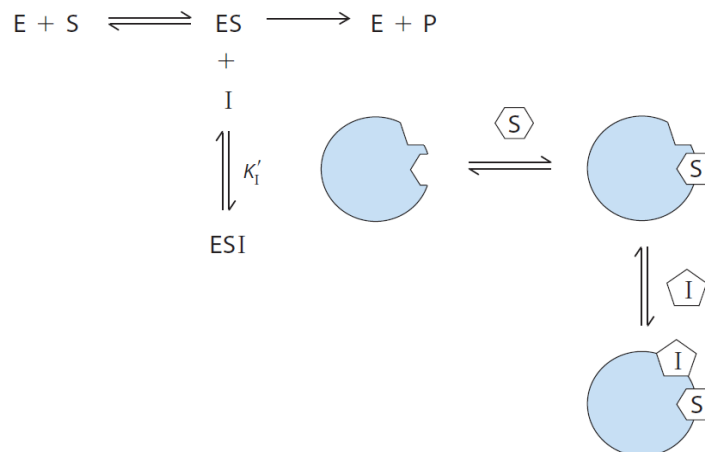
(a) Inibição competitiva



Fonte: NELSON E COX, 2014

Um inibidor incompetitivo (**Fig. 9**) distingue-se por se ligar em um sítio distinto do sítio ativo do substrato e, ao contrário do inibidor competitivo, liga-se apenas ao complexo enzima-substrato (ES). O sítio de ligação do inibidor incompetitivo só é criado a partir da interação da enzima com o substrato (NELSON E COX, 2014; BERG, STRYER e TYMOZKO, 2007).

Figura 9: Esquema de inibição incompetitiva. Mostra a enzima (E) e os sítios de ligação do substrato (S) e inibidor (I). K'_I é a constante de equilíbrio para a ligação a ES.

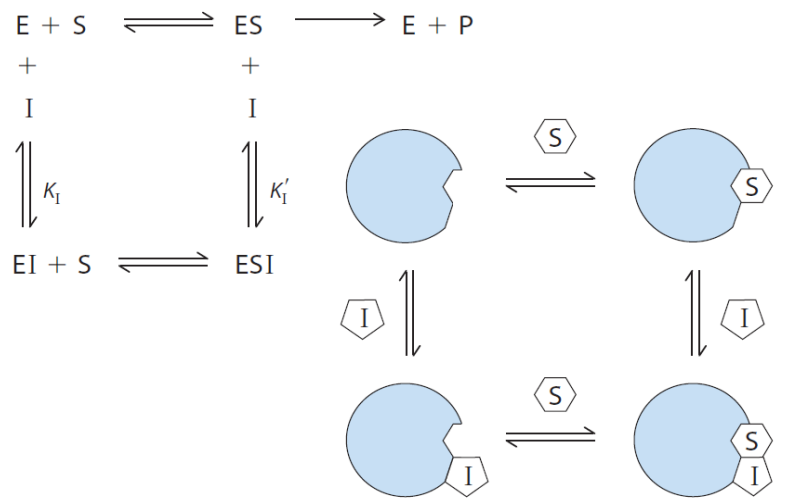


Fonte: NELSON E COX, 2014

Na inibição não competitiva ou mista (**Fig. 10**) apesar de o inibidor também se ligar a um sítio distinto do sítio ativo ao qual o substrato se liga, diferencia-se da inibição incompetitiva pois um inibidor não competitivo pode ligar-se tanto a enzima livre quanto ao complexo ES. (NELSON E COX, 2014; BERG, STRYER e TYMOZKO, 2007).

Figura 10: Esquema de inibição mista. Mostra a enzima e os sítios de ligação do substrato(S) e inibidor (I). K_I é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor a E; K_I' é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor ao complexo ES.

(c) Inibição mista



Fonte: NELSON E COX, 2014

Além dos inibidores outros fatores podem alterar a velocidade de reação da enzima, tanto negativamente como positivamente com relação a alteração do meio em que são estudadas, como a concentração do substrato, temperatura, pH e presença de íons (HARVEY; FERRIER, 2015). Até certo ponto, quanto maior a concentração de substrato disponível, maior é a velocidade de colisão e ligação entre as moléculas da enzima e substrato. O pH da solução atua nos grupos ionizáveis, podendo alterar a conformação enzimática e, portanto, sua atividade. Quanto à temperatura, no princípio, seu aumento resulta no aumento da velocidade de reação, por aumentar a energia cinética das moléculas do sistema; porém, aumentos elevados levam à desnaturação térmica da enzima, inativando-a (MOURÃO, 2016).

Dentre os inibidores de proteases e tripsina, podemos fazer destaque as moléculas de: Benzamidina, é um inibidor competitivo tripsina (MARES-GUIA; SHAW, 1965); fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF), inibidor irreversível específico de serinoproteases, ataca os resíduos de serina (JAMES, 1978) e SBTI, inibidor da soja, é uma proteína do tipo globulina, que atua inibindo a tripsina de maneira irreversível (KUNITZ, 1947).

2.5 Inibidores de proteases

A função fisiológica dos inibidores de proteases (IPs), no sentido amplo, é a eliminação da proteólise indesejada, tanto na maioria dos processos fisiológicos normais, bem como em circunstâncias patológicas. A presença de IPs em plasma de mamíferos sugere a participação destes na regulação da coagulação sanguínea e outras cascatas proteolíticas, como a ativação de complemento (LASKOWSKI e KATO, 1980, SHAMSI et al., 2016, LASKOWSKI et.al ,1986).

O peso molecular dessas moléculas varia de 6 a 50 kDa, e majoritariamente apresentam entre 70 e 90 resíduos de aminoácidos. Os inibidores que possuem massa molecular relativamente alta, apresenta-se na forma polimérica, associados em dímeros ou tetrâmeros, cujos monômeros possuem uma massa molecular mínima de aproximadamente 10 kDa (KUBO, 2007).

Os inibidores de peptidases estão sendo bastante estudados pelas muitas aplicações potenciais na medicina, agricultura, biotecnologia, indústria de alimentos e diagnóstico, como também para a compreensão dos mecanismos de interação deles (COTABARREN, et al., 2019; RAWLINGS et al., 2004).

A maioria dos compostos farmacêuticos e nutracêuticos comercializados têm em sua composição inibidores de enzimas e, como tal, exibem uma ação específica dentro das células, bactérias, vírus, animais, plantas e corpo humano (**Tab. 1**) (COTABARREN, Juliana et al. Adding value to the chia (*Salvia hispanica* L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with Papain. **Food chemistry**, v. 274, p. 848-856, 2019. COTABARREN, et al., 2019).

Algumas doenças hereditárias são atribuídas a anormalidades nos inibidores das peptidases como formas de enfisema, epilepsia, edema angioneurótico hereditário e síndrome de Netherton, um possível tratamento para essas doenças

poderia ser uso de inibidores administrados como medicamentos (RAWLINGS et al., 2004).

O uso potencial medicamentoso de inibidores de proteases também pode ser sugerido para outras condições fisiopatológicas como infarto do miocárdio, tromboembolismo venoso e acidente vascular cerebral envolvendo atividade

Tabela 1: Exemplos de inibidores de peptidases aprovados para o uso clínico.

inadequada da trombina, câncer, osteoporose, AIDS, doença de Alzheimer, artrite reumatoide e inflamação microbiana (SHAMSI et al., 2016).

Indicação	Composto	Companhia	Alvo	Classe da peptidase
Hipertensão, infarto do miocárdio	Captopril	Bristol-Myers Squibb	ECA	Metalo
	Enalapril	Merk		
	Lisinopril	AstraZeneca		
	Trandalapril	Abbott		
	Zofenopril	Menarini group		
	Ramipril	Aventis		
	Moexipril	Boehringer Mannheim		
	Imidapril	Trinity Pharmaceuticals		
	Perindopril	Daiichi Pharmaceutical, Servier/Solvay		
	Qinapril	Pfizer		
	Fosinopril	Bristol-Myers Squibb		
Periodontite	Benazepril	Novartis	MMP1, MMP2	Metalo
	Cilazapril	Roche		
HIV	Periostat	CollaGenex	HIV peptidase	Aspártico
	Ritonavir	Abbott		
	Amprenavir	Vertex Pharmaceuticals, Glaxo SmithKline		
	Fosamprenavir	Glaxo SmithKline		
	Atazanavir	Bristol-Myers Squibb		
	Lopinavir	Abbott		
	Indinavir	Merck		
Saquinavir	Hoffmann-La Roche			
Trombose	Nelfinavir mesylate	Pfizer	Trombina	Serino
	Ximelagatran*	AstraZeneca		
	Argatroban	Mitsubishi-Pharma		
	Lepirudin	Aventis (Hoechst Marion Roussel)		
	Desirudin	Novartis		
Doença respiratória	Fondaparinux sodium (indireto)	Sanofi Synthelabo	Fator Xa	Serino
	Sivelestat	Ono	Elastase neutrofilica humana	Serino
Pancreatite	Camostat mesylate	Ono	Tripsina-like	Serino
Pancreatite, inflamação	Nafamostat mesilate	Japan Tobacco	Amplio espectro	Serino
Câncer	Bortezomib	Millennium	Proteassoma	Treonina

*Retirado do mercado devido à hepatotoxicidade. ECA, enzima conversora de angiotensina; MMP, metaloproteinase de matriz.

2.6 Inibidores de serinoproteinases em insetos

Em mamíferos, muitas respostas fisiológicas são ativadas por cascatas de sinalização extracelular, como coagulação sanguínea, angiogênese, cicatrização de feridas e respostas inflamatórias e complementares. Em geral, os inibidores de protease de insetos parecem regular uma faixa de respostas semelhante à dos mamíferos (GUBB et al. 2010).

A hemolinfa de insetos e outros artrópodes contêm concentrações relativamente altas de inibidores de serina proteinase de várias famílias de genes diferentes (POLANOWSKI E WILUSZ, 1996). Foi sugerido que os inibidores de protease da hemolinfa do inseto servem a muitas funções biológicas, como a regulação de processos proteoliticamente ativados, que envolvem a cascata da fenoloxidase (ASANO E ASHIDA, 2001), metamorfose, desenvolvimento, defesa contra patógenos invasores e proteção dos tecidos contra os efeitos nocivos das proteases que podem vazar para a hemolinfa do trato alimentar (RAI, et al 2010) e também atuam como uma ferramenta poderosa para entender a imunidade de insetos a nível bioquímico (KANOST, 1999).

Em *Drosophila melanogaster* os inibidores estão envolvidos em vias morfogênicas, espermatogênese, transporte de ânions orgânicos, necrose celular, apoptose, inibição de enzimas digestivas e fatores de virulência codificados por patógenos, longevidade e muitos aspectos da resposta imune inata. (GUBB, et al. 2010).

Dois inibidores foram purificados e caracterizados por RAMESH, et al.(1988) na hemolinfa de larvas de *Manduca sexta* e inibiram serina proteases, como tripsina, quimotripsina e plasmina. KANOST (1990) purificou quatro inibidores de serino proteinases desse mesmo inseto, um específico para elastase, dois são específicos para quimotripsina e um para tripsina.

Mais um estudo em *Manduca sexta* foi relatado um inibidor de protease que controla a ativação da profenoloxidase na hemolinfa, regulando, assim, a defesa do inseto contra patógenos e lesões (SAUL e SUGUMARAN, 1986)

Em 2001, NIRMALA et al. encontraram um inibidor de proteinase tipo Kunitz e um tipo Kazal na seda do inseto *Galleria mellonella* L. . Um achado semelhante foi feito por KURIOKA et al. (1999) que purificou uma proteína, encontrada na casca do casulo do bicho da seda, *Bombyx mori*, essa proteína tem peso molecular de 6 kDa, é estável ao calor e a ácido e inibe a tripsina bovina.

Trinta e um inibidores de serinoproteases foram identificadas no *Tribolium castaneum*, incluindo um cluster de 16 genes duplicados dentro de um segmento de 50 kilobases (ZOU, et al., 2007).

O entendimento da regulação de proteases nos insetos é incompleto, visto isso, eles podem ser modelos valiosos para entender o papel dessas cascatas proteolíticas e sua regulação durante o desenvolvimento.

2.7 Tipos de inibidores de serinoproteases encontrados em insetos

RAWLINGS et al. (2004) classificaram os inibidores proteicos de acordo com as semelhanças na sequência de aminoácidos identificadas, inicialmente, essa classificação tinha 48 famílias de inibidores que podiam ser agrupados em 26 superfamílias relacionadas com base em sua estrutura.

Os inibidores de serinoproteases de origem animal são os que apresentam o maior número de membros descritos (Roberts et al., 1995). Os inibidores de serinoprotease mais estudados nos insetos são as Serpinas, Cistatina, Pacifastin, Kazal e Kunitz (RAWLINGS et al. 2004; GUBB et al., 2010).

2.7.1 Família Serpina

A família Serpina é a maior e a mais difundida superfamília de IPs, com peso molecular na faixa de 39 a 43kDa, denominados inibidores do suicídio, ou seja, imitam o mecanismo do substrato. Genes do tipo serpina foram identificados em quase todos os tipos de organismos, incluindo vírus, bactérias, plantas e animais (HABIB e KHALID, 2007). No caso da família serpina, um complexo acil-enzima irreversível, ligado covalentemente, é formado com a protease alvo (GUBB et al. 2010).

2.7.2 Família Kunitz

Essa família recebeu esse nome devido ao pesquisador Kunitz que em 1946 estudou uma proteína de soja com peso molecular de 20 kDa a qual tinha capacidade de inibir a tripsina (KUNITZ, 1946). Estes inibidores geralmente têm massa molecular de 18 a 22 kDa, cadeia polipeptídica única, tem duas pontes dissulfeto e um local reativo (BRENDRE et al., 2018; SHAMSI et al., 2016).

Os inibidores de Kunitz bloqueiam diretamente o sítio ativo da serina protease sem nenhuma alteração conformacional e formam uma folha β anti-paralela entre a enzima e o inibidor (RANASINGHEAB e MCMANUSA, 2013).

2.7.3 Família Cininogênio

Os cininógenos são glicoproteínas multifuncionais e de múltiplos domínios relacionados às cistatinas. A família Cistatina 3 ou a família Cininogênio compreendem são as moléculas de cistatina mais complexas com alta massamolecular (60-120 kDa), desempenham um papel importante no processo de coagulação sanguínea (OLIVEIRA et al., 2003; SALVESEN et al., 1986).

2.7.4 Família Pacifastin

Os membros da família pacifastina são inibidores da serina peptidase, encontrados em artrópodes e têm muitos membros em diferentes ordens de insetos. Membros da família pacifastina são encontrados apenas em artrópodes, mas suas funções endógenas nos insetos permanecem indefinidas. A pasifatinha possui duas cadeias com funções biológicas diferentes, a cadeia pesada (105 kDa) mostra homologia da transferrina e está envolvida na ligação do ferro. A cadeia leve (44 kDa) possui atividade inibidora da serina peptidase (BREUGELMANS, et al, 2009).

2.7.5 Família Kazal

Os inibidores do tipo Kazal estão entre as famílias mais conhecidas de inibidores de proteases, amplamente encontrada em mamíferos, aves e uma variedade de invertebrados (VISETNAN et al, 2009). Os inibidores de Kazal são geralmente proteínas de múltiplos domínios contendo mais de um domínio de Kazal. Cada domínio de 50 a 60 resíduos de aminoácidos contém seis resíduos de cisteína bem conservados, capazes de formar três pontes de dissulfeto intra-domínio (VAN DE LOCHT et al, 1995). Eles formam uma família bem definida de inibidores competitivos de serinoproteases, que possuem estruturas com vários domínios e parecem estar envolvidos com o controle da atividade proteolítica na coagulação e sistema da fenoloxidase (JIMÉNEZ-VEJA e VARGAS-ALBORES, 2005).

2.8 Purificação de proteínas

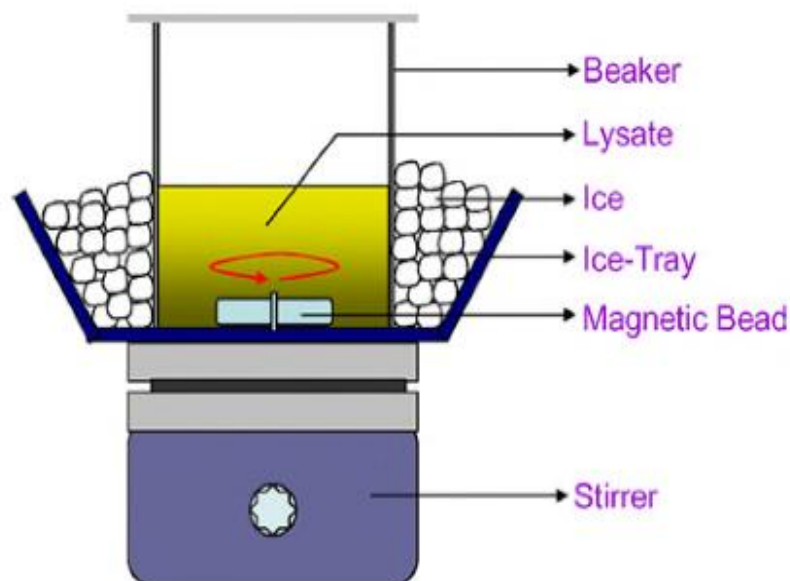
Para estudar uma proteína de interesse geralmente é preferível que ela seja separada de outros componentes presentes na célula de forma que sua estrutura e função possam ser avaliadas sem interferência de contaminante, para isso deve-se buscar a purificação da proteína de interesse, ou seja, a amostra deve ter apenas essa molécula. As proteínas podem ser separadas umas das outras, de acordo com sua solubilidade, tamanho, carga e propriedades de ligação (BERG, STRYER e TYMOZKO, 2007). Pode-se utilizar tecidos, células, ou qualquer outro tipo de material biológico que a proteína a ser estudada esteja inserida, para realizar o processo de isolamento (AUGUSTO, 2012).

Independente de como seja produzida a proteína ou peptídeo a ser estudado, é necessário encontrar a melhor maneira de extração, preservando o máximo da integridade deste a ser purificado (STRYER et al., 2007). Em tais procedimentos é aconselhável que o extrato bruto, que é um homogenato do tecido estudado, seja submetido a um tratamento em que haja separação de proteínas em diferentes frações, de acordo com suas propriedades que variam de tamanho e carga, geralmente uma fração será mais rica em determinada atividade e serve de fonte de

material para a aplicação subsequente de técnicas de purificação mais apuradas (NELSON; COX, 2014; STRYER et al., 2007).

A solubilidade de proteínas é reduzida em presença de alguns sais, um efeito chamado de *salting out* (**Fig. 11**), a concentração de sal na qual uma proteína precipita difere de uma proteína para a outra, de modo que esta técnica pode ser utilizada para fracioná-las, a técnica consiste no aumento gradativo da concentração de sal que competindo pela água de solvatação, acaba por tornar as proteínas do meio insolúveis, para isso é necessária a escolha correta de um sal que pode precipitar estas proteínas seletivamente como é o caso do sal sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), que possui alta solubilidade mesmo em temperaturas baixas; as proteínas precipitadas são retiradas da solução por meio de centrifugação, sendo resuspendidas posteriormente (NELSON; COX, 2014; GREEN; HUGHES, 1955; STRYER et al., 2007)

Figura 11: Precipitação de Proteína utilizando Sulfato de Amônio



Fonte: WENK e FERNANDIS, 2007

Outro processo que pode ser usado durante a de purificação de proteínas é a ultrafiltração. A filtração é um método suave e não desnaturante, isso é mais eficiente e flexível do que processos alternativos, ela separa materiais de diferentes tamanhos, por meio de uma barreira sólida, denominada filtro ou membrana, restringindo total ou parcialmente o transporte de uma ou várias moléculas

presentes na amostra. As moléculas que atravessam a membrana recebem o nome de filtrado ou clarificado e as moléculas que ficam retidas no filtro é denominado de retido ou concentrado (FISHER SCIENTIFIC, 2008; ALBANI e CRESPO, 2008)

A tecnologia de membrana de ultrafiltração (UF) (**Fig. 12**) tem sido de grande importância para a purificação, concentração e fracionamento de vários produtos em várias áreas, como indústrias de alimentos, farmacêutica e biotecnológica, e tem sido uma das melhores técnicas disponíveis para o enriquecimento de peptídeos (FOH, et al., 2010).

As membranas são usadas para concentrar uma solução de proteína de acordo com o seu corte de peso molecular (*molecular weight cut-offs- MWCO*), que normalmente variam de 1.000 a 1.000.000 Daltons, a função da membrana é deixar passar a água e moléculas pequenas, portanto as principais substâncias retidas pela UF são proteínas, polissacarídeos, substâncias particuladas, enzimas e coloides. A solução é direcionada contra a membrana por meio de pressão como, por exemplo, a centrifugação (LEIDENS, 2013; FOH, et al., 2010).

Figura 12: Membrana de ultrafiltração Corning® Spin-X® UF concentrators Spin-X UF 500 for samples up to 500uL; 10K MWCO.



Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/labware/labware-products.html?TablePage=102217592>

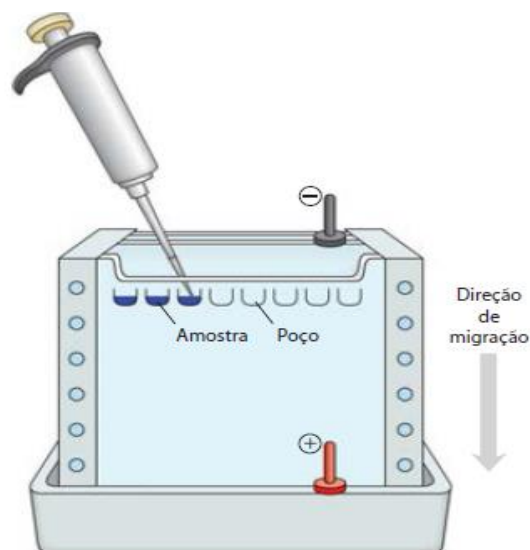
Com o objetivo de verificar se o esquema de purificação é eficiente umas das técnicas que podem ser usadas é a eletroforese (**Fig. 13**), pois é possível visualizar se o número de proteínas diminui em cada etapa de purificação, bem como a visualização da separação das proteínas. A eletroforese também pode ser utilizada para determinar propriedades cruciais de uma proteína, tal como seu ponto

isoelétrico, e estimar sua massa molecular (NELSON; COX, 2014; STRYER et al., 2007).

Em geral, a eletroforese de proteínas é realizada em géis compostos de polímeros reticulados de poliacrilamida, pois o gel funciona como uma peneira molecular que melhora a separação. A migração das proteínas que ocorre em função do seu tamanho e formato. As moléculas que são pequenas comparadas aos poros do gel, rapidamente se movem por ele, enquanto as moléculas muito maiores que os poros são praticamente imóveis. As moléculas de tamanho intermediário podem se mover pelo gel com níveis variados de facilidade, graças a força do potencial elétrico, as proteínas migram do eletrodo negativo para o positivo (NELSON; COX, 2014; STRYER et al., 2007).

A eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (geralmente referida como SDS-PAGE) é rápida, sensível e capaz de um alto grau de resolução. A utilização do detergente dodecil sulfato de sódio (SDS) possibilita a ligação da proteína a este e assim a conferência de carga negativa, que contribui para separá-las a partir de sua massa. Após a eletroforese as proteínas no gel podem ser visualizadas por meio da coloração com prata ou corantes como o azul de *Coomassie*, que revela uma série de bandas (STRYER et al., 2007).

Figura 13: Eletroforese



Fonte: NELSON; COX, 2014

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar a atividade de um inibidor de tripsina endógeno da larva do *Tribolium castaneum* mediante a uma purificação parcial.

3.2 Objetivos específicos

- Verificar o potencial do inibidor frente à tripsina bovina;
- Realizar etapas de purificação: precipitação salina e ultrafiltração;
- Comprovar a purificação por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE;
- Analisar a resistência do inibidor parcialmente purificado a altas temperaturas.

4 METODOLOGIA

4.1 Insetos

As larvas de *T. castaneum* eram cultivadas em colônias no Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM), do Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Estas larvas eram alimentadas exclusivamente com farinha de trigo e mantidas em potes de plástico com pequenos furos nas tampas, para possibilitar a passagem de ar. Os potes contendo as larvas eram por sua vez mantidos em uma estufa a temperatura de 30°C, umidade relativa entre 70 e 80% e fotoperíodo claro/escuro de 12h.

4.2 Preparação do extrato bruto

Para o preparo do extrato, foi utilizado 250mg de larvas para 1 ml de tampão de extração (Tris-HCl 50mM pH 8). As larvas foram devidamente homogeneizadas com o auxílio de grau e pistilo e então submetidos a uma etapa de centrifugação (12.000 rpm, 7 min a 4°C) o sobrenadante, denominado de Extrato Bruto (EB), foi coletado para realização dos ensaios de inibição da atividade enzimática, e continuidade dos experimentos laboratoriais.

4.3 Determinação da concentração da proteína totais

Para determinar a concentração de proteínas totais das amostras, foi usado o método de Bradford (1976), utilizando a Albumina de Soro Bovino para a criação da curva padrão (0,01mg/mL até 1mg/mL). As leituras foram realizadas em microplaca, utilizando as seguintes proporções para a reação: 10 µL da amostra + 190 µL de reagente de Bradford, totalizando um volume total de reação de 200 µL e para o branco foi usado 10 µL de água no lugar a amostra. Após o preparo da reação, as amostras foram incubadas por 5 min e logo em seguida medidas as absorbâncias a 595 nm como auxílio de uma leitora de microplacas (Flextation 3). O experimento foi

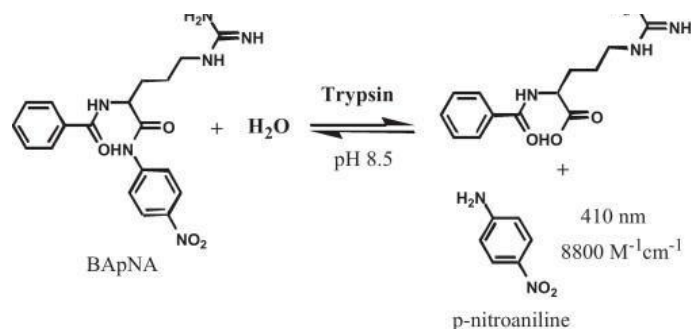
realizado em triplicata para cada amostra e as unidades correspondentes são mg/ml de proteína.

4.4 Ensaios de inibição tripsínica

Com o extrato bruto pronto foram realizados testes de inibição da tripsina bovina 1mg/ml (Sigma) usando diferentes concentrações de proteína do EB. Seguindo a metodologia de ERLANGER, KOKOWSKY e COHEN, 1961, que utiliza o cromógeno N-a-benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide (L-BApNA) como o substrato para a enzima tripsina, o ensaio foi feito em triplicata com as seguintes concentrações de proteínas: 50 µg, 150 µg e 300µg do EB para 10 ul de tripsina bovina a 1mg/ml, o volume da reação foi completado para 120 µl com tampão (Tris HCl 50 mM pH 8), a reação ficou por 30 minutos encubada a temperatura ambiente, após esse tempo foram utilizados 30µl de BApNa (50 mM dissolvido em dimetilsulfóxido), o branco foi feito com o extrato, nas condições indicada acima, 10 ul de tripsina a 1M e o volume foi completado com tampão para 120ul, e então as reações foram incubadas a 37° C por 30 minutos, para parar a reação utilizou-se 150µl de Ácido cítrico a 20%. Em uma placa de 96 poços, 200 µl de cada reação foi adicionado e as absorbâncias foram mensuradas a 410 nm utilizando uma leitora de microplacas (FlexStation 3).

A tripsina ao interagir com o grupo carbonil do BapNa, leva a uma reação de hidrólise da ligação envolvendo esse grupo, que libera a p-nitroanilida (**Fig.14**), que é um composto cromóforo que absorve luz no comprimento de onda em torno de 410 nm, enquanto reflete a cor amarela na solução enzimática como resposta positiva à presença da tripsina (SOUZA, 2018).

Figura 14: Ilustração de reação geral da hidrólise do BapNa pela Tripsina.



Fonte: Hinterwirth et al. 2012

4.5 Tratamento do extrato bruto com PMSF

PMSF a 10 mM foi adicionado a 200 µl de extrato bruto, depois de 24 horas foi feito um ensaio de atividade com 100, 150 e 300 µg de proteínas desse extrato para 10 µl de tripsina bovina a 1mg/ml, no controle não foi adicionado o extrato e para o branco foi adicionado todos os componentes menos o substrato BapNa, como já descrito anteriormente.

4.6 Precipitação salina com Sulfato de Amônio (NH₄)₂SO₄

Após a preparação do extrato bruto, foi tirado uma alíquota de 1 ml para a análises, o restante foi submetido ao fracionamento salino com o aumento gradativo de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) em cinco faixas 0-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% e 80-100% (m/v). A adição total de sal equivalente por cada fracionamento ocorreu de forma lenta e gradual sob uma agitação em baixa temperatura durante 1 hora, após essa etapa de solubilização do sal e precipitação proteica, as frações foram centrifugadas (12000 rpm x 15 minutos). Depois o sobrenadante foi retirado para continuidade do fracionamento salino e o precipitado foi ressuspendido em 1 ml de solução tamponante (Tris-HCl 50mM pH 8). Após a obtenção de todas as frações salinas, elas foram submetidas a um ensaio de inibição enzimática, com o objetivo de identificar a fração contendo a atividade biológica desejada.

4.7 Ensaio de inibição da Tripsina com as frações salinas do extrato

Ao fim de todo o fracionamento salino, as frações obtidas foram submetidas a um ensaio de inibição enzimática, as reações foram montadas em triplicata utilizando 45µg de proteína de cada fração e 10 µl de solução de tripsina 1M e então se procedeu com o teste de atividade como descrito anteriormente.

4.8 Ensaio para a comprovação da presença do inibidor na fração de interesse

Achada a fração que possuía a maior concentração de inibidor foi efetuado um novo ensaio com concentrações de proteínas variadas dessa fração (40, 80 e 160ug) seguindo a mesma metodologia descrita no tópico 4.4, com o objetivo de analisar a perfil da atividade inibitória dessa fração.

4.9 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE

As eletroforeses em gel de poliacrilamida contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) foi feita em uma concentração de 12% e 14% (m/v) para os géis de empilhamento e separação, como descrito por LAEMMLI, 1970. O tampão adicionado a amostra continha Tris-HCl pH 6,8, 0,0625 M; SDS 2%; glicerol 10%; β -mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,001%, posteriormente elas sofreram um aquecimento de 90°C por 7 minutos antes de serem aplicados na canaleta. A corrida foi realizada com voltagem constante de 120V durando aproximadamente 2 horas. Para revelação das proteínas o gel foi lavado com solução fixadora (50% metanol e 10% ácido acético qsp 100ml) por 15 minutos, depois lavado com água por 24 horas, emergido por 15 minutos em uma solução contendo 10,5 ml de NaOH a 0,36%, 1,25mL de NH₄OH a 21% e 0,4 g de AgNO₂ diluído em 2ml de água, após isso foi lavado por 3 vezes em água por 3 minutos e então submetido a uma solução reveladora (50 ml de água, 25ul de formaldeído a 37% e 25ul de ácido cítrico a 10%), a reação foi parada com a solução fixadora nas proporções descritas acima.

4.10 Membrana de Ultrafiltração

A última fração salina, a qual continha o inibidor, foi centrifugada sob refrigeração a 12.000 rpm por 10 minutos em seguida foi retirado sobrenadante, com o objetivo de limpar (filtrar) a solução proteica foi adicionado 400ul em uma membrana de ultrafiltração (Corning[®] Spin-X[®] concentradores UF Spin-X de UF 500 para amostras, com 500ul; 10kDa de limite de peso molecular), por vez, e

submetido a centrifugação a 10.000 rpm de 30 min em 30 min até obter a quantidade de filtrado desejada para os próximos testes.

4.11 Inibição tripsínica utilizando fração salina filtrada

Após etapa de filtração foi verificada a atividade do filtrado, utilizou-se um volume correspondente a 2ug de proteína e 10 ul de tripsina a 1M. A amostra concentrada também passou pelo ensaio de atividade, 30 ug de proteína dessa amostra foi utilizada para 10 ul de tripsina bovina a 1 mg/ml.

4.12 Ensaio de temperatura

A fração 80-100% filtrada foi submetida a um ensaio de temperatura o qual 200ul da amostra ficaram por 30 minutos em aquecimento a 90°C e depois foi verificada a atividade inibitória usando um volume correspondente a 2ug de proteína dessa amostra e 10ul de tripsina bovina a 1 mg/ml para a reação, seguindo o protocolo de atividade já descrito anteriormente.

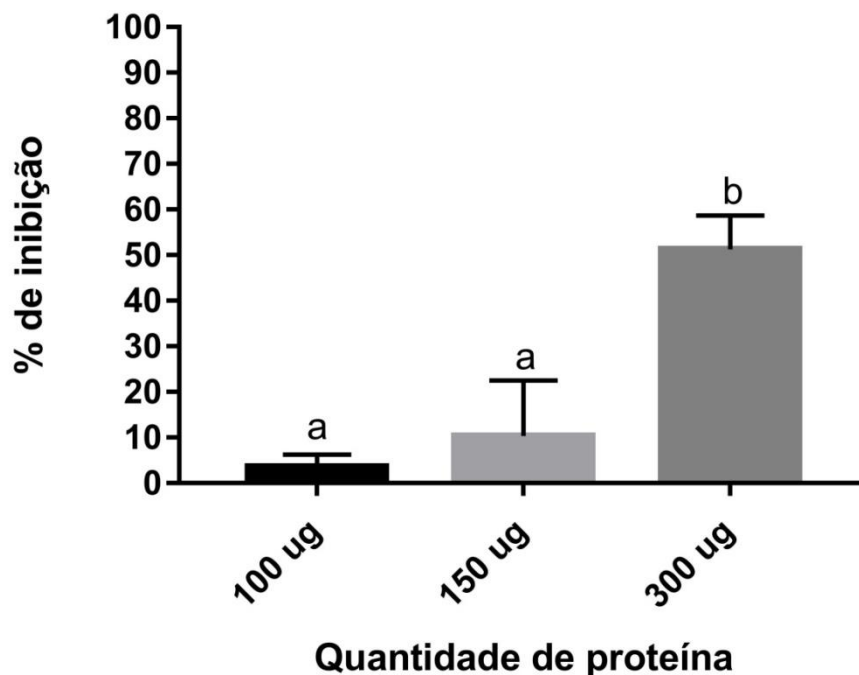
5 RESULTADOS E DISCURSÕES

5.1 Monitoramento da atividade de um inibidor de tripsina da Larva do *T. castaneum*

Para verificar a presença do inibidor na larva do inseto *T. castaneum* foi realizado um ensaio de inibição da tripsina bovina através do monitoramento da atividade tripsínica usando o substrato BApNa com três concentrações de proteína do extrato bruto da larva inteira (**Fig. 15**).

Os inibidores em insetos estão associados a tecidos como o tegumento, as gónadas, as glândulas salivais, o corpo gorduroso e a hemolinfa. Um estudo feito com *Mythimna unipuncta* comprovou a existência de dois inibidores de serino protease na hemolinfa da larva desse inseto (CHERQUI et al., 2001), já no inseto *Locusta migratoria* foi isolado inibidores pacifastin do corpo gorduroso, de células neurosecretoras e da hemolinfa (MER et al., 1994).

Figura 15: Inibição da tripsina bovina com diferentes concentrações do extrato bruto da larva do *T. castaneum*, A letra b demonstra diferença significativa com relação ao grupo com 100 e 150 ug de proteína, pelo teste ANOVA One Way. As barras acima das colunas expressam o desvio padrão.



Fonte: próprio autora.

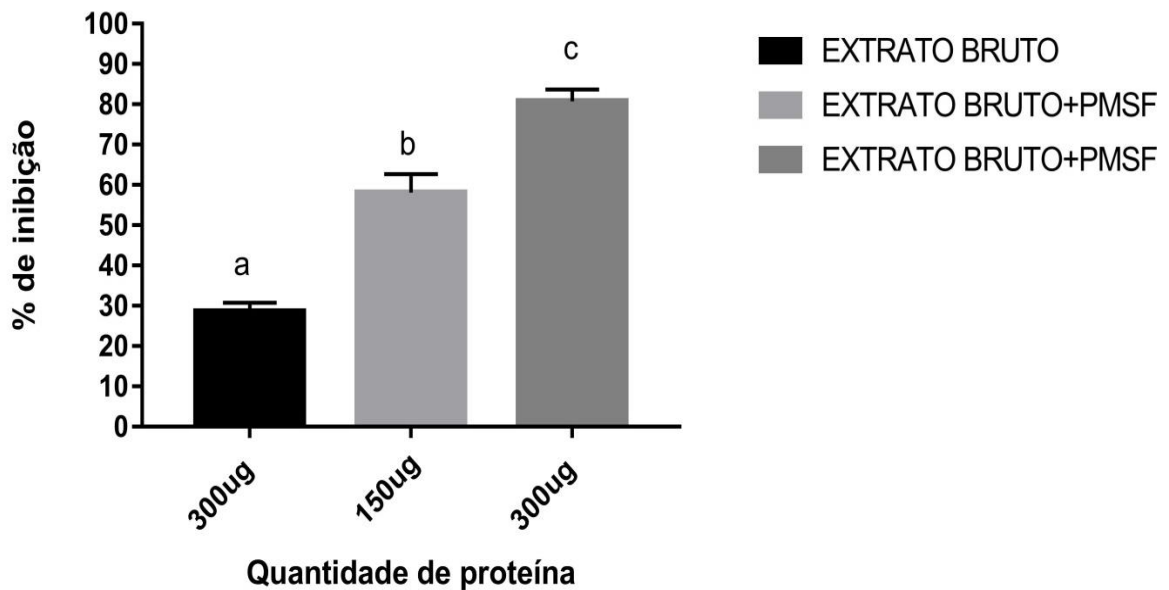
Com o resultado obtido pôde-se confirmar a presença de inibição da tripsina bovina causada pelo extrato da larva do inseto e também verificamos um aumento na porcentagem de inibição quando foi aumentada a quantidade de proteínas, assim podemos inferir uma relação de dose-dependência entre a concentração de proteína e as taxas de inibição, apesar de não ter tido uma diferença significativa de inibição entre os grupos com 100ug e o 150ug de proteína, provavelmente devido à pouca alteração na concentração de proteínas, observou-se que quando a quantidade de proteína foi aumentada para 300ug houve uma inibição de aproximadamente 50%.

5.2 Tratamento do extrato bruto com PMSF

O extrato bruto da larva do *T. castaneum* contém diversas proteínas, inclusive a tripsina endógena do inseto, visto isso não era possível dimensionar o verdadeiro potencial do inibidor, pois ele pode estar se ligando a serinoproteases endógenas diminuindo, assim, sua capacidade inibitória quando se adiciona a tripsina bovina.

Em uma alíquota de extrato bruto foi adicionado PMSF 10mM, um inibidor irreversível de serinoproteinase, avaliando o potencial inibitório dessa amostra ficou evidente um aumento na atividade do inibidor endógeno quando comparado a amostra que não foi tratada com PMSF (**Fig. 16**). Com 300ug de proteína do EB conseguiu-se inibir 30% da tripsina bovina, em contra partida, com apenas 150ug de proteína da amostra tratada com o PMSF conseguiu-se dobrar essa porcentagem (60%) e com 300ug dessa mesma amostra a inibição chegou a 80%.

Figura 16: Extrato bruto da larva do *T. castaneum* tratado com PMSF por 24 horas. As letras expressam diferenças significativas entre cada amostra de acordo com o teste One Way Anova as barras expressam o desvio padrão.



Fonte: próprio autora

Os resultados obtidos se dão provavelmente devido a inibição das serinoproteases, como a tripsina, presentes na larva do inseto, causada pelo PMSF. A literatura documenta que a tripsina-similar de outros insetos são inibidas pelo PMSF, como é o caso da tripsina da larva de *Ostrinia nubilalis* (BERNARDI et al. 1996), e as tripsinas parcialmente purificadas de *Anticarsia gemmatilis* (OLIVEIRA et al., 2005) e de *Sitophilus zeamais* (SILVA et al., 2010) que também se apresentaram sensíveis a esse inibidor.

O PMSF tem como característica um átomo de flúor ligado a um átomo de enxofre na sua molécula. A tripsina possui em seu sítio catalítico um aminoácido serina o qual tem uma cadeia lateral que promove um ataque nucleofílico a esse inibidor, que então, forma um composto tetraédrico relativamente estável que mimetiza o intermediário tetraédrico das reações das serinoproteases (DOS SANTOS, 2016). Tendo em vista os resultados obtidos, juntamente com as evidências de inibição das serinoproteases em outros insetos e com o mecanismo de ação do PMSF pode-se inferir que essa substância também conseguiu inibir as

serinoproteases do *T. castaneum*, ajudando, assim, a analisar melhor o real, possível, potencial do inibidor endógeno dele.

5.3 Fracionamento Salino

Como o extrato bruto foi feito com a larva de *T. castaneum* inteira, tornando-o uma amostra complexa, foi necessária a utilização de um fracionamento salino, que é usado como uma etapa de isolamento por conseguir reduzir a complexidade das amostras e separar as diversas substâncias que não são de interesse presentes nela.

A técnica *salting out* é bastante aplicada como método de purificação, e pode ser utilizada para purificar inibidores de proteases. Em 1992 TSUKAMOTO et al., utilizaram ela no isolamento de um inibidor de fenoxidase endógeno da *Musca domestica* L., assim como também foi utilizada no processo de purificação de um inibidor de protease do intestino do inseto *Leucophaea maderae* em 1980 por ENGELMANN e GERAERTS.

O fracionamento do extrato da larva do *T. castaneum* foi feito de acordo com a metodologia de GREEN e HUGHES (1955). A solubilidade das proteínas em água depende do pH e da força iônica, quando as proteínas se encontram em soluções aquosas apresentam-se fortemente hidratadas, desta forma é explicável que a adição de sal atrai moléculas de água, estas moléculas são mais atraídas pelo sal do que pela própria proteína, visto que há uma maior carga, desta forma as proteínas precipitam (WENK; FERNANDIS, 2007).

Após a realização da técnica, utilizando sulfato de amônio, foi feita a verificação da capacidade inibitória da tripsina através da hidrólise de BApNa utilizando 45 ug de proteína de cada uma das frações. Como demonstrado na **tabela 2** a maior concentração da substancia de interesse ficou na última fração, com cerca de 50% de inibição, comparando esse resultado com o ensaio de inibição com o extrato bruto pode-se verificar que com 45ug de proteínas da fração salina tivemos o mesmo percentual de inibição que com 300ug de proteína do extrato bruto o que

indica que houve uma remoção significativa de contaminantes e um enriquecimento na atividade inibitória.

Tabela 2: Fracionamento salino utilizando 45 ug de proteína de cada fração para efetuar o ensaio de inibição.

% de Sulfato de amônio	% de inibição
Bruto	0%
0-20	2,8%
20-40	0%
40-60	0%
60-80	0,94%
80-100	50,16%

Fonte: própria autora

O fato do inibidor está concentrado na última fração dá a possibilidade de inferir que ele possui uma alta solubilidade, já que o *salting out* remove proteínas que se agregam facilmente a medida que a concentração de sal vai aumentando, ou seja, proteínas ou peptídeos menos solúveis, já aquelas que permanecem em solução, mesmo com grandes quantidades de sal, são ditas como muito solúveis. (DOUNG-LY e GABELLI, 2014).

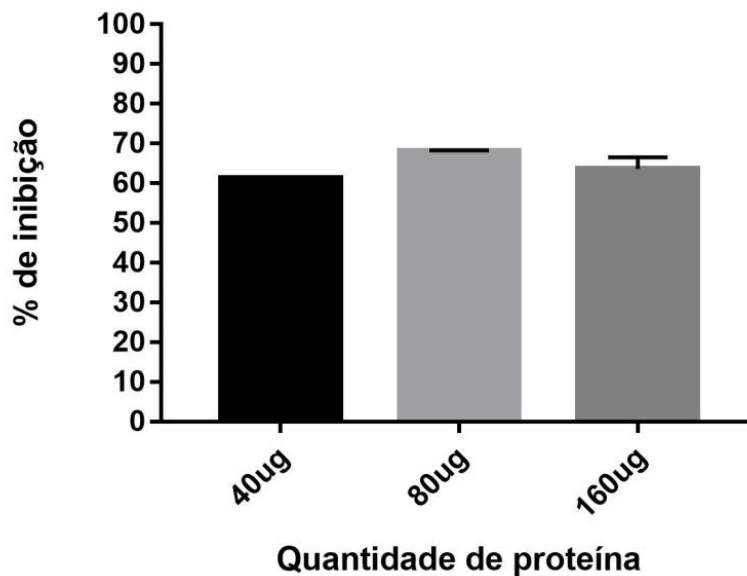
5.4 Atividade inibitória da fração de interesse

Para confirmar a presença do inibidor de tripsina na fração 80-100% foi realizado um ensaio com diferentes concentrações 40ug, 80ug e 160ug de proteína dessa fração. O resultado obtido (**Figura 17**) confirmou a presença do inibidor nessa fração e também se notou que, por mais que se aumente a quantidade de inibidor na reação, a capacidade de inibir a tripsina bovina permanece em cerca de 60% ou seja, a inibição não diferiu significativamente entre as concentrações.

Uma explicação para esse resultado pode ser a não especificidade do inibidor pela tripsina, ou seja, ele pode está se ligando a outras substâncias presentes na

mostra, além dessa enzima. A especificidade de um inibidor por uma determinada classe de proteases pode estar relacionada a alguns fatores como: composição, conformação do sítio reativo, arquitetura global da molécula de inibidor e tipo de inibição exercida (KRAUCHENCO et al, 2003).

Figura 17: Inibição da tripsina bovina com diferentes concentrações da fração 80-100% do extrato da larva do *T. castaneum*, teste ANOVA One Way. As barras acima das colunas expressam o desvio padrão.



Fonte: próprio autora

5.5 Ultrafiltração da fração 80-100%

Para melhores resultados nas etapas seguintes de purificação do inibidor foi necessária à utilização de uma membrana de ultrafiltração com o intuito de concentrar a amostra, porém o processo não obteve o resultado esperado, pois o inibidor ultrapassou a membrana. Por outro lado, essa filtração proporcionou a retirada de mais alguns contaminantes, como proteínas mais pesadas que ficaram retidas na membrana, deixando assim a amostra ainda mais limpa.

O filtrado e o concentrado foram submetidos ao ensaio de inibição da tripsina bovina, os resultados presentes na **tabela 3** comparam essas duas amostras com a fração salina 80-100% e fica evidente que, mesmo com uma menor quantidade de proteína, o filtrado possui uma maior porcentagem de inibição do que o concentrado, por esse motivo essa amostra foi escolhida para dar continuidade aos experimentos.

Tabela 3: Inibição da tripsina bovina pela fração 80-100% filtrada e concentrada do extrato da larva do *T. castaneum*.

AMOSTRA	ug de proteína	ul de tripsina bovina a 1mg/ml	% de inibição
FRAÇÃO 80-100%	40ug	10ul	66%
CONCENTRADA	30ug	10ul	45%
FILTRADA	2ug	10ul	58%

Fonte: elaborado pela autora

A membrana de ultrafiltração utilizada tinha corte de peso molecular de 10kDa, sendo assim podemos inferir que o inibidor estudado possui peso molecular menor que 10kDa, já que ele conseguiu ultrapassá-la. Em literatura já foi relatado inibidores de tripsina endógenos de insetos com massas moleculares pequenas como, por exemplo, HAMDAR et al. (1998) que purificaram cinco peptídeos ovarianos de 4 kDa inibidores de gafanhotos do deserto (*Schistocerca gregária*), KURIOKA et al (1999) encontraram um inibidor de 6 kDa em *Bombyx mori*, RAMESH et al. em 1988 isolaram dois peptídeos de 8 kDa e 9 kDa de *Manduca sexta*, em 2000 FRÖBIUS e colaboradores purificaram três inibidores de serinoproteases da larva de *Galleria mellonella* com os seguintes pesos moleculares: 9,2 kDa, 6,3 kDa, e 8,2 kDa e em 2004, AZZOLINI et al. isolaram um inibidor com peso molecular de 7 kDa, presente na cabeça e tórax de *Haematobia irritans irritans*, capaz de inibir a tripsina bovina e a elastase de neutrófilos humanos.

5.6 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida SDS-PAGE

Para a verificação do perfil proteico e da efetividade do processo de diminuição de contaminantes da fração que contém o inibidor de tripsina e do filtrado foi feito um gel SDS-PAGE a 14%, seguindo a metodologia de LAEMMLI (1970), nesses géis as proteínas são separadas, dentre outros aspectos, por seus pesos moleculares.

Na **figura 19** na canaleta **a** foi aplicado o extrato bruto, onde podemos visualizar que na larva do inseto há uma grande complexidade proteica. Na canaleta **b** foi aplicada a fração 80-100%, aquela que demonstrou maior potencial inibitório, ficando nítido que houve uma diminuição dos contaminantes quando comparado ao EB, já na canaleta **c** verificamos o perfil proteico do filtrado da fração salinha 80-100% e fica evidente a maior pureza da amostra, apresentando poucas bandas. Com esses resultados fica claro que os métodos utilizados em busca da purificação do inibidor estão sendo eficazes, pois serviram para retirar substâncias que não são de interesse, deixando a amostra mais limpa.

Figura 17: Gel SDS-PAGE 14% corado com nitrato de prata, Linha a: extrato bruto, linha b: precipitação salina 80-100% (NH₄)₂SO₄ (m/v), linha c: filtrado da fração 80-100%.



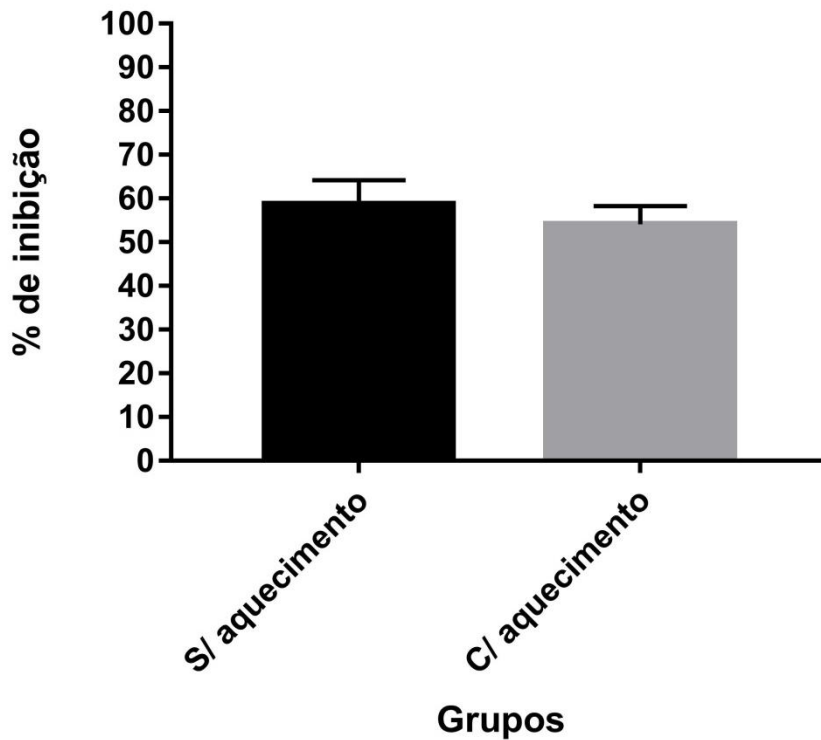
Fonte: elaborado pela autora

5.7 Resistência térmica

Em altas temperaturas a maioria das proteínas acabam sofrendo mudanças conformacionais, devido ao rompimento de algumas ligações e interações fracas, um processo conhecido como desnaturação, processo este que, no caso da temperatura, na maior parte das vezes, é algo irreversível (NELSON; COX, 2014).

A amostra filtrada foi submetida a um teste de resistência térmica, para verificar se o inibidor de tripsina presente na amostra era resistente a altas temperaturas, foi notado que ao deixar a amostra por 30 minutos a 90° C ela ainda manteve seu poder de inibição semelhante à amostra que não passou por aquecimento.

Figura 18: Inibição da tripsina bovina com filtrado da fração 80-100% do extrato da larva do *T. castaneum* submetido a aquecimento de 90°C.



Fonte: própria autora

Contrapondo esses resultados com outros presentes em literatura foi observado que inibidores com baixo peso molecular foram purificados de inseto como KURIOKA et.al (1999) que purificaram um peptídeo de 6 kDa que é estável ao calor e ao ácido e inibe a tripsina bovina em *Bombyx mori*. RAMESH et al. em 1988 purificaram e caracterizaram dois inibidores de tripsina da hemolinfa de larvas de *Manduca sexta*, que sob condições redutoras em géis de poliacrilamida tiveram seus pesos moleculares estimados de 8 kDa e 9 kDa e ambos os inibidores foram estáveis a 100° C quando deixados a essa condição por pelo menos 30 min.

Desta forma, o inibidor de tripsina do *T. castaneum* pode ser uma substância promissora para o uso em produtos que precisem de altas temperaturas, pois não haverá perda da sua atividade.

6 CONCLUSÃO

A busca por inibidores de proteases se dá devido a uma ampla gama de utilidades nos setores farmacêutico, biotecnológico e agrícola. Os IPs podem ajudar no tratamento de várias doenças humanas como malária, câncer e AIDS que são causadas por um desequilíbrio de eventos proteolíticos e vias incorretas de sinalização de protease, além disso, podem ser uma solução para o controle de pragas, evitando que plantações sejam destruídas e perdas econômicas.

A metodologia utilizada em busca da purificação um inibidor de tripsina da larva do *T. castaneum* se mostrou bastante eficaz, visto que até a fase de ultrafiltração da fração 80-100% conseguiu-se diminuir consideravelmente o número de contaminantes, como fica evidente no gel SDS-PAGE com poucas bandas e na redução da atividade tripsínica em 58% com apenas 2 μ g de proteínas do filtrado, essa amostra também foi submetida a tratamento térmico de 90 $^{\circ}$ C constatando que o inibidor conservou sua funcionalidade mesmo quando submetido a altas temperaturas.

Os resultados descritos nesse trabalho comprovam a presença de um inibidor na larva do inseto *T. castaneum* capaz de reduzir a atividade da enzima tripsina, levantando a hipótese que ele está associado a mecanismos complexos da sua fisiologia. Este inibidor é pequeno, bastante solúvel e resistente a altas temperaturas, características essas que podem ser importantes para futuras aplicações biotecnológicas, ajudar na elucidação de mecanismos de inibidores de tripsina e a entender a fisiologia do inseto.

As perspectivas do trabalho incluem solidificar uma rota de purificação do inibidor, caracteriza-lo, por meio de ensaios de temperatura, pH ótimos e cinética afim de elucidar o mecanismo de inibição, e buscar aplicações biotecnológicas para o mesmo.

REFERÊNCIAS

- ALBANI, Silvia Maria Ferreira; CRESPO, Joaquim Cabrera. **Métodos alternativos de purificação do polissacarídeo capsular de Haemophilus influenzae tipo b**. 2008. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- ALBUQUERQUE, C.; GARCÍA-CARREÑO, F.L.; NAVARRETE DEL TORO, M.A. (2002) Trypsin and trypsin inhibitors from Penaeid shrimp. **J Food Biochem** 26:233–251, 2002
- ASANO, T., ASHIDA, M., Cuticular pro-phenoloxidase of the silkworm, Bombyx mori. Purification and demonstration of its transport from hemolymph. **OJ Biol Chem**. 2001 vol.276(14), p.11100-11112.
- AUGUSTO, C.V. et al. Giant Amazonian fish pirarucu (*Arapaima gigas*): its viscera as a source of thermostable trypsin. **Food chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1596-1602, 2012.
- AZZOLINI, S. S. et al. Purification, characterization, and cloning of a serine proteinase inhibitor from the ectoparasite *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae). **Experimental parasitology**, v. 106, n. 3-4, p. 103-109, 2004.
- BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. Reverté, 2007.
- BERNARDI, R. et al. Isolation and some molecular properties of a trypsin-like enzyme from larvae of European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hübner (Lepidoptera: pyralidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 8-9, p. 883-889, 1996.
- BERNARDO QUÍMICA. **Manual de identificação de pragas de produtos armazenados**. 3 Ed. São Vicente, 2006.
- BODE, W.; SCHWAGER, P. The single calcium-binding site of crystallin bovin beta-trypsin. **FEBS Letters**, v. 56, n. 1, p. 139–143, 1975.
- BOWN, D.P.; WILKINSON, H.S.; GATEHOUSE, J.A. Differentially regulated inhibitor- sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.27, p.625-638, 1997.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- BREUGELMANS, B. et al. Pacifastin-related peptides: structural and functional characteristics of a family of serine peptidase inhibitors. **Peptides**, v. 30, n. 3, p. 622-632, 2009.
- CHICUTA, C. P. de L.. Avaliação do efeito do extrato e de frações proteicas das sementes de *Crotalaria stipularia* (Desv., 1814) (Fabales: Fabaceae) sobre a sobrevivência e parâmetros nutricionais de *Tribolium castaneum* (HERBST, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae). 2020
- CHERQUI, A.; CRUZ, N; SIMÕES, N., Purification and characterization of two serine protease inhibitors from the hemolymph of *Mythimna unipuncta*, **Insect Biochem Mol Biol.**, volume 31, 2001, Pag. 761-769
- DELCROIX, M. et al. A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 51, p. 39316-39329, 2006.
- DEVLIN, T. M.; TOMA, L.. **Manual de bioquímica: com correlações clínicas**. 2007.
- DIAZ-MENDOZA, M. et al. Diversity of trypsins in the Mediterranean corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae), revealed by nucleic acid sequences and enzyme purification. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 35, n. 9, p. 1005-1020, 2005

DÖNITZ, J.; GROSSMANN, D.; SCHILD, I.; SCHMITT-ENGEL, C.; BRADLER, S.; PRPIC, N. M.; BUCHER, G. TrOn: An Anatomical Ontology for the Beetle *Tribolium castaneum*. **Plos One**. v.8, 8p, 2013.

DUONG-LY, K, C.; GABELLI, S. B. Salting out of proteins using ammonium sulfate precipitation. **Methods in enzymology**, v. 541, p. 85-94, 2014.

EGUCHI, M., Protein protease inhibitors in insects and comparison with mammalian inhibitors, **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, volume 105, 1993, p. 449-456

ELIAS, M.C.; LORINI, I.; OLIVEIRA, M.; MORÁS, A.; SCHIAVON, R.A. Pragas e microorganismos no armazenamento de grãos e derivados. In: ELIAS, Moacir Cardoso. **Manejo tecnológico da secagem e do armazenamento de grãos**. Ed. Santa Cruz. Pelotas, 2008.

ENGELMANN, F.; GERAERTS, W. PM. The proteases and the protease inhibitor in the midgut of *Leucophaea maderae*. **Journal of Insect Physiology**, v. 26, n. 10, p. 703-710, 1980.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W.. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 95, n. 2, p. 271-278, 1961.

FARONI, L. R. A.; SOUSA, A. H. Aspectos biológicos e taxonômicos dos principais insetos-praga de produtos armazenados. **Tecnologia de armazenagem em sementes. Campina Grande: UFCG**, v. 1, p. 371-402, 2006.

Fisher Scientific, Corning® Spin-X® UF Concentrator Selection and Use Guide, Reino Unido, 2008.

FOH, Mohamed Beva Kelfala et al. Influence of ultrafiltration on antioxidant activity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 2, n. 5, p. 227-235, 2010.

FRÖBIUS, A. C. et al. Isolation and characterization of novel inducible serine protease inhibitors from larval hemolymph of the greater wax moth *Galleria mellonella*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 7, p. 2046-2053, 2000.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA-NETO, S. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, SP: FEALQ, 920 p, 2002.

GREEN, A. A.; HUGHES, W. L. [10] Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. **Methods in Enzymology**, Volume 1, 1955, p. 67-90.

GUBB A, D.; SANZ-PARRAA, A.; BARCENAA, L.; TROXLERB, L. ; FULLAONDO, A., Protease inhibitors and proteolytic signalling cascades in insects, **Biochimie**, vol.92, 2010, p.1749-1759

HABIB,H.; KHALID, M. F., Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnol. Mol. Biol. Rev.**, vol.2, 2007, p. 68-85

HAMDAOUI,L.;SCHOOF S, S.; WATELEB , LY;BOSCH , P.; VERHAERT , E.; WAEKENS ,A; ALOO F, A.. Purification of a Novel, Heat-Stable Serine Protease Inhibitor Protein from Ovaries of the Desert Locust, *Schistocerca gregaria*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, volume 238, 1998, P. 357-360

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica ilustrada**. Artmed Editora, 2015.

HEDSTROM, L.. Serine protease mechanism and specificity. **Chemical reviews**, v. 102, n. 12, p. 4501-4524, 2002.

- HINTERWIRTH, H.; LINDNER, W.; LÄMMERHOFER, M. Bioconjugation of trypsin onto gold nanoparticles: effect of surface chemistry on bioactivity. *Analytica chimica acta*, v. 733, p. 90-97, 2012.
- JAMES, G. T. Inactivation of the protease inhibitor phenylmethylsulfonyl fluoride in buffers. **Analytical biochemistry**, v. 86, n. 2, p. 574-579, 1978.
- JIANG, H.; KANOST, M. R. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 30, n. 2, p. 95-105, 2000.
- JIMÉNEZ-VEGA, Florinda; VARGAS-ALBORES, Francisco. A four-Kazal domain protein in *Litopenaeus vannamei* hemocytes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 29, n. 5, p. 385-391, 2005.
- KANOST, M. R., Isolation and characterization of four serine proteinase inhibitors (serpins) from hemolymph of *Manduca sexta*, **Insect Biochemistry**, Volume 20, 1990, p. 141-147.
- KANOST, M.R., Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Dev. Comp. Immunol.** 1999, p.291-301.
- KISHIMURA, H., et al. Characteristics of trypsin from the pyloric ceca of walleye pollock (*Theragra chalcogramma*). **Food Chemistry**, v. 106, n. 1, p. 194-199, 2008.
- KONG et al. Luminal Trypsin may regulate enterocytes through proteinase- activated receptor 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.94, n. 16, 1997.
- KRAUCHENCO, S; et al. Crystal structure of the Kunitz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 312, n. 4, p. 1303-1308, 2003.
- KRAUT, Joseph. Serine proteases: structure and mechanism of catalysis. **Annual review of biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 331-358, 1977.
- KREM, M. M.; DI CERA, E.. Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation. **Trends in biochemical sciences**, v. 27, n. 2, p. 67-74, 2002.
- KUBO, C. E. G.. Efeito de um inibidor de proteinase serinica sobre o desenvolvimento e atividade enzimatica de *Heliothis virescens* (Lepidopter: Noctuidae). 2007. 68f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP.
- KUNAKBAEVA, Z.; CARRASCO, R.; ROZAS, I. An approximation to the mechanism of inhibition of cystein proteases: nucleophilic sulphur addition to Michael acceptors type compounds. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 626, n. 1-3, p. 209-216, 2003.
- KUNITZ, Mf. Crystalline soybean trypsin inhibitor, **Journal of general physiology**., 29 (1946), pp. 149-154
- KUNITZ, Mf. Crystalline soybean trypsin inhibitor: II. General properties. **The Journal of general physiology**, v. 30, n. 4, p. 291-310, 1947.
- KURIOKA, A., YAMAZAKI, M., HIRANO, H., Primary structure and possible functions of a trypsin inhibitor of *Bombyx mori*. **Eur J Biochem.** 1999, vol.259, p.120-126.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680, 1970.
- LAM, W.; COAST, G.M.; RAYNE, R.C. Characterization of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.30, p.85-94, 2000.
- LASKOWSKI, B.C. ; JAFFE, R.L.; KOMORNICKI, A., AB initio calculations of phenylene ring motions in polyphenylene oxide, **Int. J. Quantum Chem.** Vol.29, 1986, p. 563-578.

LASKOWSKI, M. JR. AND KATO, I., Protein inhibitors of proteinases. **Ann. Rev. Biochem.** 1980.

LEIDENS, Natay, **Concentração das proteínas do soro de leite de ovelha por ultrafiltração e determinação das propriedades funcionais dos concentrados proteicos**, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2013.

MAEDA-MARTÍNEZ, A. M. et al. Trypsin-like enzymes from two morphotypes of the 'living fossil' Triops (Crustacea: Branchiopoda: Notostraca). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 126, n. 3, p. 317-323, 2000.

MARES-GUIA, M.; SHAW, E.. Studies on the Active Center of Trypsin THE BINDING OF AMIDINES AND GUANIDINES AS MODELS OF THE SUBSTRATE SIDE CHAIN. **Journal of biological chemistry**, v. 240, n. 4, p. 1579-1585, 1965.

MER, G. et al. Solution structure of PMP-D2, a 35-residue peptide isolated from the insect *Locusta migratoria*. **Biochemistry**, v. 33, n. 51, p. 15397-15407, 1994.

MÓTYÁN, J.A.; TÓTH, F.; TÓZSÉR, J., Research Applications of Proteolytic Enzymes in Molecular Biology, **Biomol. Ther.** , Vol.3, 2013, pp. 923 – 942.

MOURÃO, C. B. F., Nova classe de inibidor de serinopeptidase presente na peçonha do escorpião *Tityus obscurus*. 2016. xxiii, 228 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Molecular)-Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger - 6ª Ed. 2014. Editora Artmed.

NIRMALA, X., KODRÍK, D., ZUROVEC, M., SEHNAL, F., Insect silk contains both a Kunitz-type and a unique Kazal-type proteinase inhibitor, **Eur J Biochem.** 2001, vol.268, p.2064-2073.

NORIEGA, F.G., WELLS, M.A.. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. **J Insect Physiol** 45:613–620, 1999.

OLIVEIRA, A.S.; XAVIER-FILHO, J.; SALES, M.P.; 2003. Cysteine proteinases and cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol.46, p.91 – 104

OLIVEIRA, MGA et al. Purificação parcial e caracterização de proteases digestivas semelhantes à tripsina da lagarta do feijão de veludo, *Anticarsia gemmatalis*. **Bioquímica e Fisiologia Comparada Parte B: Bioquímica e Biologia Molecular** , v. 140, n. 3, pág. 369-380, 2005.

POLANOWSKI, A., WILUSZ, T. , Serine proteinase inhibitors from insect hemolymph, **Acta Biochimica Polonica**, Vol.43, p.445-453, 1996

PUZZI, D. **Manual de Armazenamento de Grãos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977.

QURESHI, A.S.; BHUTTO, M.A.; KHUSHK, I.; DAHOT, M.U., Optimization of cultural conditions for protease production by *Bacillus subtilis* EFRL 01, **African Journal of Biotechnology**, Vol. 10(26), pp. 5173-5181, 2011.

RAI, S., AGGARWAL, K.K., MITRA, B., DAS, T.K., BABU, C.R., Purification, characterization and immunolocalization of a novel protease inhibitor from hemolymph of tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. **Peptides**. 2010, vol.31, p.:474-81.

RAMACHANDRAN, R.; NOORBAKHS, F.; DEFEA, K.; HOLLENBERG, M.D., Targeting proteinase-activated receptors: therapeutic potential and challenges , **Nature Reviews Drug Discovery**, volume: 11, p.69–86, 2012.

RAMESH, N.; SUGUMARAN, M.; MOLE, J. E., Purification and characterization of two trypsin inhibitors from the hemolymph of *Manduca sexta* larvae, **J. Biol. Chem.**, 263 (1988), p. 11523-11527

RANASINGHE, S.; MCMANUS, D.P.; Structure and function of invertebrate Kunitz serine protease inhibitors. **Developmental & Comparative Immunology**, Vol.39, 2013, p. 219-227.

RAO, M. B. et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D.P.; BARRETT, AJ. MEROPS: o banco de dados da peptidase, **Nucleic Acid Res.** Vol. 32, 2004 , p. 160 – 164

RAWLINGS, N. D.; TOLLE, D.P.; BARRETT, AJ., Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochem J.**, 2004, vol.378, p.705-716.

RIBEIRO, J. A. do N. C.. Ação sacietogênica de um inibidor de tripsina da semente de tamarindo (*Tamarindus indica* L.). 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica, Universidade do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

RICHARDS, S.; GIBBS, R. A.; WEINSTOCK, G. M.; BROWN, S. J.; DENELL, R.; BEEMAN, R. W.; GIBBS, R.; BEEMAN, R. W.; BROWN, S. J.; BUCHER, G. et al. *Tribolium* genome sequencing consortium. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. **Nature**. v. 452, p. 949–955, 2008.

ROBERTS, R.M.; MATHIALAGAN, N.; DUFFY, J.Y.; SMITH, G.W.; Regulation and regulatory role of proteinase inhibitors. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene. Expression**, Vol. 5, p. 385-436, 1995.

SALVESEN, G.; PARKES, C.; ABRAHAMSON, M.; GRUBB, A.; BARRET, A.J., Human low – Mr kininogen contain three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. **Biochem. J.**, 1986, vol.234, p. 429 – 434.

SANTOS, Cláudio Wiliam Victor dos. Purificação e caracterização de tripsina a partir do ceco-pilórico do Pacamã (*Lophosilurus alexandri*). 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

SAUL, S.J.; SUGUMARAN, M., Protease inhibitor controls prophenoloxidase activation in *Manduca sexta*. **FEBS Lett.** 1986 vol.208, p.113-116.

SAWANT, R.; NAGENDRAN, S., Protease: an enzyme with multiple industrial applications , **World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences**, Vol. 3 , 2014, , Pp. 568 – 579

SCHRØDER LEIROS, H. K.; WILLASSEN, N. P.; SMALÅS, A. O. Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins: Elucidating the molecular basis of cold-adaptation. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 4, p. 1039-1049, 2000.

SILVA, L. B. et al. Partial purification and characterization of trypsin-like proteinases from insecticide-resistant and-susceptible strains of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 155, n. 1, p. 12-19, 2010.

SILVERTHORN, D. U.. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. Artmed editora, 2010.

SOUZA, C. B. de. Isolamento e caracterização da tripsina do ceco pilórico da espécie *Scomberomorus brasiliensis* (Serra). 2018. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2018.

SZECSEI, P.B., The aspartic proteases, **Scand. J. Clin. Lab. Investig. Suppl.**, vol: 210, 1992, pp. 5-22

TERRA, W. R. et al. Digestive enzymes. In: **Biology of the insect midgut**. Springer, Dordrecht, 1996. p. 153-194.:

TSUKAMOTO, Takuji et al. Identificação e isolamento de inibidores endógenos da fenoloxidase de insetos. **Comunicações de pesquisa bioquímica e biofísica**, v. 184, n. 1, p. 86-92, 1992.

VAN DE LOCHT, A. et al. Two heads are better than one: crystal structure of the insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin. **The EMBO journal**, v. 14, n. 21, p. 5149-5157, 1995.

VISETNAN, S. et al. Kazal-type serine proteinase inhibitors from the black tiger shrimp *Penaeus monodon* and the inhibitory activities of SPIPm4 and 5. **Fish & shellfish immunology**, v. 27, n. 2, p. 266-274, 2009.

WENK, M. R.; FERNANDIS, A. Z. A, Manual for biochemistry protocols. **World Scientific**, 2007.

ZOU, Z., EVANS, J.D., LU, Z., ZHAO, P., WILLIAMS, M., SUMATHIPALA, N., HETRU, C., HULTMARK, D., JIANG, H.; Comparative genomic analysis of the *Tribolium* immune system. **Genome Biology**, 2007, 8:R177.