

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LARISSA COSTA SANTOS

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UM INIBIDOR DE PROTEASE DA LARVA
DO INSETO *Tribolium castaneum*

MACEIÓ

2024

LARISSA COSTA SANTOS

CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UM INIBIDOR DE PROTEASE DA
LARVA DO INSETO *Tribolium castaneum*

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal de Alagoas,
como requisito parcial para a obtenção
do título de mestre em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luciano
Aparecido Meireles Grillo

MACEIÓ

2024

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

Bibliotecária: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4/661

- S237c Santos, Larissa Costa.
Caracterização bioquímica de um inibidor de protease da larva do inseto *Tribolium castaneum* / Larissa Costa Santos. – 2024.
56 f : il.
- Orientador: Luciano Aparecido Meireles Grillo.
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2024.
- Bibliografia: f. 52-56.
1. *Tribolium castaneum*. 2. Inibidor enzimático. 3. Caracterização bioquímica.
4. Besouro da farinha. I. Título.

CDU: 615:66.097.8



Ata de Defesa

Aos **vinte e seis dias** do mês de **março de 2024**, às oito horas, reuniu-se, via videoconferência, através de link: a banca examinadora composta pelos docentes doutores Francis Soares Gomes e Maria Aline Barros Fidelis de Moura, para a **defesa** da dissertação intitulada: **“Caracterização Bioquímica de um inibidor de protease da Larva do Inseto *Tribolium Castaneum*”**, elaboradora pela mestranda **Larissa Costa Santos**, regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Nível Mestrado, sob a orientação do **Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo**, que presidiu os trabalhos. Em seguida, reunidos em sessão secreta às 9:30 horas, os examinadores emitiram o seguinte parecer: **APROVADA**

Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada às 9:40 horas e eu, Daniel de Brito Ricarte, Secretário do PPGCF, Mestrado, lavrei a presente ata que segue assinada pela banca examinadora e pela mestranda.

Maceió, 26 de março de 2024

Presidente (Orientador): Prof. Dr. Luciano Aparecido Meireles Grillo

Documento assinado digitalmente
gov.br LUCIANO APARECIDO MEIRELES GRILLO
Data: 26/03/2024 09:20:17-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinadora Interna: Profa. Dra. Maria Aline Barros Fidelis de Moura

Documento assinado digitalmente
gov.br MARIA ALINE BARROS FIDELIS DE MOURA
Data: 27/03/2024 10:54:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Examinador Externo: Prof. Dr. Francis Soares Gomes

Documento assinado digitalmente
gov.br FRANCIS SOARES GOMES
Data: 27/03/2024 11:08:53-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mestranda: Larissa Costa Santos

Documento assinado digitalmente
gov.br LARISSA COSTA SANTOS
Data: 27/03/2024 12:38:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Gidivan e Lucineide, sou grata por todo o
apoio de sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por orientar minha jornada, mostrando-me que estou no caminho certo e por sempre colocar pessoas iluminadas em meu caminho. Expresso profunda gratidão à minha mãe, Lucineide, minha maior incentivadora, que não poupa esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos. Ao meu pai, Gidivan, agradeço por todo apoio, incentivo e pelo constante suporte aos meus estudos, assim como à minha irmã, Letícia.

À minha tia Luciene, expresso meu agradecimento por sempre me tratar como uma filha. Agradeço também aos meus avós, José, Josefa, Genésio e Josefa, que cuidam de mim desde a infância e continuam a se preocupar com meu bem-estar, desempenhando um papel fundamental em minha formação. Aos meus tios, tias, primos e primas, que apoiaram e torceram por mim ao longo desta jornada, minha sincera gratidão.

Ao Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM), que me acolheu desde a graduação, expresso minha gratidão. Agradeço ao Professor Luciano Grillo pelo apoio e pela confiança. Aos colegas e amigos que fizeram e fazem parte do LBM deixo meu sincero agradecimento por todos os ensinamentos e por tornarem o dia a dia mais leve, Thomás, Josiel, Alícia, João, Robert, Camila R. Camilla C., Erika, Luana, Valéria, Thays, Julia, Mariana, Meirielly, vocês são inspiração para mim.

Por fim, agradeço a Universidade Federal de Alagoas, ao Instituto de Ciências Farmacêuticas, aos laboratórios parceiros, a CAPES, pelo provimento do auxílio financeiro, banca examinadora por aceitar o convite e por toda a contribuição e aos meus professores que foram essenciais para a minha formação.

EPÍGRAFE

*Metade de mim agora é assim
De um lado a poesia, o verbo, a
saudade
Do outro, a luta
Força e coragem pra chegar no fim

E o fim é belo, incerto
Depende de como você vê
O novo, o credo
A fé que você deposita em você e só*

- Anitelli, Fernando, 2012

(O Teatro Mágico)

RESUMO

Inibidores de protease são substâncias que possuem a capacidade de regular a ação das proteases, bloqueando sua atividade catalítica. Muitos desses inibidores são produzidos naturalmente pelo organismo visando manter a homeostase. Os inibidores de protease têm sido objeto de estudo devido ao seu potencial biotecnológico no controle de pragas, indústria de alimentos, pesquisa de novos medicamentos e também para aumentar a compreensão dos mecanismos de inibição. O presente trabalho teve o objetivo de investigar a atividade inibitória e as características bioquímicas de um inibidor de protease presente no inseto *Tribolium castaneum* e testar sua atividade antifúngica contra um fungo fitopatogênico. A primeira etapa foi identificar em qual fase do ciclo de vida do inseto há uma maior produção do inibidor. Depois, para aprimorar a pureza da amostra, o extrato foi submetido às técnicas de purificação, como precipitação salina e sistemas aquosos bifásicos e trifásicos. Após a escolha da melhor técnica a amostra foi submetida a ensaios de resistência ao pH e a temperatura, influência de sais metálicos e estabilizantes, também foi testada a ação contra o fungo fitopatogênico *Amphobotrys ricini*. O estudo revelou a presença do inibidor nas fases de larva, pupa e adulto, com destaque para a fase larval, que demonstrou mais de 40% de atividade inibitória. O método mais eficaz para reduzir os contaminantes na amostra foi o fracionamento salino, seguido por um sistema aquoso trifásico com isopropanol, resultando em um aumento na atividade inibitória para 84,20%. A atividade do inibidor permaneceu estável nas temperaturas de 40 a 70° C, mas manteve sua atividade mesmo em altas temperaturas, se manteve estável também em uma ampla faixa de PH (5-10). Além disso, a atividade do inibidor foi influenciada por diferentes sais metálicos e diversos estabilizantes, com BSA e Gelatina os quais elevaram a atividade inibitória em cerca de 20%. Por fim, foi observada uma diminuição da velocidade de crescimento do fungo fitopatogênico *Amphobotrys ricini*. Estes resultados destacam o uso potencial do inibidor de protease endógeno do inseto *T. castaneum*, podendo também contribuir para a compreensão das propriedades dos inibidores de insetos e mecanismos de regulação enzimática.

Palavras-chave: *Tribolium castaneum*, inibidor enzimático, caracterização bioquímica, besouro da farinha.

ABSTRACT

Protease inhibitors are substances that have the ability to regulate the action of proteases, blocking their catalytic activity. Many of these inhibitors are produced naturally by the body with the aim of maintaining homeostasis. Protease inhibitors have been the subject of study due to their biotechnological potential in pest control, the food industry, research into new medicines and also to increase understanding of inhibition mechanisms. The present work aimed to investigate the inhibitory activity and biochemical characteristics of a protease inhibitor present in the insect *Tribolium castaneum* and test its antifungal activity against a phytopathogenic fungus. The first step was to identify in which phase of the insect's life cycle there is a greater production of the inhibitor, then to improve the purity of the sample, the extract was subjected to purification techniques, such as saline precipitation and two-phase and three-phase aqueous systems. After choosing the best technique, the sample was subjected to resistance tests to pH and temperature, the influence of metallic salts and stabilizers, and the action against the phytopathogenic fungus *Amphobotrys ricini* was also tested. The study revealed the presence of the inhibitor in the larval, pupa and adult stages, with emphasis on the larval stage, which demonstrated more than 40% inhibitory activity. The most effective method to reduce contaminants in the sample was saline fractionation, followed by a three-phase aqueous system with isopropanol, resulting in an increase in inhibitory activity to 84.20%. The inhibitor activity remained stable at temperatures from 40 to 70°C, but maintained its activity even at high temperatures, and also remained stable over a wide range of pHs (5-10). Furthermore, the inhibitor activity was influenced by different metal salts and different stabilizers, with BSA and Gelatin which increased inhibitory activity by around 20%. Finally, a decrease in the growth rate of the phytopathogenic fungus *Amphobotrys ricini* was observed. These results highlight the potential use of the endogenous protease inhibitor from the insect *T. castaneum*, and may also contribute to the understanding of the properties of insect inhibitors and mechanisms of enzyme regulation.

Key-Words: *Tribolium castaneum*, enzyme inhibitor, biochemical characterization, flour beetle.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivos Gerais	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1 <i>Tribolium castaneum</i>	16
3.2 Insetos como modelo de estudo e fonte de extração de substâncias para aplicações variadas	18
3.3 Inibidores de protease	19
3.3.1 Aplicações Biotecnológicas	20
3.3.1.1 Inibidores de proteases no tratamento de doenças	20
3.3.1.2 Inibidores de proteases no controle de fungos fitopatógenos e de insetos-praga	21
3.3.3 Inibidores de proteases de insetos	23
3.4 Estratégias de precipitação de proteínas	24
3.4.1 Precipitação Salina	24
3.4.2 Precipitação de proteína por sistema trifásico (TPP)	25
3.4.3 Sistema de particionamento de duas fases aquosas (ATPS)	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Insetos	28
4.2 Preparação do Extrato Bruto	29
4.3 Determinação da concentração da proteína totais	30
4.4 Preparação da solução de pancreatina	30
4.5 Ensaio de Inibição de protease	30
4.6 Inibição de protease do intestino da larva do inseto <i>T. castaneum</i>	31
4.7 Inibição dos extratos brutos das diferentes fases de desenvolvimento do inseto	32
4.8 Estratégias de Purificação de Proteínas	32
4.8.1 Precipitação de proteínas com sulfato de amônio (NH ₄) ₂ SO ₄	32
4.8.2 Sistema bifásico polímero-sal	33

4.8.3 Precipitação de proteínas por sistema trifásico	33
4.9 Efeito da temperatura na ação do inibidor	33
4.10 Efeito do pH na ação do inibidor	34
4.11 Efeito de íons metálicos na ação do inibidor	34
4.12 Efeito de estabilizantes na ação do inibidor	34
4.13 Inibição de crescimento do fungo <i>Amphobotrys ricini</i>	35
5 RESULTADO E DISCUSSÕES	36
5.1 Comparação da inibição proteolítica com extrato bruto das diferentes fases de desenvolvimento do inseto <i>Tribolium castaneum</i>	36
5.2 Inibição de protease do intestino da larva do <i>Tribolium castaneum</i>	37
5.3 Fracionamento Salino	38
5.4 Sistema Aquoso bifásico com PEG	40
5.5 Sistema aquoso trifásico com isopropanol	41
5.6 Quantificação de proteínas das etapas de pré-purificação da amostra	43
5.7 Efeito da temperatura na atividade do inibidor	44
5.8 Efeito do pH na atividade do inibidor de <i>T. castaneum</i>	45
5.9 Influência de íons metálicos	46
5.10 Efeito dos estabilizantes na atividade do inibidor	47
5.11 Inibição do crescimento de <i>Amphobotrys ricini</i>.	49
6 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS	52

LISTA DE ABREVIATURAS

IPs: Inibidores de protease

BApNA: N α -Benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride.

BSA: Albumina sérica bovina.

DMSO: Dimetilsulfóxido

ANOVA: Análise de Variância

EB: Extrato Bruto

SF: Sobrenadante final

EDTA: Ácido etileno dianimotetracético

HCl: Ácido clorídrico

UFAL: Universidade Federal de Alagoas

ICF: Instituto de Ciências Farmacêuticas

pH: Potencial de hidrogênio

LBM: Laboratório de Bioquímica Metabólica

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

Aids: Síndrome da Imunodeficiência Humana

(NH₄)₂SO₄: O sulfato de amônio

TPP: Precipitação de proteína por sistema trifásico

ATPS: Sistema de particionamento de duas fases aquosas

PEG: Polietilenoglicol

ZnCl₂: Cloreto de zinco

KNO₃: Nitrato de potássio

CuSO_4 : Sulfato de Cobre

MnSO_4 : Sulfato de Manganês

MgCl_2 : Cloreto de Magnésio

CaCl_2 : Cloreto de Cálcio

NaCl : Cloreto de Sódio

CMC: Carboxi Metil Celulose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo de vida do <i>Tribolium castaneum</i>	16
Figura 2- Precipitação de Proteína utilizando Sulfato de Amônio	25
Figura 3- Perfil da precipitação em sistema de partição trifásico (TPP)	26
Figura 4- Meio de cultivo do <i>T. castaneum</i>	28
Figura 5- Etapas da preparação dos extratos brutos	29
Figura 6- Ilustração de reação geral da hidrólise do BapNa pela Tripsina.	31
Figura 7- Atividade inibitória dos extratos brutos da larva, pupa e adultos do inseto <i>T. castaneum</i>	36
Figura 8- Atividade inibitória do extrato bruto da larva contra o extrato do intestino das larvas	38
Figura 9 - Atividade inibitória das frações salinas do extrato bruto da larva do <i>Tribolium castaneum</i>	39
Figura 10- Atividade inibitória das frações do Sistema Aquosos de Duas Fases (ATPS)	40
Figura 11- Fases do sistema aquoso trifásico: A- Separação das fases, B- disco de proteínas formado, C- fases separadas.	41
Figura 12 - Atividade inibitória das fases do sistema aquoso trifásico com isopropanol, utilizando o sobrenadante final do fracionamento salino (A) e fração 20-40% do fracionamento salino com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (B).	42
Figura 13 - Concentração de proteínas no extrato bruto (EB), sobrenadante fibal do fracionamento salino (SF) e fase dois do sistema aquoso trifásico álcool/sal (F2)	43
Figura 14 - Efeito da temperatura na atividade inibitória do inibidor do <i>T. castaneum</i>	44
Figura 15 - Efeito do pH na atividade inibitória do inibidor do <i>T. castaneum</i>	45
Figura 16-Efeitos de diferentes íons metálicos na atividade do inibidor do <i>T. castaneum</i>	46
Figura 17- Atividade proteolítica na presença do inibidor de <i>T. castaneum</i> e de estabilizantes	48
Figura 18 - Inibição do crescimento do <i>Amphobotrys ricini</i> . A- controle, B- com inibidor	49

1 INTRODUÇÃO

Em escala global, há aproximadamente 1,5 milhão de espécies de besouros, 5,5 milhões de espécies de insetos e 7 milhões de espécies de artrópodes terrestres, dentre os insetos a ordem mais predominante é a Coleoptera, com aproximadamente 387.000 representantes. Esses organismos têm a capacidade de sintetizar diversos compostos químicos que os ajudaram a sobreviver às adversidades do ambiente ao longo de sua evolução. (Stork, 2018, Ratcliffe et al., 2011). O êxito adaptativo alcançado por esses animais motiva a investigação do isolamento de novas moléculas com potencial biotecnológico. Esse sucesso deve-se ao sistema de defesa composto por moléculas como fenoloxidase, processo de melanização, proteases, peptídeos antimicrobianos e inibidores de proteases, presentes nesses animais (Shakeel, et al., 2019.)

As proteases e inibidores de proteases (IPs) geralmente existem em pares para preservar a homeostase nos organismos (Jiang, 2000). Os inibidores de protease são moléculas amplamente encontradas em praticamente todos os seres vivos, desempenhando papéis cruciais em diversos processos biológicos, onde regulam as funções proteolíticas das enzimas-alvo, isso inclui tanto as proteases digestivas quanto aquelas associadas aos fatores de virulência em patógenos (Jiang, et al., 2009; Vagadia, Vanga e Raghavan, 2017).

Os IPS têm sido objeto de pesquisas devido às suas inúmeras aplicações promissoras em campos como medicina, biotecnologia, indústria alimentícia e agricultura. Além disso, esses estudos contribuem para a compreensão dos mecanismos de interações desses inibidores nos organismos (Cotabarrena, et al., 2019; Rawlings, et al., 2004).

Os inibidores de proteases são investigados como potenciais candidatos para o tratamento de doenças relacionadas à atividade desregulada de proteases no organismo ou de patógenos. Podem ser úteis em condições médicas como infarto do miocárdio, doença de Alzheimer e infecções microbianas (Satheesh; Murugan, 2011; Joshi. et al., 1998; Shamsi et al., 2016). Além disso, já são utilizados no combate a doenças virais, como HIV, Hepatite C e COVID-19, bloqueando a ação das proteases

virais e auxiliando no controle da infecção (Naggie e Hicks, 2010; Levien e Baker, 2023).

Na agricultura, os inibidores de protease podem ser alternativas sustentáveis para o controle de pragas e patógenos que afetam as plantações, inibindo enzimas essenciais para a sobrevivência desses organismos e oferecendo uma opção menos prejudicial ao meio ambiente (Pandhare, 2002). Esses inibidores têm potencial no controle de insetos-praga, podendo ser alvo de silenciamento genético ou explorados como biopesticidas. No caso de fungos fitopatogênicos, representam uma estratégia promissora para o controle desses patógenos, proporcionando uma alternativa mais segura e sustentável em comparação com os métodos convencionais, como o uso excessivo de fungicidas (Cotabarren, et al., 2020).

Os inibidores de origem natural são considerados promissores para aplicação em vários sistemas biológicos devido à sua alta estabilidade em condições fisiológicas e baixa citotoxicidade. Além disso, fontes naturais, como plantas, invertebrados e micróbios, oferecem um vasto reservatório de moléculas bioativas ainda não descobertas ou não caracterizadas, que desempenham papéis importantes na defesa do hospedeiro contra predadores e patógenos (Gutierrez-Gongora e Geddes-McAlister, 2021).

Em particular, artrópodes e outros invertebrados servem como fontes significativas de inibidores de proteases, sendo esses compostos frequentemente isolados da hemolinfa. Foram identificados inibidores de protease em diversos artrópodes, incluindo insetos como *Bombyx mori*, *Antheraea pernyi*, *Drosophila melanogaster*, *Manduca sexta*, *Locusta migratoria* e *Schistocerca gregaria* (Cerqui, 2001).

O *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), o besouro vermelho da farinha, é uma importante praga de produtos armazenados, reconhecido por ocasionar consideráveis prejuízos tanto na fase de produção quanto durante o armazenamento desses produtos. Este inseto tem sido amplamente empregado na pesquisa e destaca-se pela facilidade de manejo, boa reprodutibilidade em ambiente laboratorial e por possuir um ciclo de vida curto (Campbell, et al. 2022).

Nesse contexto, esse trabalho propõe analisar a atividade e realizar uma caracterização bioquímica de um inibidor de protease identificado no inseto *Tribolium castaneum*, além de avaliar sua potencial aplicação como antifúngico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Caracterizar um inibidor de protease presente na larva do inseto *Tribolium castaneum* e avaliar uma possível aplicação como antifúngico.

2.2 Objetivos Específicos

- Avalizar em qual fase do inseto ocorre maior produção do inibidor de protease;
- Determinar a melhor forma de precipitação de proteínas;
- Caracterizar o inibidor enzimático quanto a resistência a temperatura, pH, íons metálicos e estabilizantes;
- Avaliar o efeito do inibidor sobre o fungo *Amphobotrys ricini*.

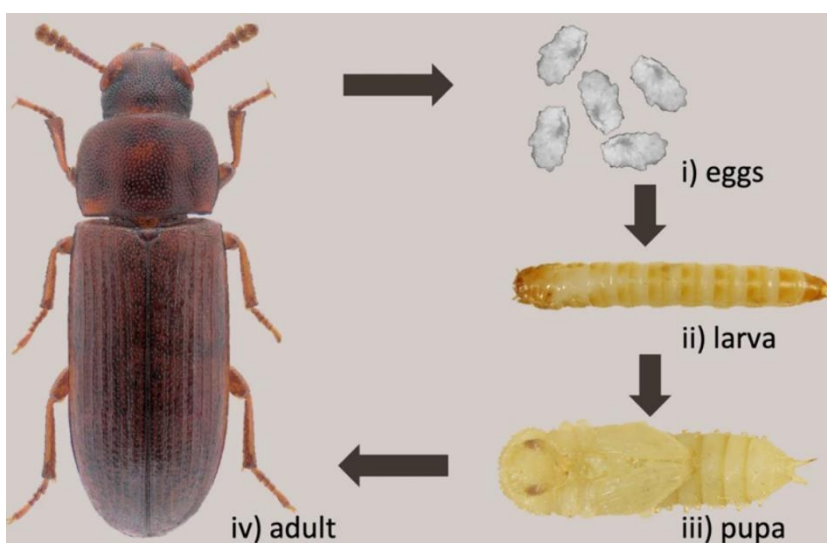
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Tribolium castaneum*

O *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae), também conhecido como besouro vermelho da farinha, é uma praga comum em produtos armazenados. (Faroni e Frabetti, 2009). Este inseto passa por metamorfose completa, ou seja, é holometábolo, e seu ciclo de vida (Figura 1) abrange as etapas de ovo, larva, pupa e adulto. Sob condições ambientais ideais, que envolvem uma temperatura de 30,6 ° C e uma umidade relativa do ar de 76,5 %, o ciclo de vida dura aproximadamente 30 a 40 dias (Devi e Devi, 2015).

Este besouro adulto exibe uma coloração castanho-avermelhada, com um tamanho variando entre 3 a 4 mm. Além disso, apresenta um corpo achatado e duas depressões transversais na cabeça (Elias et al., 2008). As fêmeas desse inseto têm a capacidade de ovipositar aproximadamente 450 ovos por ciclo, os quais são claros, recobertos por uma substância pegajosa e medem cerca de 0,6 x 0,3 mm. Normalmente, esses ovos eclodem em um período de 5 a 7 dias (Puzzi, 1977). As larvas da espécie são amareladas, cilíndricas e medem por volta de 7mm. Elas passam por 6 a 8 ínstares até alcançarem a fase de pupa, a qual dura aproximadamente 7 dias (Gallo et al., 2002).

Figura 1- Ciclo de vida do *Tribolium castaneum*



Fonte: Adaptado de Pointer, Gage e Spurgin, 2021.

O *T. castaneum* possui significativa importância em vários campos, como a agricultura e a pesquisa científica, sendo um organismo modelo amplamente utilizado em estudos genéticos e biológicos. A facilidade de cultivo e manipulação em laboratório, aspectos éticos aceitáveis, genoma disponível, ciclo de vida curto e a habilidade de gerar muitos descendentes fazem dele um valioso modelo experimental (Rösner, et.al 2020). Ademais, o uso de insetos é mais aceitável eticamente em pesquisas, o que contribui para que o *T. castaneum* seja cada vez mais empregado em uma diversidade de estudos biomédicos. Isso inclui pesquisas sobre distúrbios neurodegenerativos, vias de sinalização diurética, interações entre hospedeiros e patógenos, bem como estudos de farmacologia e toxicologia (Campbell, et al. 2022), isso se dá também por esse inseto ter uma grande homologia genética com outras espécies, incluindo humanos (Richards, et al., 2008).

Na agricultura, o *T. castaneum* é objeto de extensos estudos por ser uma das pragas mais danosas para grãos armazenados ao redor do mundo, sendo capaz de resistir a condições ambientais adversas e desenvolver resistência a determinadas categorias de inseticidas. Ele infesta principalmente grãos processados, tais como trigo, arroz, soja, aveia e milho. Isso resulta em perdas substanciais de alimentos e, conseqüentemente, impactos econômicos negativos (Jagadeesan, et al. ,2012) sendo necessária a busca de novas estratégias para o controle desse inseto, como os inibidores de proteases.

O inseto *Tribolium castaneum* apresenta um sistema de proteólise digestiva que envolve a presença de serinopeptidases, como enzimas semelhantes a tripsina, quimotripsina e elastase (Vinokurov et al., 2009). Estas enzimas desempenham funções cruciais na quebra de proteínas no intestino médio do inseto, facilitando a digestão e a absorção de nutrientes. Portanto, os inibidores de proteases podem representar alternativas viáveis para minimizar os danos causados na agricultura, afetando a capacidade do inseto de processar proteínas de maneira eficaz, o que pode levar à desnutrição e ao aumento da mortalidade (Scardini Marinho et al., 2010).

3.2 Insetos como modelo de estudo e fonte de extração de substâncias para aplicações variadas

Os insetos representam a forma mais abundante de vida animal no nosso planeta, estima-se que existam cerca de 5,5 milhões de espécies de insetos (com uma variação de 2,6 a 7,8 milhões), e os besouros são considerados o maior grupo dentro desse vasto filo, com um número que varia de 0,9 a 2,1 milhões de espécies (Chowanski, et al., 2017).

Os insetos têm sido usados como modelos para estudos devido ao seu baixo custo e maior aceitação ética, uma distinção notável em relação aos modelos tradicionais, como camundongos, ratos e coelhos, que envolvem experimentos de maior custo, mais demorados e com considerações éticas adicionais (Wang, et al., 2013).

Um dos interesses na pesquisa com insetos é a riqueza em substâncias que podem ser utilizadas em diversas aplicações, desde medicina até a produção industrial. Os insetos produzem uma ampla gama de compostos químicos como parte de seus processos biológicos normais, incluindo feromônios, pigmentos e antimicrobianos naturais (Rizvi, et al., 2021; Futahashi, Osanai-Futahashi, 2021; Yi, et al., 2014).

Na agricultura, os insetos são importantes para o estudo do controle biológico de pragas. Os feromônios produzidos por insetos, por exemplo, podem ser usados para confundir ou atrair pragas para armadilhas, reduzindo a necessidade de pesticidas químicos (Rizvi, et al., 2021), além disso podem ser usados para testar substâncias com potencial inseticida (Paramasivam e Selvi, 2017).

Os insetos também fornecem um vasto repositório de enzimas e inibidores de enzimas com um potencial significativo para aplicações biotecnológicas. As enzimas derivadas de insetos, como celulasas, quitinases, lipases e proteases, têm aplicações importantes em diversas áreas da biotecnologia. As celulasas, por exemplo, são empregadas na bioconversão de biomassa vegetal em açúcares fermentáveis, facilitando a produção de biocombustíveis (Willis, Oppert e Jurat-Fuentes, 2010). As quitinases têm aplicações tanto na agricultura, como biopesticidas, quanto na indústria

médica, para a produção de quitosana, uma substância utilizada em cicatrização e liberação controlada de fármacos. (Kannan, 2019).

A produção de alimentos e bebidas também pode se beneficiar do uso de enzimas de insetos, pois são capazes de melhorar a textura, aumentar o valor nutricional e proporcionar aromas e sabores agradáveis. Proteases e lipases podem ser empregadas na produção de alimentos fermentados, na clarificação de sucos de frutas e na fabricação de queijos, devido à sua capacidade de quebrar proteínas e lipídios, respectivamente (Ishak, et al., 2019; Mika, Zorn e Rühl, 2013).

Inibidores de enzimas produzidos por insetos também têm potencial para aplicações biotecnológicas. Muitos insetos produzem inibidores de proteases como mecanismo de defesa contra predadores e patógenos. Estes inibidores podem ser utilizados no desenvolvimento de novos pesticidas biológicos, que são mais seguros e sustentáveis do que os pesticidas químicos convencionais. Além disso, os inibidores de enzimas podem ter aplicações significativas na área médica. Os inibidores de proteases de insetos podem apresentar potencial para o tratamento de doenças inflamatórias e cancerígenas, devido à sua capacidade de regular a atividade de proteases humanas envolvidas nesses processos (Eguchi, 1993). Podemos destacar também os diversos peptídeos antimicrobianos isolados de insetos, que nas últimas décadas vem sendo muito estudados por causa do vasto espectro de ação e mínima citotoxicidade (Otvos, 2000).

3.3 Inibidores de protease

As proteases fazem parte de uma das maiores e mais diversas famílias de enzimas atualmente conhecidas (Qureshi et al., 2011), têm a função de acelerar a quebra das ligações nas proteínas, ajudando assim a regular vários processos no corpo, entre eles a digestão e apoptose. No entanto, é fundamental que essa ação seja gerenciada para evitar qualquer resposta inadequada (Ramachandran et al., 2012). E é justamente nesse ponto que os inibidores de proteases desempenham seu papel, assegurando que essas enzimas atuem somente quando e onde realmente forem necessárias.

Os inibidores de proteases (IPs) podem ser encontrados em uma ampla variedade de organismos vivos, desde bactérias até plantas e animais e atuam como bloqueadores em situações em que a proteólise não é desejada, como por exemplo uma proteólise excessiva, tanto em processos fisiológicos rotineiros quanto em situações de doença. (Laskowski e Kato, 1980; Shamsi et al., 2016).

Quando consideramos a ação dos inibidores de enzimas, podemos categorizá-los como reversíveis ou irreversíveis. Os inibidores irreversíveis estabelecem uma ligação covalente estável com o sítio ativo da enzima, impedindo que esta acelere o processamento do substrato. Por outro lado, os inibidores reversíveis, que incluem os competitivos, mistos e não competitivos, interagem com a enzima por meio de interações mais fracas, como ligações de hidrogênio, ligações hidrofóbicas e iônicas. Isso resulta na alteração da estrutura tridimensional da proteína, impossibilitando assim o seu encaixe adequado com o substrato. (Nelson e Cox, 2014; Berg, Stryer e Tymozko, 2007).

Conforme o banco de dados digital MEROPS em 2017, já se tinham registrado cerca de 134.011 Inibidores de Proteases (IPs), agrupados em 82 famílias, classificadas de acordo com a semelhança em sua estrutura primária, tal progresso foi possível graças aos avanços recentes nos estudos de purificação e sequenciamento dessas moléculas (Rawlings et al., 2018).

Os inibidores de peptidases têm atraído considerável atenção devido às suas múltiplas aplicações em campos como medicina, agricultura, biotecnologia, indústria alimentícia e diagnóstico. Além disso, são essenciais para entendermos os mecanismos de como eles interagem em diversos processos (Cotabarren, et al., 2019; Rawlings et al., 2004).

3.3.1 Aplicações Biotecnológicas

3.3.1.1 Inibidores de proteases no tratamento de doenças

Uma das principais aplicações biotecnológicas dos inibidores de protease é na pesquisa e desenvolvimento de medicamentos. Essas moléculas têm sido investigadas como potenciais candidatos a fármacos para o tratamento de doenças

relacionadas à atividade excessiva ou desregulada de proteases no organismo, ou no bloqueio da atividade das proteases de patógenos (Fear, Komarnytsky e Raskin, 2007).

Certas doenças genéticas estão relacionadas as irregularidades nos inibidores de peptidases, como o enfisema, epilepsia, edema angioneurótico hereditário e síndrome de Netherton. Uma abordagem terapêutica promissora para esses distúrbios poderia envolver a administração de inibidores de enzimas como medicamentos (Rawlings et al., 2004).

Estudos mostram que os inibidores de proteases têm um potencial terapêutico promissor para uma série de condições médicas. Eles podem ser úteis em casos como infarto do miocárdio, tromboembolismo venoso e acidente vascular cerebral, que estão associados a uma atividade excessiva da trombina (Shamsi et al., 2016). Além disso, esses inibidores podem ser benéficos no tratamento de câncer (Ranasinghe, et al., 2018), osteoporose, AIDS, doença de Alzheimer, artrite reumatoide (Song et al., 1999), doenças inflamatórias (Bermúdez-Humarán et al., 2015) e infecções microbianas (Satheesh; Murugan, 2011; Joshi. et al., 1998).

Na medicina, um dos principais usos dos inibidores de protease é no combate a doenças virais. Tomemos como exemplo os inibidores de protease do HIV, que se tornaram fundamentais na terapia antirretroviral para indivíduos infectados por esse vírus. Esses medicamentos bloqueiam a ação da protease do HIV, uma enzima que o vírus usa para processar suas próprias proteínas, e impedem consequentemente a reprodução do HIV, auxiliando no controle da infecção (Naggie e Hicks, 2010). Da mesma forma, os inibidores de protease são utilizados no tratamento de doenças como hepatite C e coronavírus (COVID-19), como por exemplo o remdesivir, um medicamento usado no tratamento da COVID-19, atua inibindo uma protease viral essencial para a replicação do vírus (Levien e Baker, 2023).

3.3.1.2 Inibidores de proteases no controle de fungos fitopatógenos e de insetos-praga

Na agricultura, os inibidores de protease vêm sendo explorados como potenciais aliados no combate a pragas e patógenos que afetam as plantações,

incluindo insetos-praga, microrganismos, herbívoros, entre outros, através da inibição de enzimas proteolíticas essenciais para a sobrevivência desses organismos, essas substâncias se apresentam como uma alternativa sustentável e menos prejudicial ao meio ambiente no controle dessas pragas (Pandhare, 2002).

No âmbito do controle de pragas, é crucial identificar inibidores presentes em insetos. Essas substâncias poderiam ser alvo de silenciamento genético prejudicando o desenvolvimento de insetos-praga, ou então poderiam ser explorados como biopesticida. Sabe-se que insetos-pragas podem desenvolver resistência aos inibidores produzidos naturalmente pelas plantas (Macedo, 2015). No entanto, a estratégia de utilizar os próprios inibidores produzidos por esses insetos contra eles mesmos é justificável pelo fato de que essas proteínas não são sintetizadas no intestino, mas sim em diferentes tecidos do próprio inseto (Rai et al., 2010). Essa abordagem, possivelmente, representa uma opção mais segura quando comparada ao uso de inibidores de origem vegetal ou sintética, uma vez que a probabilidade de os insetos desenvolverem resistência a seus próprios inibidores é reduzida contribuindo para o objetivo de prejudicar o desenvolvimento desses insetos e mitigar seus impactos adversos nas plantações (Rios-Dóez, et al. 2022).

Os fungos fitopatogênicos representam uma ameaça significativa para a agricultura, provocando doenças em plantas que resultam em perdas de produtividade e qualidade. O emprego de inibidores de proteases tem surgido como uma estratégia promissora para o controle desses fungos, oferecendo uma alternativa potencialmente mais sustentável e segura em comparação com os métodos convencionais de combate a doenças (Cotabarren, et al., 2020).

Um exemplo de fungo fitopatogênico é o *Amphobotrys ricini*, que é especialmente associado à planta da mamona (*Ricinus communis*), da qual deriva seu nome. A mamona possui grande importância econômica, uma vez que suas sementes são a fonte do óleo de mamona, que possui diversas aplicações industriais, incluindo a produção de biodiesel (Moraes, 2011).

A infecção pelo *Amphobotrys ricini* pode resultar em uma variedade de sintomas nas plantas de mamona, seu principal impacto é em inflorescências e cachos, mas também pode se desenvolver em outras partes da planta, como caules e folhas. As lesões nesses locais costumam se originar devido à queda de material

infectado das inflorescências. Os primeiros sinais visíveis são manchas de tonalidade azulada nas inflorescências e frutos em crescimento. Isso pode ter um impacto significativo na produção de óleo de mamona, e consequentemente a perdas econômicas (Milani, et al.,2005).

O controle eficaz do *Amphobotrys ricini* pode ser um desafio. Embora fungicidas possam ser eficazes, o uso excessivo pode levar ao desenvolvimento de resistência por parte do fungo. Assim, pesquisas continuam a ser realizadas com o intuito de desenvolver métodos mais eficazes para controlar o *Amphobotrys ricini*, incluindo a exploração de estratégias de controle biológico, como os inibidores de protease.

3.3.3 Inibidores de proteases de insetos

A hemolinfa de insetos e outros artrópodes apresenta níveis altos de inibidores de proteases, originados de diversas famílias de genes diferentes (Polanowski e Wilusz, 1996; Kanost, 1999). Os inibidores de proteases endógenos de insetos desempenham diversas funções biológicas, como regulação de processos proteolíticos ativados, incluindo a cascata da fenoloxidase (Asano e Ashida, 2001), imunidade humoral, metamorfose, desenvolvimento, reprodução, defesa contra patógenos invasores, ação anti-hemostática (nos insetos hematófagos) e a proteção dos tecidos contra os efeitos prejudiciais das proteases que possam vazar para a hemolinfa a partir do trato alimentar (Kanost, 1999; Rai, et al 2010).

Essa variedade de funções destaca a importância dos inibidores de proteases na fisiologia dos insetos, porém ainda se sabe pouco sobre como as proteases são reguladas em insetos, sendo assim, eles se apresentam como modelos valiosos para nos ajudar a entender a função das cascatas proteolíticas e como elas são controladas durante o processo de desenvolvimento, contribuindo para a compreensão de sua biologia e interações com o ambiente (Rimphanitchayakit e Tassanakajon, 2010).

3.4 Estratégias de precipitação de proteínas

Para analisar adequadamente uma proteína específica, é necessário isolá-la de outros componentes celulares, garantindo assim que sua estrutura e função sejam estudadas sem a influência de substâncias contaminantes. Isso implica na purificação da proteína alvo, resultando em uma amostra contendo exclusivamente essa molécula. As proteínas podem ser diferenciadas e separadas com base em características como solubilidade, tamanho, carga e propriedades de ligação (Berg, Stryer e Tymozko, 2007). O processo de isolamento pode ser realizado utilizando diferentes materiais biológicos, como tecidos ou células, onde a proteína em questão está presente (Augusto, 2012).

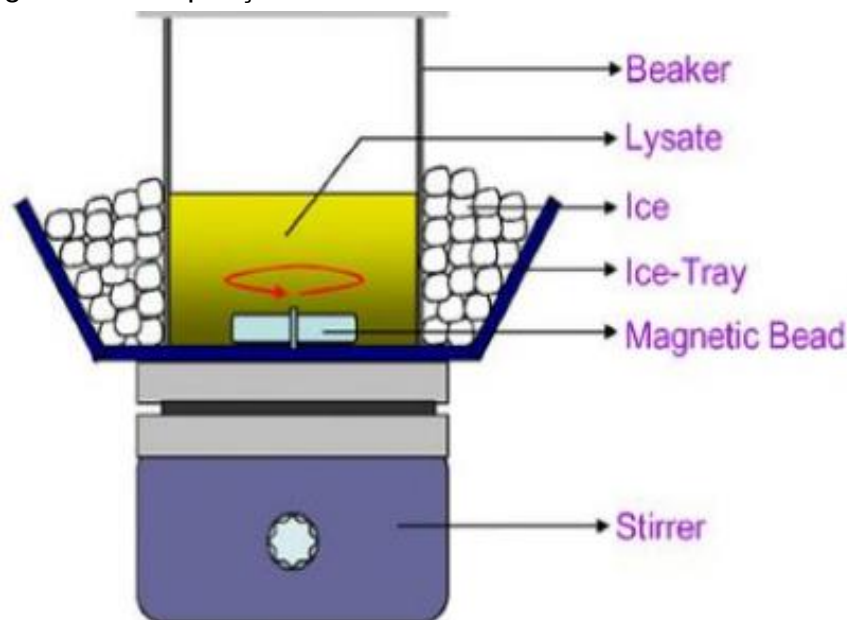
Independentemente da forma como a proteína ou peptídeo é produzido, é crucial determinar o método mais eficaz de extração que preserve sua integridade ao máximo (Stryer et al., 2007). Recomenda-se que o extrato bruto, que consiste em um homogenato do tecido em análise, seja processado de maneira a separar as proteínas em diversas frações. Frequentemente, as escolhas sobre a separação se fundamentam em características químicas da proteína, como seu tamanho, solubilidade e carga - positiva ou negativa - além das particularidades dos grupos químicos que a compõem, ou seja, sua capacidade de interação com outras moléculas. Assim, uma fração em particular tende a mostrar uma atividade mais elevada e é selecionada como ponto de partida para procedimentos de purificação mais detalhados (Nelson e Cox, 2014; Stryer et al., 2007). A seguir, detalharemos algumas das principais técnicas de isolamento proteico que serviram como alicerce metodológico e experimental para este trabalho.

3.4.1 Precipitação Salina

A presença de certos sais pode diminuir a solubilidade das proteínas, um fenômeno conhecido como "salting out". Essa técnica é amplamente utilizada em estudos de purificação de proteínas, especialmente devido ao seu baixo custo e capacidade de reduzir eficazmente os contaminantes nas fases iniciais do processo de purificação (Mariam et al., 2015). A concentração de sal que provoca a precipitação

de uma proteína varia de uma para outra, tornando essa técnica útil para separá-las. O método envolve o aumento progressivo da concentração de sal que, ao competir pela água de solvatação, torna as proteínas no meio insolúveis. A seleção adequada do sal é essencial para esse processo (Figura 2). O sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), por exemplo, é frequentemente utilizado por sua alta solubilidade, mesmo em temperaturas mais baixas. As proteínas que precipitam são então removidas da solução através da centrifugação e podem ser ressuspensas em uma etapa posterior (Nelson e Cox, 2014; Green e Hughes, 1955; Stryer et al., 2007).

Figura 2- Precipitação de Proteína utilizando Sulfato de Amônio

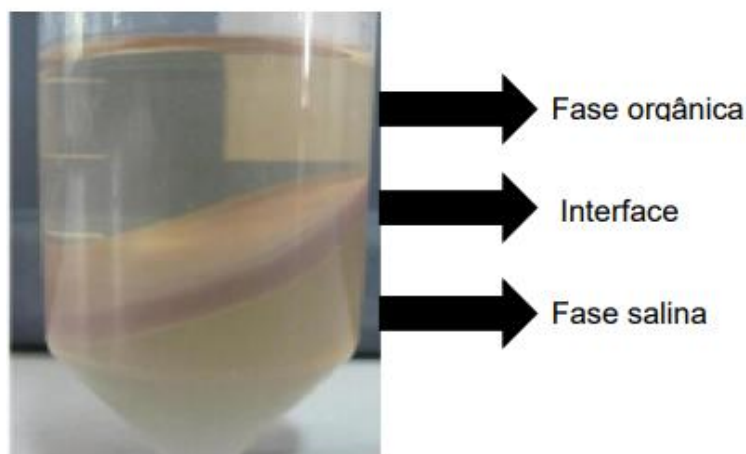


Fonte: Wenk e Fernandis, 2007

3.4.2 Precipitação de proteína por sistema trifásico (TPP)

Tal como observado no método anterior, onde a eluição das proteínas se baseava em suas características estruturais, o mesmo ocorre com a técnica de fracionamento de proteínas por sistema trifásico (TPP). Neste caso, o isopropanol se liga às proteínas precipitadas na interface, potencializando sua fluidez e mantendo os precipitados acima da densa camada salina aquosa. Enquanto isso, pigmentos, lipídeos e materiais hidrofóbicos ficam na camada superior. Já componentes polares, como proteínas residuais, sacarídeos e eletrólitos, se acumulam na camada aquosa inferior (Figura 3) (Şen et al., 2011)

Figura 3- Perfil da precipitação em sistema de partição trifásico (TPP)



Fonte: Santos, 2020, adaptado de Wati et al., 2020

3.4.3 Sistema de particionamento de duas fases aquosas (ATPS)

Os sistemas bifásicos, em 'sua maioria, consistem em uma solução aquosa contendo dois polímeros que não se misturam bem ou combinações de polímeros e sais. À medida que a concentração desses elementos ultrapassa um determinado ponto crítico, ocorre uma distinta separação em duas fases distintas. A eficiência desses sistemas depende grandemente da capacidade de ajustar os parâmetros do sistema, como a composição das fases, a fim de obter coeficientes de partição apropriados e garantir a seletividade necessária para a separação eficaz das proteínas alvo (Nadar, Pawar e Rathod, 2017).

Um dos componentes mais amplamente empregados nos ATPS é o polietilenoglicol (PEG), devido à sua produção em larga escala em todo o mundo e à disponibilidade em diversos pesos moleculares. O peso molecular do PEG exerce uma influência substancial no comportamento de partição de biomoléculas. À medida que o peso molecular do PEG aumenta, tanto a natureza hidrofóbica da proteína alvo quanto seu coeficiente de partição aumentam de maneira linear (Tubio, Nerli e Picó, 2004).

Além disso, no contexto dos ATPS de PEG/sal, a seleção de um sal formador de fase desempenha um papel crucial na facilitação direta da separação e extração

das moléculas desejadas entre as fases. Os sais têm a capacidade de influenciar as interações hidrofóbicas entre as biomoléculas nos ATPS, contribuindo para o sucesso desses sistemas em aplicações variadas (Vijayaragavan, et al., 2014).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Insetos

Os insetos *Tribolium castaneum*, em todas as fases do seu ciclo de vida, foram cultivadas em colônias no Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM), do Instituto de Ciências Farmacêuticas (ICF), da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Foram alimentados exclusivamente com farinha de trigo e mantidas em potes de plástico com pequenos furos nas tampas, para possibilitar a passagem de ar, e mantidos em uma estufa com temperatura de 30°C, umidade relativa entre 70 e 80% e fotoperíodo claro/escuro de 12h (Figura 4).

Figura 4- Meio de cultivo do *T. castaneum*



Fonte: Própria autora

4.2 Preparação do Extrato Bruto

O preparo do extrato foi preparado utilizando 250mg de inseto (larvas, pupas ou adultos, lavados com água destilada e secos, para tirar o excesso de farinha de trigo), para 1 ml de tampão de extração (Tris-HCl 50mM pH 8). Foram devidamente homogeneizados com o auxílio de gral e pistilo e então submetidos a uma etapa de centrifugação (10.000 rpm, 20 min a 4°C) o sobrenadante, denominado de Extrato Bruto (EB) (Figura 5), foi coletado para realização dos ensaios de inibição da atividade enzimática, e continuidade dos experimentos laboratoriais.

Figura 5- Etapas da preparação dos extratos brutos



Fonte: Própria autora

4.3 Determinação da concentração da proteína totais

Para determinar a concentração de proteínas totais das amostras, foi utilizado o método de Bradford (1976), a da curva padrão foi preparada com Albumina de Soro Bovino (BSA) nas concentrações de 0,01mg/mL até 1 mg/mL. As leituras foram realizadas em microplaca de 96 poços, com 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 tampão Tris-HCl 50mM pH 8 no lugar da amostra. Após o preparo da reação, as amostras foram incubadas por 5 min e logo em seguida obtidas as absorbâncias a 595 nm com o auxílio de uma leitora de microplacas (Flexstation 3). O experimento foi realizado em triplicata para cada amostra e as unidades correspondentes são (mg/mL) de proteína.

4.4 Preparação da solução de pancreatina

Uma cápsula de pancreatina 10.000 ui (Creon®) (que é composta por três enzimas como amilase, proteases (tripsina, quimiotripsina e carboxipeptidase A) e lipase) foi diluída em 2 ml de tampão Tris-HCl pH 8 50mM, em banho de gelo e sob agitação, por 30 minutos, após esse tempo o conteúdo foi centrifugado (10.000 rpm, 2 min a 4°C) e o sobrenadante separado, 20 µl desse sobrenadante foi diluído em 980 µl de tampão (Tris-HCl pH 8 50mM), então essa solução foi utilizada para os ensaios de inibição proteolítica.

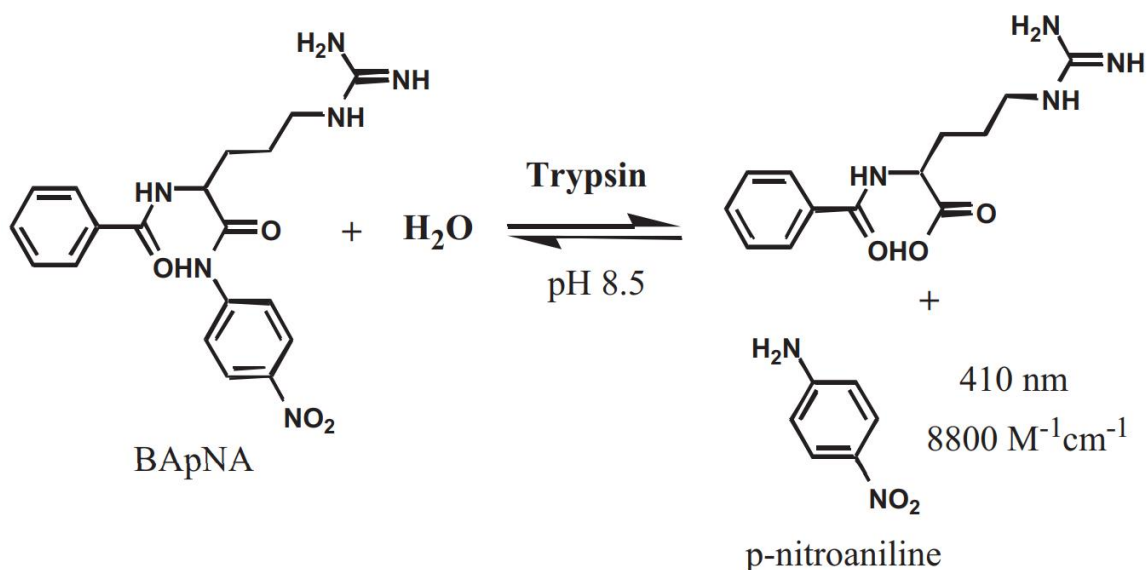
4.5 Ensaio de Inibição de protease

Para os testes de inibição foi utilizado uma solução de pancreatina (Creon®) e o volume de amostra foi determinado conforme a com a quantidade de proteínas presente nas soluções. O ensaio foi executado 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 enzimas proteolíticas como tripsina, quimotripsina e papaína. O ensaio foi feito em triplicata padronizando 10 µl da solução de pancreatina, e o volume da amostra foi determinado a partir da quantidade de proteína, e então a reação foi completada para 120 µl com tampão (Tris HCl 50 mM pH 8), ficou por 30 minutos incubada a temperatura ambiente, na finalidade de

favorecer a associação intermolecular entre a protease e, o inibidor enzimático alocado na amostra extraída do inseto, após esse tempo foram utilizados 30µl de BApNa (50 mM dissolvido em dimetilsulfóxido), a reação controle se seguiu da mesma forma, porém sem a adição do inibidor, para descontar a coloração natural da amostra foi feito o branco com a amostra com o inibidor, a solução de pancreatina e o volume foi completado com tampão para 120ul, e então as reações foram incubadas a 37° C por 30 minutos, para interrupção da reação utilizou-se 150µl de Ácido cítrico a 20%. Em uma placa de 96 poços, 200 µl de cada reação foi adicionada e as absorbâncias foram mensuradas a 410 nm utilizando uma leitora de microplacas (FlexStation 3).

A enzima ao interagir com o grupo carbonil do BapNa, leva a uma reação de hidrólise da ligação envolvendo esse grupo, formando como produto p-nitroanilida Figura 6, que é um composto cuja coloração amarela é monitorada a 410 nm.

Figura 6- Ilustração de reação geral da hidrólise do BapNa pela Tripsina.



Fonte: Hinterwirth et al. 2012

4.6 Inibição de protease do intestino da larva do inseto *T. castaneum*

Para preparar o extrato do intestino das larvas, foi coletado aproximadamente 225 mg de intestinos de larvas de *T. castaneum*. Os intestinos foram homogeneizados adequadamente usando um homogeneizador de vidro em um volume total de 3 ml de tampão de extração (Tris-HCl 50mM pH 8 + 1 M de NaCl). Em seguida, os 3 ml foram

centrifugados a 10.000 g por 5 minutos a 4°C, e o sobrenadante foi coletado para a realização do teste da inibição da atividade enzimática utilizando o extrato bruto das larvas inteiras como inibidor de protease. Foram conduzidos dois ensaios de inibição, um com 10 µl e outro com 20 µl de extrato bruto da larva (utilizado como inibidor), além de 10 µl de extrato do intestino da larva. As reações foram completadas para um volume final de 120 µl com tampão (Tris HCl 50 mM pH 8) e incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 30 µl de BApNa (50 mM dissolvido em dimetilsulfóxido). A reação controle seguiu o mesmo procedimento, porém sem a adição do extrato bruto. As reações foram então incubadas a 37°C por 30 minutos. Para interromper a reação, 150 µl de ácido cítrico a 20% foram utilizados. Em uma placa de 96 poços, 200 µl de cada reação foram adicionados e as absorbâncias foram medidas a 410 nm utilizando uma leitora de microplacas (FlexStation 3).

4.7 Inibição dos extratos brutos das diferentes fases de desenvolvimento do inseto

Visando verificar em qual fase da metamorfose do *T. castaneum* é produzido mais inibidor, os extratos brutos da larva, pupa e inseto adulto foram submetidos ao ensaio de inibição, utilizando volume correspondente a 30 µg de proteína /µl, tão o experimente se sucedeu conforme descrito na seção anterior (4.5).

4.8 Estratégias de Purificação de Proteínas

4.8.1 Precipitação de proteínas com sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄

Diante da certificação da presença do inibidor enzimático e da escolha da fase de desenvolvimento do inseto que mais o produzia, realizou-se o processo de purificação da molécula estudada, iniciado pela precipitação salina com sulfato de amônio, como o objetivo de eliminar os contaminantes e, concentrar a atividade inibitória em uma amostra de maior resolução. O extrato bruto utilizado para essa análise foi obtido com as larvas do inseto, conforme mostrado no item 4.2.

O EB foi submetido ao fracionamento salino que consiste no 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 sob uma agitação e em baixa temperatura durante uma hora, após essa etapa de solubilização do sal e precipitação proteica, as frações foram centrifugadas (10000 rpm x 15 minutos). Depois o sobrenadante foi retirado para continuidade do fracionamento salino e o precipitado foi ressuspendido em 1 ml de tampão Tris-HCl 50 mM pH 8 e reservado. Após a obtenção de todas as frações salinas, elas foram submetidas a um ensaio de inibição enzimática, para a identificação da fração contendo predominantemente a atividade biológica desejada.

4.8.2 Sistema bifásico polímero-sal

Foi feito um sistema de precipitação utilizando o fracionamento salino até a fração 20-40% juntamente com o polímero polietilenoglicol (PEG) 3.500, na razão de 1/0.5 (v/v), respectivamente. A amostra foi agitada e mantida em descanso a temperatura ambiente, após 60 minutos a amostra foi centrifugada a 5.000rpm 10 min e 4°C. Posteriormente, as duas fases foram separadas, foi feita a quantificação de proteínas totais e submetidas ao ensaio de inibição enzimática com o substrato BApNA.

4.8.3 Precipitação de proteínas por sistema trifásico

Foi realizado um sistema de precipitação trifásico (TPP), usando como fase orgânica o álcool isopropanol e, sal precipitante o sulfato de amônio. Esse método foi feito de duas formas para testar qual teria a melhor resolução, a primeira com o fracionamento salino até a fração 20-40% e a segunda com a fração salina em que o inibidor ficou em maior concentração, seguindo o protocolo descrito no item 4.6.1. Em cada uma das amostras foi adicionado álcool isopropanol na razão de 1/0.5 (v/v) e mantido em descanso por 60 min, a temperatura ambiente. Logo após a amostra foi centrifugada a 5.000rpm 10 min e 4°C. Posteriormente, as três fases foram separadas e destinadas a ensaios de inibição enzimática com o substrato BApNA.

4.9 Efeito da temperatura na ação do inibidor

Para verificar a influência da temperatura sob o inibidor alíquotas da amostra escolhida contendo o inibidor enzimático do *T. castaneum* foram incubadas a diversas temperaturas (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C) por 30 minutos e logo após cada uma das alíquotas foram submetidas ao ensaio de inibição enzimática, avaliado a taxa de hidrólise do substrato BApNA, na temperatura de 37°C e pH 8.

4.10 Efeito do pH na ação do inibidor

Alíquotas da amostra com o inibidor foram separadas e incubadas por 1 horas em diferentes faixas de pH (4 – 10). Para esse ensaio, os sistemas tampão escolhidos foram: acetato de sódio (pH 4-6); fosfato de sódio (pH 7,0); Tris-HCl (pH 8,0); glicina (pH 9-11) todos à concentração de 100mM. Posteriormente as amostras foram submetidas ao ensaio de inibição enzimática. Como controle foram feitas amostras com as diferentes faixas de pH, mas sem a presença do inibidor, para descartar a influência do pH na inibição da enzima.

4.11 Efeito de íons metálicos na ação do inibidor

Foram adicionados 140 ul de solução de cada um dos íons metálicos, Cloreto de zinco (ZnCl_2), Nitrato de potássio (KNO_3), Sulfato de Cobre (CuSO_4) Sulfato de Manganês (MnSO_4), Cloreto de Magnésio (MgCl_2), Cloreto de Cálcio (CaCl_2), Cloreto de Sódio (NaCl), a 10mM, em alíquotas de 140 ul da amostra com o inibidor, e foram incubadas na temperatura ótima por 30 minutos, após decorrido esse tempo as amostras foram submetidas ao ensaio de inibição enzimática, foi feito um controle para cada íon metálico, o qual não continha o inibidor, para analisar a influência dos íons sob a enzima.

4.12 Efeito de estabilizantes na ação do inibidor

O volume compatível com 1 ug/ul do inibidor foi misturado juntamente com o mesmo volume dos estabilizantes (CaCl 10%, BSA 1%, Gelatina 1%, CMC 0,5%,

Glicerol 10%, Glicina 10%, Sacarose 1%, Uréia 1%), depois foram incubados por 30 minutos em temperatura ótima do inibidor e então submetidos ao ensaio de hidrólise do BapNa, foi feito um controle para cada estabilizante, o qual não continha o inibidor, para analisar a influência dessas substâncias sob a enzima.

4.13 Inibição de crescimento do fungo *Amphobotrys ricini*

A atividade antifúngica da amostra em estudo foi avaliada contra o fungo *Amphobotrys ricini*. O fungo foi cultivado em placas de ágar batata em duas condições distintas: um grupo com a amostra contendo o inibidor do *Tribolium castaneum* e um grupo controle. Este último foi preparado utilizando o mesmo volume e componentes da amostra (mesmas concentrações de sulfato de amônio e isopropanol, além do tampão Tris HCl pH 8 50mM), mas sem a presença do inibidor. O experimento foi conduzido em triplicata, e após 7 dias, a diferença entre os grupos pôde ser visualmente observada através da diminuição da proliferação do fungo.

4.14 Análise Estatística

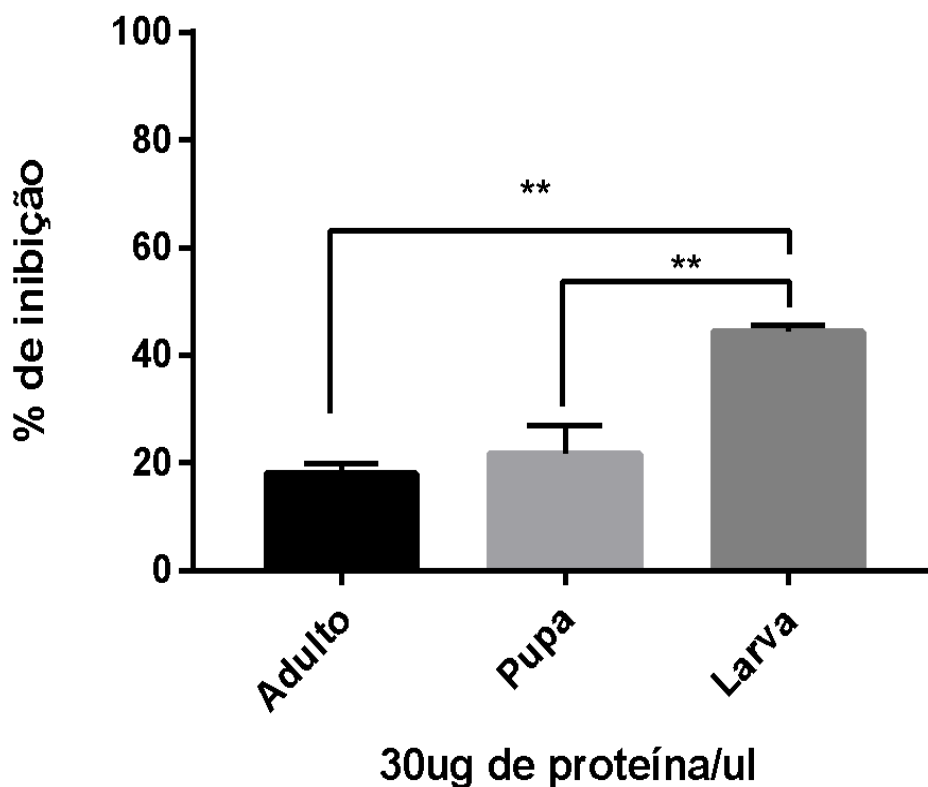
Os ensaios foram realizados em triplicata. Os dados foram organizados e submetidos a análise estatística utilizando o software GraphPad Prism®. As diferenças estatísticas entre os conjuntos de dados foram avaliadas por teste *t* e análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida de testes de comparação múltipla de Tukey, considerando significância estatística quando $p < 0,05$.

5 RESULTADO E DISCUSSÕES

5.1 Comparação da inibição proteolítica com extrato bruto das diferentes fases de desenvolvimento do inseto *Tribolium castaneum*

Visando certificar a presença do inibidor de protease do *Tribolium castaneum* e verificar qual fase de desenvolvimento é mais viável para a utilização nos ensaios, foram feitos extratos das fases de larva, pupa e adulto e em seguida, realizou-se uma análise quantitativa, acerca do efeito desses extratos brutos na hidrólise do substrato BApNA. O resultado mostrou que o inibidor está presente nas 3 fases de desenvolvimentos testadas, e a fase que mais teve atividade inibitória foi a de larva, com 44,22% de inibição, sendo a escolhida para dar prosseguimento aos ensaios. Já as fases de adulto e pupa não demonstraram diferença significativa entre elas, cerca de 20% de inibição (Figura 7).

Figura 7- Atividade inibitória dos extratos brutos da larva, pupa e adultos do inseto *T. castaneum*



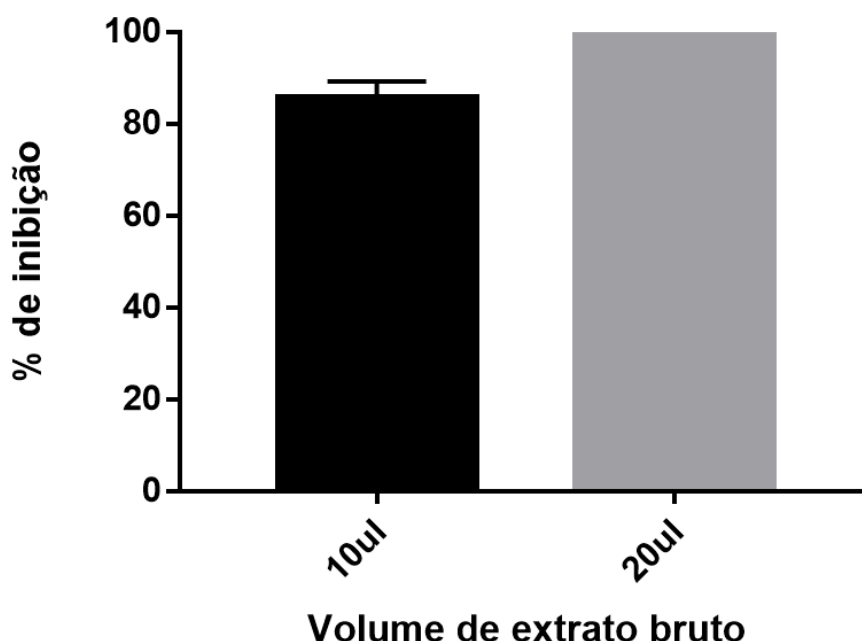
Fonte: elaborada pela autora, 2022

As atividades de inibidores de proteases também já foram identificadas nas larvas de insetos como *Anticarsia gemmatilis* (Rios-Díez, et al. 2022), *Mythimna unipuncta* (Cherqui, Cruz, Simões, 2001), *Sarcophaga bullata*, *Manduca sexta* (Sugumaran, Saul e Ramesh, 1985) e *Antheraea mylitta* (Rai, et al., 2010; Shrivastav e Ghosh, 2003). A presença do inibidor de protease em todas as fases de desenvolvimento do inseto, mas principalmente na fase de larva, sugere sua importância tanto na metamorfose quanto nos mecanismos de defesa desse inseto. Nos insetos com metamorfose completa, a transformação dos tecidos larvais e o amadurecimento dos tecidos adultos ocorrem ao mesmo tempo. O vazamento de proteases para a hemolinfa a partir dos tecidos larvais que estão se transformando ou dos hemócitos que se autolisam durante a metamorfose pode representar um desafio para o desenvolvimento dos tecidos adultos. Dessa forma, uma possível função dos inibidores de protease na hemolinfa pode ser a de proteger os tecidos adultos contra as ações prejudiciais das proteases durante esse período crítico de metamorfose (Suzuki e Natori, 1985; Shrivastav e Ghosh, 2003).

5.2 Inibição de protease do intestino da larva do *Tribolium castaneum*

Com o propósito de investigar o potencial inibitório do inibidor de protease endógeno do *Tribolium castaneum* contra suas próprias proteases, foi realizada uma análise de inibição das proteases presentes no intestino do inseto. Foi observado uma inibição completa (100%) da atividade proteolítica ao utilizar 20 µl de extrato bruto da larva inteira e 10 µl de extrato do intestino da larva (Figura 8). Os inibidores endógenos de protease têm como objetivo principal regular a atividade proteolítica no organismo, desempenhando também papéis importantes na digestão, desenvolvimento e respostas imunitárias (Clynen; Schoofs; Salzet, 2005). Além disso, pode-se inferir que, devido à sua ação sobre as proteases do próprio *T. castaneum*, o inibidor possui potencial para ser uma estratégia eficaz no controle de insetos pragas.

Figura 8- Atividade inibitória do extrato bruto da larva contra o extrato do intestino das larvas



Fonte: própria autora, 2023

5.3 Fracionamento Salino

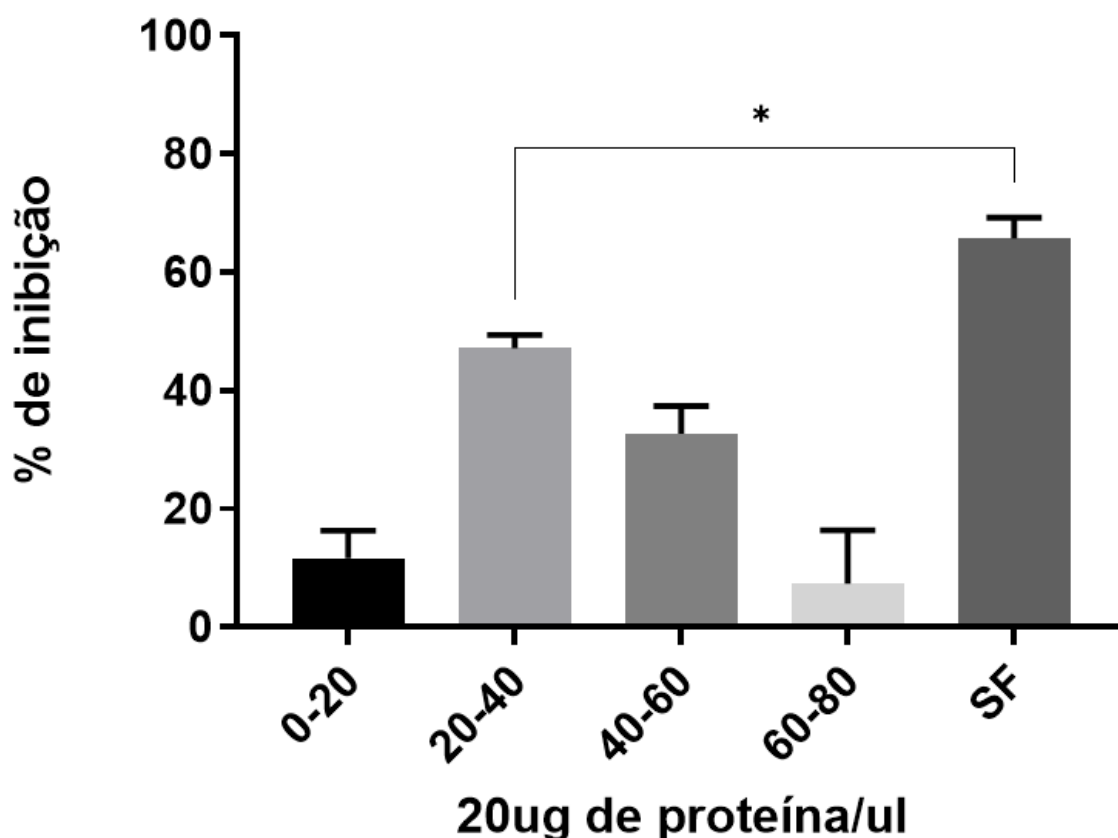
Após escolhido o extrato bruto da larva para dar seguimento ao estudo, ele foi submetido a uma precipitação salina, que consiste em um aumento gradativo da concentração de sal que competindo pela água de solvatação, acaba por tornar as proteínas do meio insolúveis, fazendo com que elas precipitem. Essa técnica foi realizada com o sal Sulfato de Amônio, reagente amplamente utilizado na purificação de inibidores de tripsina.

Visto que o extrato da larva é muito complexo, essa técnica tem a finalidade de tornar o extrato menos complexo diminuindo a quantidade de proteínas e contaminantes, e assim, elevar o grau de pureza da amostra. A técnica conhecida como *salting out* é amplamente empregada como um método eficaz de purificação e pode ser aplicada para isolar inibidores de proteases. Em 1992, Tsukamoto et al. utilizaram essa abordagem para isolar um inibidor de fenoloxidase endógeno da *Musca domestica* L., da mesma forma, em 1980, Engelmann e Geraerts empregaram

a técnica para purificar um inibidor de protease presente no intestino do inseto *Leucophaea maderae*, também foi purificado um inibidor de protease a partir da hemolinfa de larvas de *Antheraea mylitta* utilizando precipitação com sulfato de amônio (Shrivastav e Ghosh, 2003). Esses exemplos destacam a aplicabilidade da técnica *salting out* na purificação de inibidores de proteases em diferentes contextos e sistemas biológicos.

Após a precipitação cada fração obtida foi submetida ao monitoramento da atividade inibitória da protease a partir da hidrólise de BApNA, como observado na Figura 9 a maior concentração do inibidor ficou no sobrenadante final (SF). A maior concentração do inibidor no sobrenadante final sugere uma provável alta solubilidade, pois na precipitação salina as proteínas ou peptídeos menos solúveis são removidos conforme a concentração de sal aumenta, enquanto aquelas que permanecem em solução, mesmo em elevadas concentrações de sal, são consideradas altamente solúveis (Doung-Ly e Gabelli, 2014).

Figura 9 - Atividade inibitória das frações salinas do extrato bruto da larva do *Tribolium castaneum*



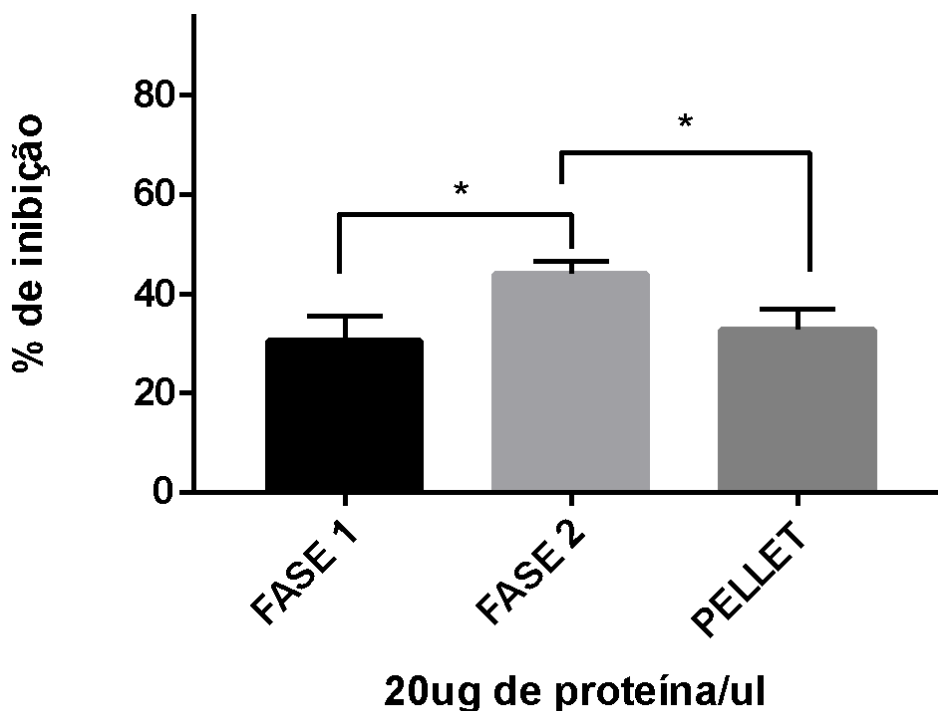
Fonte: própria autora, 2022

5.4 Sistema Aquoso bifásico com PEG

Apesar do bom resultado com o fracionamento salino, outras técnicas foram testadas, buscando uma melhor resolução e uma pureza maior da amostra. Primeiro foi usado um Sistema Aquosos de Duas Fases (ATPS) com PEG 3.500, que seria uma boa opção visto que a indústria biotecnológica demanda processos que sejam rápidos, eficientes e economicamente viáveis para a recuperação e purificação de biomoléculas. Nesse cenário, os ATPSs se destacam como uma tecnologia atraente, possibilitando a integração de etapas de clarificação, concentração e purificação parcial em um único processo (Rosa, et al., 2010).

O resultado obtido com a técnica (Figura 10) mostrou que a maior concentração do inibidor ficou na fase 2 (salina), porém ao comparar com o fracionamento salino (Figura 9) verificamos que essa técnica não obteve tanto sucesso, já que a atividade do inibidor não aumentou, mesmo o ensaio sendo feito com a mesma quantidade de proteínas. Sendo assim essa técnica foi descartada dando prosseguimento a outra técnica.

Figura 10- Atividade inibitória das frações do Sistema Aquosos de Duas Fases (ATPS)

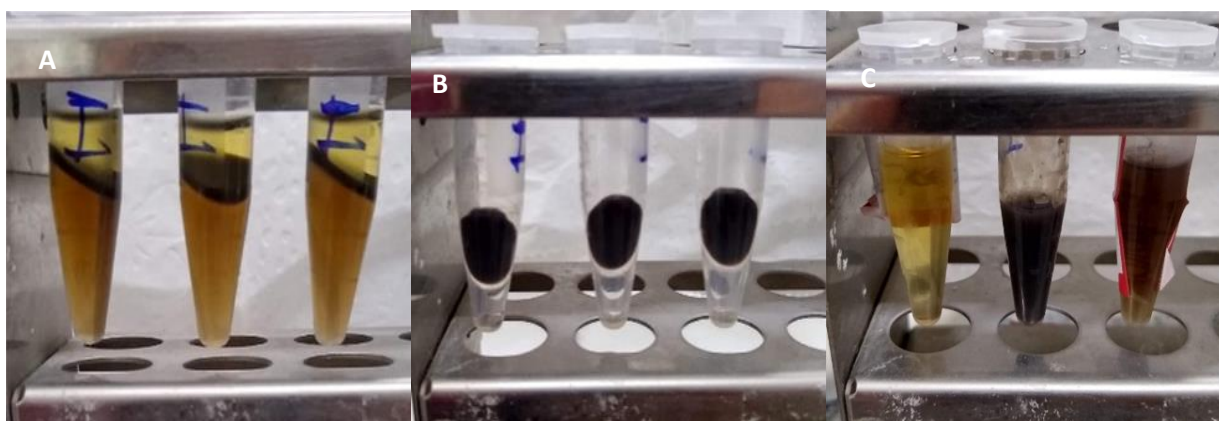


Fonte: própria autora, 2022

5.5 Sistema aquoso trifásico com isopropanol

Visando obter uma amostra mais purificada, realizou-se um fracionamento aquoso trifásico utilizando isopropanol/sal. Dois ensaios foram conduzidos: o primeiro envolveu o fracionamento salino até atingir a saturação de 40% de sal, e o segundo foi realizado com a amostra do sobrenadante final do fracionamento salino, onde a maior concentração do inibidor foi identificada. A técnica empregada consiste na associação do isopropanol às proteínas precipitadas na interface, promovendo um aumento em sua fluviabilidade. Isso resulta na manutenção dos precipitados acima da camada aquosa mais densa, composta pela solução salina (Figura 11).

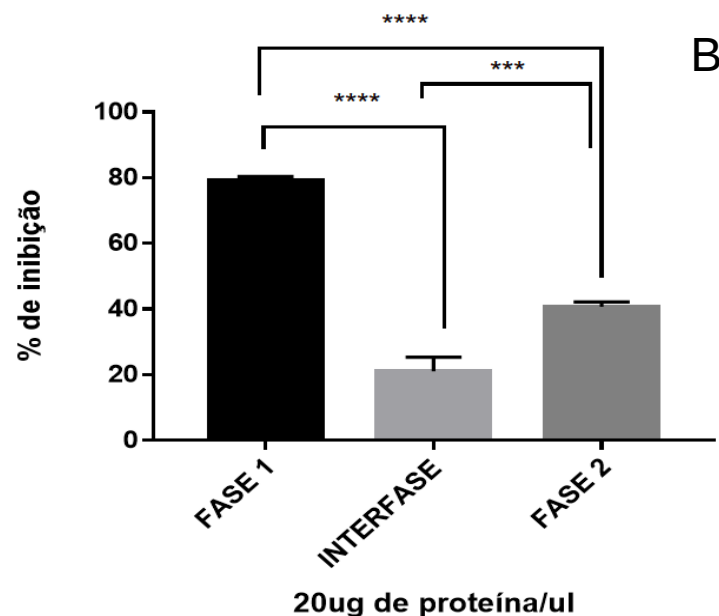
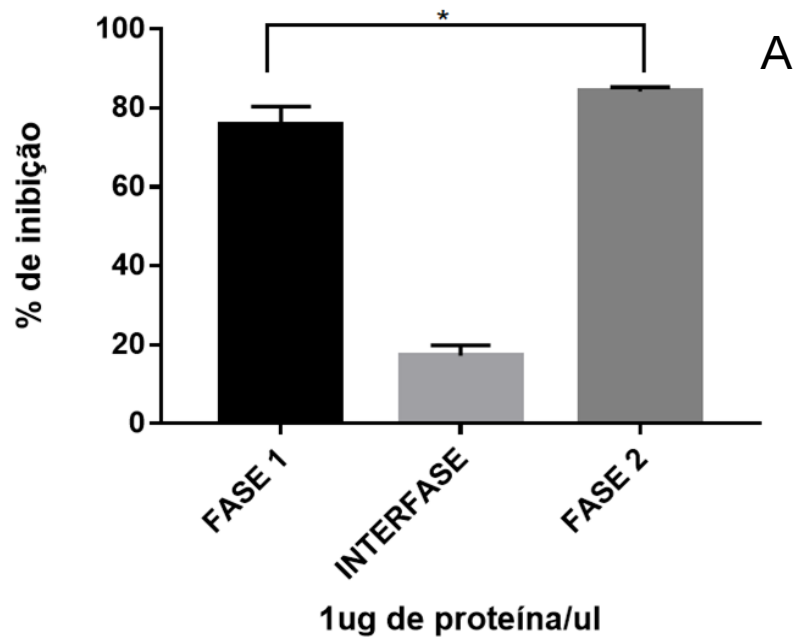
Figura 11- Fases do sistema aquoso trifásico: A- Separação das fases, B- disco de proteínas formado, C- fases separadas.



Fonte: própria autora, 2023

Ao analisar a Figura 12, pode-se notar que o ensaio realizado com o sobrenadante final foi mais bem-sucedido. Isso se deve ao fato de que, mesmo com uma concentração menor de proteínas na amostra, obteve-se uma porcentagem de inibição da enzima mais elevada. Apesar das fases 1 (fase alcoólica) e 2 (fase salina) apresentarem inibições semelhantes, a fase 2 demonstrou uma inibição significativamente superior (84,20%). Portanto, optou-se por prosseguir com os ensaios utilizando a fase 2.

Figura 12 - Atividade inibitória das fases do sistema aquoso trifásico com isopropanol, utilizando o sobrenadante final do fracionamento salino (A) e fração 20-40% do fracionamento salino com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (B).



Fonte: própria autora, 2022

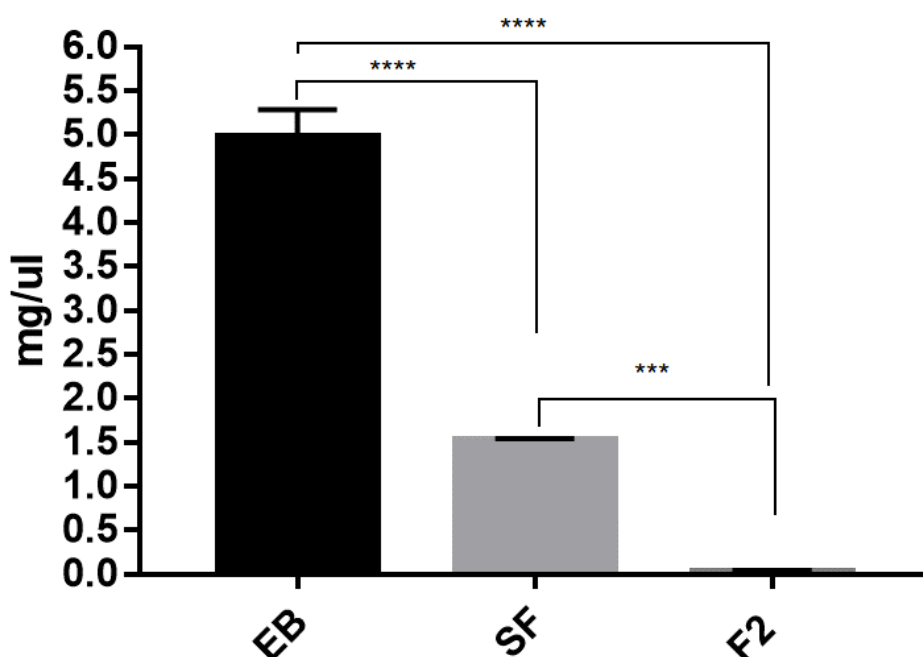
No sistema de precipitação trifásico os pigmentos, lipídeos e materiais hidrofóbicos serão encontrados em maior concentração na fase superior (alcoólica),

enquanto os componentes polares, como proteínas remanescentes, sacarídeos e eletrólitos, se concentraram predominantemente na fase inferior (aquosa) (Şen et al., 2011).

5.6 Quantificação de proteínas das etapas de pré-purificação da amostra

O êxito das técnicas empregadas pode ser confirmado pela quantificação das proteínas das fases de purificação. Ao comparar as etapas de fracionamento salino e a fase 2 (sistema aquoso trifásico com isopropanol/sal) com o extrato bruto, observamos uma considerável redução de contaminantes na amostra (Figura 13). Essa redução na quantidade de proteínas durante o processo de purificação é crucial para garantir a obtenção de amostras com proteínas altamente purificadas. Com menos interações com outros componentes da amostra, a ação do inibidor pode ser potencializada. Processos de purificação de proteínas eficientes podem resultar em redução de custos e aumento na produção de proteínas puras (Labrou, 2014).

Figura 13 - Concentração de proteínas no extrato bruto (EB), sobrenadante final do fracionamento salino (SF) e fase dois do sistema aquoso trifásico álcool/sal (F2)

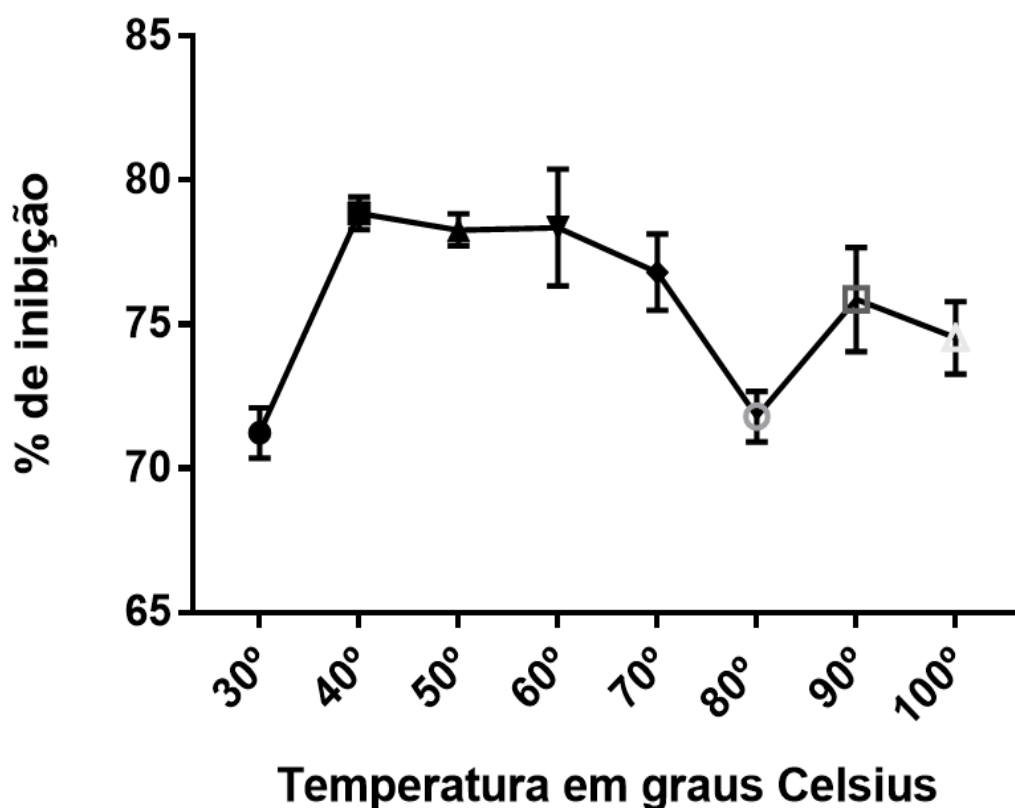


Fonte: própria autora, 2022

5.7 Efeito da temperatura na atividade do inibidor

A Figura 14 mostra a resistência do inibidor de *T. castaneum* a uma ampla faixa de temperaturas, exibindo um desempenho inibitório satisfatório em todas as condições térmicas testadas, inclusive em temperaturas elevadas, como 90 e 100°C. Isso evidencia uma característica estrutural crucial da molécula, sua capacidade de manter a integridade estrutural mesmo quando exposta ao calor.

Figura 14 - Efeito da temperatura na atividade inibitória do inibidor do *T. castaneum*



Fonte: própria autora, 2022

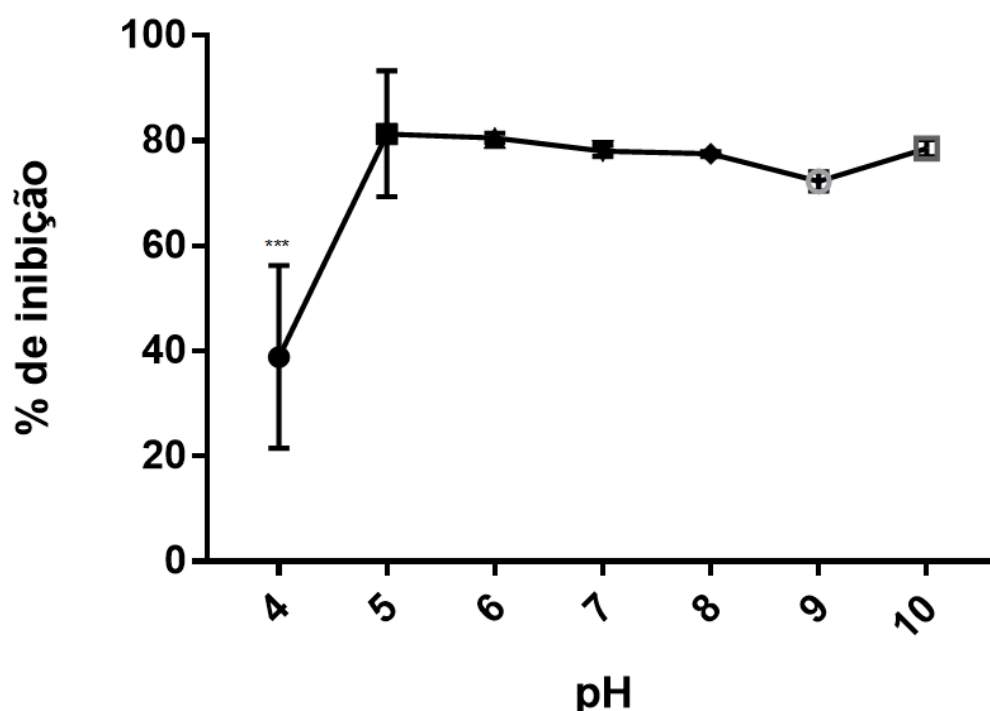
Achados semelhantes foram encontrados por outros autores como na larva do inseto praga *Anticarsia gemmatalis* (lepidóptera: Noctuidae) no qual atividade de inibição mostrou estabilidade a 25–70°C (Ríos-Díez, et al. 2022) e na larva de *Munduca sexta* que teve dois inibidores purificados e estáveis a 100° C. Essa

característica pode ser atribuída às ligações de dissulfeto, as quais têm o potencial de aumentar a estabilidade global das proteínas, tornando-as menos suscetíveis à desnaturação provocada por temperaturas elevadas (Silva e Silva, 2000). A estabilidade térmica é um atributo importante para a aplicabilidade biotecnológica dos inibidores de protease em processos que envolvem altas temperaturas.

5.8 Efeito do pH na atividade do inibidor de *T. castaneum*

A influência do pH também foi testada, e o resultado (Figura 15) revelou resistência a uma vasta gama de variações do pH. A atividade inibitória manteve-se em torno de 80%, com o inibidor mostrando uma redução da atividade apenas no pH 4 (ANOVA $p \leq 0,05$).

Figura 15 - Efeito do pH na atividade inibitória do inibidor do *T. castaneum*



Fonte: própria autora, 2022

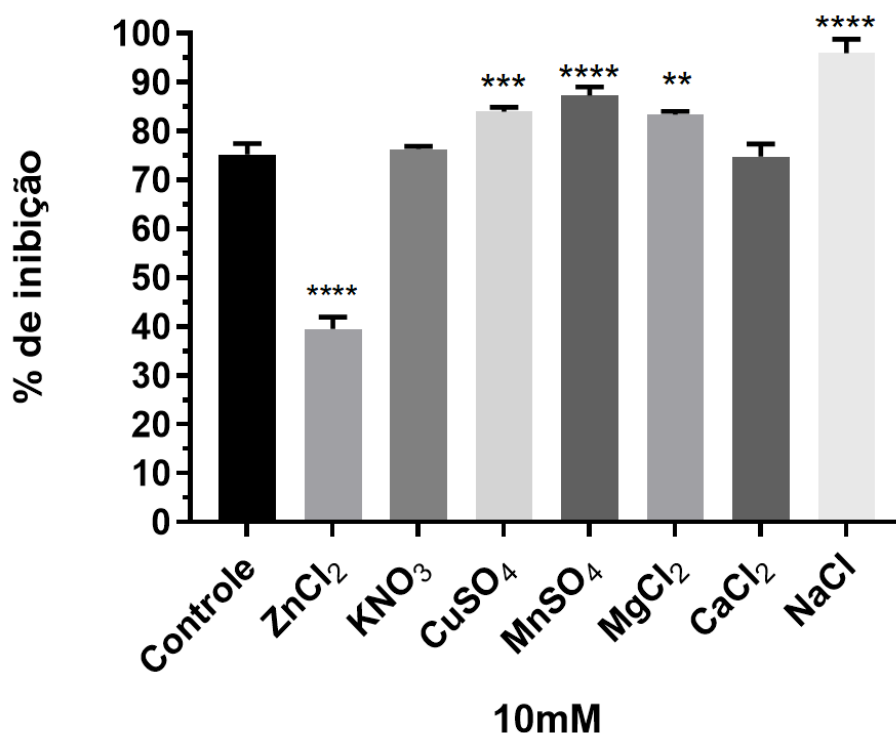
O inibidor de protease presente na larva de *Antheraea mylittab* também exibiu estabilidade em uma ampla faixa de pH (entre 4,5 e 9,0) (RAI et al. 2010). Além disso, um inibidor extraído do inseto *Anticarsia gemmatilis* (lepidóptera: Noctuidae) se manteve estável em valores de pH 7,2 e 9,2 (Rios-Díez et al. 2022).

As amplas variações de pH e temperatura em que o inibidor do *T. castaneum* mantém sua funcionalidade sugerem uma notável flexibilidade estrutural e conformacional, atributos que ampliam seu potencial para aplicações biotecnológicas.

5.9 Influência de íons metálicos

A presença de íons metálicos desempenha um papel crucial na preservação da integridade estrutural do inibidor de protease. Um teste foi realizado para avaliar a interferência de íons metálicos na atividade do inibidor extraído do *T. castaneum* (Figura 16). CuSO_4 , MnSO_4 , MgCl_2 e NaCl apresentaram um aumento na atividade do inibidor, enquanto o ZnCl_2 resultou em uma diminuição. KNO_3 e CaCl_2 não demonstraram alterações significativas na atividade do inibidor em comparação com o controle, estabelecido com base na atividade do inibidor. A presença de íons metálicos pode influenciar a atividade enzimática e a estabilidade dos inibidores de proteases, afetando sua interação com as proteínas-alvo.

Figura 16-Efeitos de diferentes íons metálicos na atividade do inibidor do *T. castaneum*



Fonte: própria autora, 2023

Algumas enzimas dependem de íons metálicos para realizarem suas funções catalíticas, seja se ligando aos aminoácidos da proteína durante a reação ou participando diretamente da catálise. No entanto, nem todos os íons metálicos são benéficos para as enzimas. Alguns podem interagir com a estrutura da proteína e inibir sua atividade. O impacto dos diferentes íons metálicos nas enzimas varia e depende das características de cada uma (Pacheco et al., 2021). Por exemplo, o cálcio pode aumentar a estabilidade de algumas proteínas, mas ainda não se entendem completamente como isso funciona em proteases (Kotornan et al., 2003). A presença de íons metálicos pode influenciar a atividade enzimática e consequentemente a estabilidade dos inibidores de proteases, afetando sua interação com as proteínas-alvo.

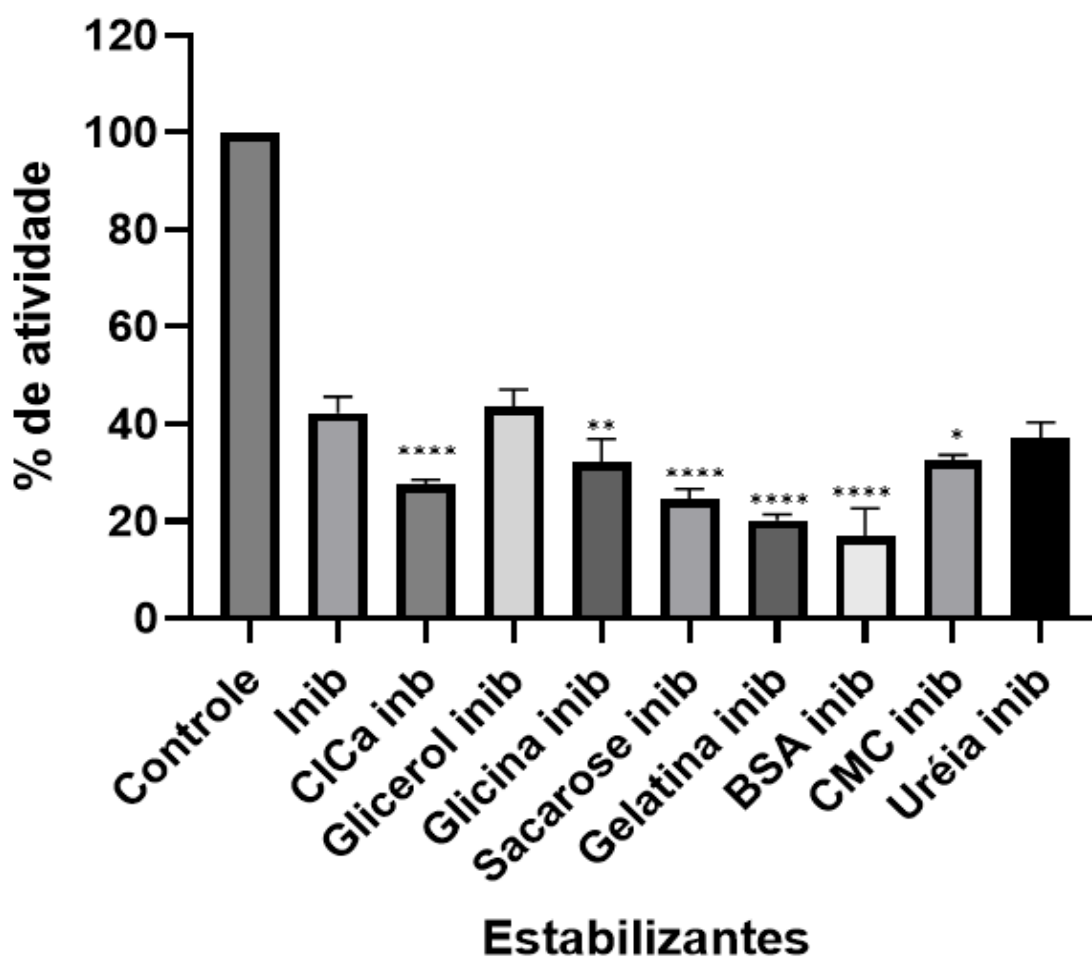
Um inibidor de serinoprotease purificado de *Escherichia coli* também foi submetido a um ensaio para verificar os efeitos dos íons metálicos, mostrando que a presença dos íons Zn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} aumentou a atividade do inibidor de protease, enquanto a presença dos íons Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} e Na^{+} teve efeitos negativos e não suportou a atividade inibidora de protease em comparação com o controle (Hong et al., 2020). Esses resultados contrastam com os observados no inibidor de protease do *T. castaneum*, ressaltando a influência variável dos íons metálicos na atividade dos inibidores de proteases, podendo ter diversos efeitos nos processos enzimáticos. Podendo afetar a atividade, estabilidade e interações entre enzimas e inibidores de protease com seus substratos.

5.10 Efeito dos estabilizantes na atividade do inibidor

Os estabilizantes desempenham um papel crucial na preservação da estabilidade estrutural e da atividade funcional das moléculas. Para preservar a estrutura nativa das proteínas durante processos de resfriamento, congelamento ou dessecação, são adicionados produtos químicos à solução. Esses produtos incluem polióis como glicerol, açúcares como trealose, sacarose, maltose e dextrano, dimetilsulfóxido, álcool polivinílico, etilenoglicol ou sais. Todos esses produtos modificam a estrutura e os movimentos das moléculas de água próximas, ajudando a proteger a conformação das proteínas (Ragoonanan e Aksan, 2007).

Diversos estabilizantes foram testados em conjunto com o inibidor, utilizando concentração de proteínas 1ug/ul de amostra contendo o inibidor, a temperatura de 40° C, por 30 minutos. Os resultados apontaram que ClCa, Glicina, Sacarose, Gelatina, BSA e CMC se mostraram eficazes, visto que potencializaram a atividade inibitória. Notavelmente, BSA e Gelatina elevaram a inibição em cerca de 20%, inibindo 83% e 80% da atividade proteolítica, respectivamente. Por outro lado, o Glicerol e a Ureia, não exibiram resultados tão promissores e não mostraram diferença significativa em comparação à amostra tratada apenas com o inibidor (Figura 17).

Figura 17- Atividade proteolítica na presença do inibidor de *T. castaneum* e de estabilizantes

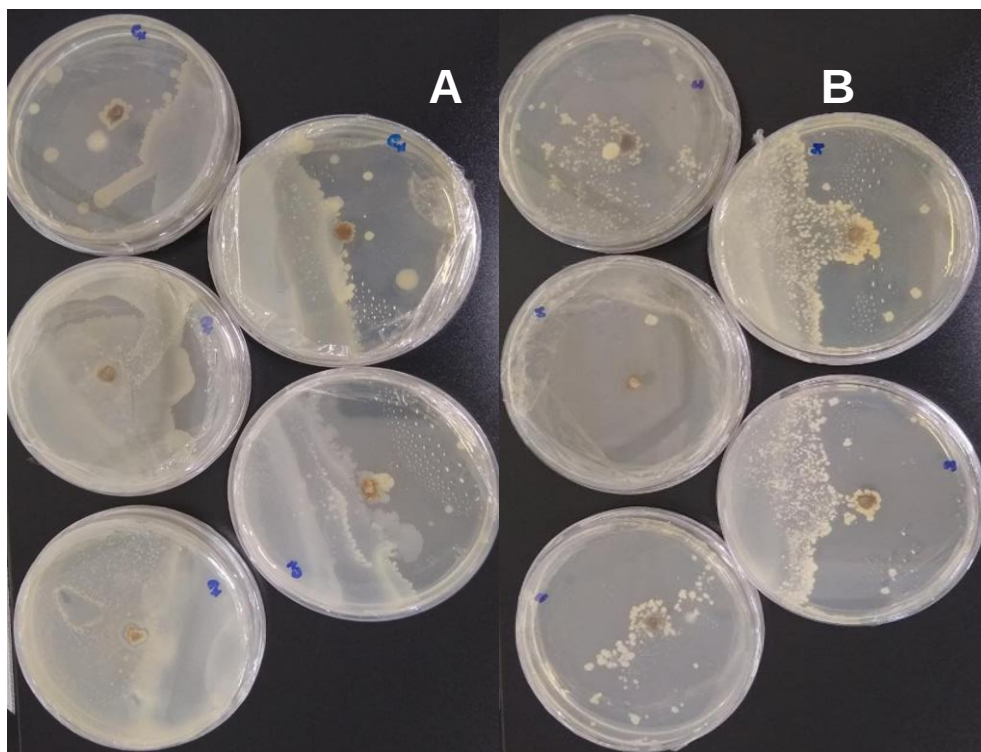


Os resultados obtidos são consistentes com estudos anteriores encontrados na literatura. Por exemplo, no caso do inibidor de protease de *Conyza dioscoridis*, o ClCa2 foi identificado como o melhor estabilizador, proporcionando 86% de inibição, seguido por BSA, com 70% de inibição (Karray et al., 2020). Da mesma forma, no inibidor de protease de *Phaseolus vulgaris*, observou-se que a estabilidade máxima foi alcançada com CaCl₂, resultando em 92% de inibição, seguido por glicerol (87% de inibição), glicina (70% de inibição) e sacarose (64% de inibição) (Puntambekar e Dake, 2017). Essa consistência reforça a importância desses estabilizadores na preservação da atividade inibitória das proteínas.

5.11 Inibição do crescimento de *Amphobotrys ricini*.

A amostra que continha o inibidor extraído da larva do *T. castaneum* foi também avaliada contra o fungo fitopatogênico *Amphobotrys ricini*. Na Figura 18, é possível observar que nas placas onde a amostra foi aplicada (Figura 18-B) houve uma inibição do crescimento fúngico em comparação com o grupo controle (Figura 18-A).

Figura 18 - Inibição do crescimento do *Amphobotrys ricini*. A- controle, B- com inibidor



Fonte: própria autora, 2023

Os inibidores de protease presentes nos insetos desempenham um papel de defesa contra a invasão de microrganismos. O sistema imunológico do inseto reage por meio de uma resposta humoral, caracterizada pela síntese rápida e transitória de proteínas com potente atividade antimicrobiana (Gillespie; Kanost; Trenczek, 1997). A exemplo de um inibidor de protease fúngica (FPI-F) purificado da hemolinfa do bicho-da-seda, *Bombyx mori* (Eguchil, et al., 1993)

6 CONCLUSÃO

Este estudo investigou a capacidade inibitória de um inibidor de protease presente no inseto *Tribolium castaneum*. Analisando as fases de larva, pupa e adulto, identificou-se que o inibidor estava presente em todas as fases testadas, sendo a fase larval a mais promissora, apresentando uma atividade inibitória de 44,22%. Para refinar a amostra e elevar sua pureza, algumas técnicas de fracionamento foram exploradas. O fracionamento salino utilizando sulfato de amônio juntamente com o sistema aquoso trifásico com isopropanol demonstraram um bom potencial no aumento da pureza da amostra.

Testes subsequentes focaram na estabilidade do inibidor. O inibidor de *T. castaneum* mostrou resistência notável a uma ampla variação de temperaturas, mantendo sua integridade mesmo sob condições extremas, como 90 e 100°C. Esta resistência pode ser atribuída às características estruturais da molécula, como ligações dissulfeto. Além disso, o inibidor também demonstrou uma resistência considerável a variações de pH, mantendo uma atividade inibitória em torno de 80% em todos os pHs testados, exceto no pH 4.

Ao testar a influência de sais metálicos na atividade do inibidor, foi observado que certos sais, como CuSO₄ e MnSO₄, potencializaram a atividade inibitória, enquanto outros, como ZnCl₂, diminuíram. Em relação aos estabilizantes, alguns, como BSA e Gelatina, aumentaram significativamente a atividade inibitória.

Por fim, o inibidor, quando testado contra o fungo fitopatogênico *Amphobotrys ricini*, demonstrou a capacidade de diminuir a velocidade do seu crescimento, destacando um possível uso do inibidor no controle de patógenos fúngicos. Por fim, esse estudo contribui para aumentar o conhecimento sobre inibidores presentes em insetos e suas propriedades bioquímicas, além de possíveis aplicações biotecnológicas, dadas suas propriedades de inibição e estabilidade.

REFERÊNCIAS

- 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.
- BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica. Reverté**, 2007.
- CAMPBELL, James F. et al. *Tribolium castaneum*: a model insect for fundamental and applied research. **Annual Review of Entomology**, v. 67, p. 347-365, 2022.
- CHERQUI, Anas; CRUZ, Norberto; SIMÕES, Nelson. Purification and characterization of two serine protease inhibitors from the hemolymph of *Mythimna unipuncta*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 8, p. 761-769, 2001.
- CHEVREUIL, Larissa Ramos et al. Partial purification of trypsin inhibitors from *Parkia* seeds (Fabaceae). *Hoehnea*, v. 41, n. 2, p. 181-186, 2014.
- CHOWANSKI, S.; et al. Insect peptides—perspectives in human diseases treatment. **Current medicinal chemistry**. v. 24, n. 29, p. 3116-3152, 2017
- CLYNEN, Elke; SCHOOF, Liliane; SALZET, Michel. A review of the most important classes of serine protease inhibitors in insects and leeches. **Medicinal Chemistry Reviews-Online (Discontinued)**, v. 2, n. 3, p. 197-206, 2005.
- 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, Juliana et al. Biotechnological, biomedical, and agronomical applications of plant protease inhibitors with high stability: A systematic review. **Plant Science**, v. 292, p. 110398, 2020.
- DEVI, M. B.; DEVI, N. V. Biology of Rust-Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Biological Forum – An International Journal**. n. 7, v. 1, p. 12-15, 2015.
- 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, Masaharu et al. Purification and characterization of a fungal protease specific protein inhibitor (FPI-F) in the silkworm haemolymph. **Comparative biochemistry and physiology: B: Comparative biochemistry**, v. 104, n. 3, 1993.
- EGUCHI, Masaharu. Protein protease inhibitors in insects and comparison with mammalian inhibitors. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 105, n. 3-4, p. 449-456, 1993.
- 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, Franz; GERAERTS, Wijnand 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.
- FARONI, L. R.; FRABETTI, D. R. Principais pragas de grãos armazenados. Net, Minas Gerais, out. 2009. Disponível em: <http://www.centreinar.org.br>. Acesso em: 10 jun. 2018.
- FUTAHASHI, Ryo; OSANAI-FUTAHASHI, Mizuko. Pigments in insects. **Pigments, pigment cells and pigment patterns**, p. 3-43, 2021.
- GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA-NETO, S. et al. **Entomologia agrícola**. Piracicaba, SP: FEALQ, 920 p, 2002.

GILLESPIE AND, Jeremy P.; KANOST, Michael R.; TRENCZEK, Tina. Biological mediators of insect immunity. **Annual review of entomology**, v. 42, n. 1, p. 611-643, 1997.

GREEN, Arda Alden; HUGHES, Walter L. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. 1955.

GUTIERREZ-GONGORA, Davier; GEDDES-MCALISTER, Jennifer. From naturally-sourced protease inhibitors to new treatments for fungal infections. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 12, p. 1016, 2021.

HONG, Tran Thi et al. Expression and characterization of a new serine protease inhibitory protein in Escherichia coli. **Biomedical Research and Therapy**, v. 7, n. 2, p. 3633-3644, 2020.

ISHAK, Nadiyah et al. Insect Enzymes For Biotechnology Industry: From Nature To Industrial Applications. **Journal of Engineering and Health Sciences**, v. 3, n. 1, p. 25-40, 2019.

JAGADEESAN, Rajeswaran et al. Phosphine resistance in the rust red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae): inheritance, gene interactions and fitness costs. **PLoS one**, v. 7, n. 2, p. e31582, 2012.

JIANG, Haobo; KANOST, Michael R. The clip-domain family of serine proteinases in arthropods. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 30, n. 2, p. 95-105, 2000.

JIANG, Rui et al. Three pairs of protease-serpin complexes cooperatively regulate the insect innate immune responses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 51, p. 35652-35658, 2009.

JOSHI, Bimba N. et al. Cysteine protease inhibitor from pearl millet: a new class of antifungal protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, n. 2, p. 382-387, 1998.

KANNAN, M. et al. Insect gut as a bioresource for potential enzymes-an unexploited area for industrial biotechnology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, p. 101010, 2019.

KANOST, Michael R. Serine proteinase inhibitors in arthropod immunity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 23, n. 4-5, p. 291-301, 1999.

KARRAY, Aida et al. Purification and biochemical characterization of a new protease inhibitor from *Conyza dioscoridis* with antimicrobial, antifungal and cytotoxic effects. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5452, 2020.

KOTORMÁN, M. et al. Effects of Ca²⁺ on catalytic activity and conformation of trypsin and α -chymotrypsin in aqueous ethanol. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 304, n. 1, p. 18-21, 2003.

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

LABROU, Nikolaos E. Protein purification: an overview. **Protein downstream processing: design, development and application of high and low-resolution methods**, p. 3-10, 2014.

LEVIEN, Terri L.; BAKER, Danial E. Remdesivir. **Hospital Pharmacy**, v. 58, n. 5, p. 420-430, 2023.

MACEDO, Maria L.R. et al. Adaptive mechanisms of insect pests against plant protease inhibitors and future prospects related to crop protection: a review. **Protein and peptide letters**, v. 22, n. 2, p. 149-163, 2015.

MARIAM, SH Sharifah et al. Purification of rabbit polyclonal immunoglobulin G with ammonium sulphate precipitation and mixed-mode chromatography. **Separation and purification technology**, v. 144, p. 133-138, 2015.

MIKA, Nicole; ZORN, Holger; RÜHL, Martin. Insect-derived enzymes: a treasure for industrial biotechnology and food biotechnology. **Yellow Biotechnology II: Insect Biotechnology in Plant Protection and Industry**, p. 1-17, 2013.

MILANI, M. et al. Resistência da mamoneira (*Ricinus communis* L.) ao mofo cinzento causado por *Amphobotrys ricini*. 2005.

MORAES, Wanderson Bucker et al. Epidemiologia e manejo do mofo cinzento da mamona. **Nucleus**, v. 8, n. 2, p. 1-12, 2011.

NADAR, Shamraja S.; PAWAR, Rohini G.; RATHOD, Virendra K. Recent advances in enzyme extraction strategies: A comprehensive review. **International journal of biological macromolecules**, v. 101, p. 931-957, 2017.

NAGGIE, Susanna; HICKS, Charles. Protease inhibitor-based antiretroviral therapy in treatment-naive HIV-1-infected patients: the evidence behind the options. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1094-1099, 2010.

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

OTVOS, JR, Laszlo. Antibacterial peptides isolated from insects. **Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society**, v. 6, n. 10, p. 497-511, 2000.

PACHECO, T. F.; MENDES, T. D. Guia prático para caracterização de enzimas. 2021.

PANDHARE, Jui; ZOG, Kavita; DESHPANDE, Vasanti V. Differential stabilities of alkaline protease inhibitors from actinomycetes: effect of various additives on thermostability. **Bioresource technology**, v. 84, n. 2, p. 165-169, 2002.

PARAMASIVAM, M.; SELVI, C. Laboratory bioassay methods to assess the insecticide toxicity against insect pests-A review. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v. 5, n. 3, p. 1441-1445, 2017.

POINTER, Michael D.; GAGE, Matthew JG; SPURGIN, Lewis G. Tribolium beetles as a model system in evolution and ecology. **Heredity**, v. 126, n. 6, p. 869-883, 2021.

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

PUNTAMBEKAR, Ashwini; DAKE, Manjusha. Protease inhibitor from white cranberry beans (*Phaseolus vulgaris*): isolation, purification and characterization. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 9, p. 190-198, 2017.

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

RAGOONANAN, Vishard; AKSAN, Alptekin. Protein stabilization. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 34, n. 4, p. 246-252, 2007.

RAI, Shruti et al. Purification, characterization and immunolocalization of a novel protease inhibitor from hemolymph of tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. **Peptides**, v. 31, n. 3, p. 474-481, 2010.

RANASINGHE, Shiwanthi L. et al. Kunitz type protease inhibitor EgKI-1 from the canine tapeworm *Echinococcus granulosus* as a promising therapeutic against breast cancer. **PloS one**, v. 13, n. 8, p. e0200433, 2018.

RATCLIFFE, Norman A. et al. Insect natural products and processes: new treatments for human disease. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 10, p. 747-769, 2011.

RAWLINGS, Neil D. et al. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database. **Nucleic acids research**, v. 46, n. D1, p. D624-D632, 2018.

RAWLINGS, Neil D.; TOLLE, Dominic P.; BARRETT, Alan J. Evolutionary families of peptidase inhibitors. **Biochemical Journal**, v. 378, n. 3, p. 705-716, 2004.

RIMPHANITCHAYAKIT, Vichien; TASSANAKAJON, Anchalee. Structure and function of invertebrate Kazal-type serine proteinase inhibitors. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 34, n. 4, p. 377-386, 2010.

RIOS-DÍEZ, Juan D. et al. Novel proteinase inhibitor from the hemolymph of soybean pest *Anticarsia gemmatilis* (Lepidoptera: Noctuidae): Structural modeling and enzymatic kinetic. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 109, n. 3, p. e21864, 2022.

RIZVI, Syed Arif Hussain et al. Latest developments in insect sex pheromone research and its application in agricultural pest management. **Insects**, v. 12, n. 6, p. 484, 2021.

Rösner J, Wellmeyer B, Merzendorfer H. *Tribolium castaneum*: a model for investigating the mode of action of insecticides and mechanisms of resistance. *Current pharmaceutical design*. 2020 Aug 1;26(29):3554-68.

SANTOS, Cláudio Wilian Victor dos. Serino protease e inibidor de tripsina: purificação, caracterização e aplicação biotecnológica. 2020. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2020.

SATHEESH, L. Shilpa; MURUGAN, K. Antimicrobial activity of protease inhibitor from leaves of *Coccinia grandis* (L.) Voigt. 2011.

SCARDINI MARINHO, Jeanne et al. Resposta bioquímica de *thyrinteina leucoceraea* a inibidor de proteases em plantas de goiaba. **Idesia (Arica)**, v. 28, n. 3, p. 101-109, 2010.

ŞEN, Aysu et al. Purification of α -galactosidase from pepino (*Solanum muricatum*) by three-phase partitioning. **Separation and purification technology**, v. 83, p. 130-136, 2011.

SHAMSI, Tooba Naz; PARVEEN, Romana; FATIMA, Sadaf. Characterization, biomedical and agricultural applications of protease inhibitors: A review. **International journal of biological macromolecules**, v. 91, p. 1120-1133, 2016.

SHRIVASTAVA, Binita; GHOSH, Ananta Kumar. Protein purification, cDNA cloning and characterization of a protease inhibitor from the Indian tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 33, n. 10, p. 1025-1033, 2003.

SILVA, Mara Reis; SILVA, Maria Aparecida Azevedo Pereira da. Fatores antinutricionais: inibidores de proteases e lectinas. **Revista de Nutrição**, v. 13, p. 3-9, 2000.

SONG, Xiao-yu et al. Secretory leukocyte protease inhibitor suppresses the inflammation and joint damage of bacterial cell wall-induced arthritis. **The Journal of experimental medicine**, v. 190, n. 4, p. 535-542, 1999.

STORK, Nigel E. How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth?. **Annual review of entomology**, v. 63, p. 31-45, 2018.

SUGUMARAN, M.; SAUL, S. J.; RAMESH, N. Endogenous protease inhibitors prevent undesired activation of prophenolase in insect hemolymph. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 132, n. 3, p. 1124-1129, 15 nov. 1985.

SUZUKI, T.; NATORI, Shunji. Purification and characterization of an inhibitor of the cysteine protease from the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 8, p. 5115-5120, 1985.

TSUKAMOTO, Takuji et al. Identification and isolation of endogenous insect phenoloxidase inhibitors. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 184, n. 1, p. 86-92, 1992.

TUBIO, Gisela; NERLI, Bibiana; PICÓ, Guillermo. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. **Journal of Chromatography B**, v. 799, n. 2, p. 293-301, 2004.

VAGADIA, Brinda Harish; VANGA, Sai Kranthi; RAGHAVAN, Vijaya. Inactivation methods of soybean trypsin inhibitor—A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 64, p. 115-125, 2017.

VINOKUROV, K. S. et al. Digestive proteolysis organization in two closely related tenebrionid beetles: red flour beetle (*Tribolium castaneum*) and confused flour beetle (*Tribolium*

confusum). **Archives of Insect Biochemistry and Physiology: Published in Collaboration with the Entomological Society of America**, v. 70, n. 4, p. 254-279, 2009.

VIJAYARAGAVAN, K. Saagar et al. Separation of porcine parvovirus from bovine serum albumin using PEG–salt aqueous two-phase system. **Journal of Chromatography B**, v. 967, p. 118-126, 2014.

WANG, Yan et al. Utility of insects for studying human pathogens and evaluating new antimicrobial agents. **Yellow biotechnology I: insect biotechnologie in drug discovery and preclinical research**, p. 1-25, 2013.

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

YI, Hui-Yu et al. Insect antimicrobial peptides and their applications. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, p. 5807-5822, 2014.