

# Prospecção de Moléculas Bioativas em Animais e Plantas: Uma Visão Biotecnológica

Regina Meneses Gonçalves  
Breno Emanuel Farias Frihling  
Ludovico Migliolo  
(Organizadores)



**Atena**  
Editora  
Ano 2019

Regina Meneses Gonçalves  
Breno Emanuel Farias Frihling  
Ludovico Migliolo  
(Organizadores)

# Prospecção de Moléculas Bioativas em Animais e Plantas: Uma Visão Biotecnológica

Atena Editora  
2019

2019 by Atena Editora  
Copyright © Atena Editora  
Copyright do Texto © 2019 Os Autores  
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora  
Editora Executiva: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Antonella Carvalho de Oliveira  
Diagramação: Lorena Prestes  
Edição de Arte: Lorena Prestes  
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

#### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Prof.ª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
Prof. Msc. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista  
Prof.ª Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Prof.ª Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal  
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

<b>Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)</b>	
P966	Prospecção de moléculas bioativas em animais e plantas [recurso eletrônico] : uma visão biotecnológica / Organizadores Regina Meneses Gonçalves, Breno Emanuel Farias Frihling, Ludovico Migliolo. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019.  Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-575-4 DOI 10.22533/at.ed.754190209  1. Bioquímica. 2. Biotecnologia. 3. Microbiologia. I. Gonçalves, Regina Menesas. II. Frihling, Emanuel Farias. III. Migliolo, Ludovico. CDD 660.6
<b>Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422</b>	

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil  
[www.atenaeditora.com.br](http://www.atenaeditora.com.br)  
contato@atenaeditora.com.br

## APRESENTAÇÃO

A obra intitulada “*Prospecção de moléculas bioativas em animais e plantas: uma visão biotecnológica*” consiste em uma coletânea de artigos científicos apresentados em 9 capítulos, com enfoque em biotecnologia. Na mesma, foram expostos conhecimentos sobre bioquímica, microbiologia e bioinformática, com estudos em diferentes espécies, abrangendo a biodiversidade brasileira.

Na biotecnologia, os campos de estudos são muito amplos e englobam pesquisas complexas envolvendo microrganismos, plantas e animais. Desta forma, a obra apresenta pesquisas sobre moléculas bioativas derivadas de aracnídeos, insetos, répteis, anfíbios e plantas. Essas moléculas bioativas apresentam uma gama de atividades biológicas, e algumas dessas, com potencial antimicrobiano, inibidores de peptidases, entre outras, foram apresentadas no decorrer da obra.

Ademais, moléculas protéicas bioativas provenientes de fontes naturais, podem ter sua sequencias primárias caracterizadas e modificada por meio da bioinformática (metodologia de desenho racional), que busca melhorar seu potencial terapêutico *in vitro* partindo de estudos *in silico*.

As informações geradas nesta obra são de extrema relevância em nível acadêmico, pois mostra pesquisas básicas avançando para pesquisas aplicadas, o que proporciona o enriquecimento da comunidade científica e formação profissional de alunos de graduação e pós graduação.

Regina Meneses Gonçalves  
Breno Emanuel Farias Frihling  
Ludovico Migliolo

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
ANÁLISE DE PERFIL PROTEICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBACTERIANO DA HEMOLINFA DA ARANHA <i>Nhandu carapoensis</i>	
Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes Patrícia Souza e Silva Alexya Sandim Guindo Ludovico Migliolo	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902091</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>17</b>
CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL ANTIBIOFILME E ANTITUMORAL DA PEÇONHA DE <i>Tityus confluens</i>	
Regina Meneses Gonçalves Danieli Fernanda Buccini Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes Ludovico Migliolo	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902092</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>30</b>
AVALIAÇÃO DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE LARVAS NECRÓFAGAS <i>Chrysomya albiceps</i> (DIPTERA, CALLIPHORIDAE) INIBIDORAS DE BIOFILME DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC	
Patrícia Souza e Silva Regina Meneses Gonçalves Daniela Lopes Da Cunha Lucas Rodrigues de Lima Carina Elisei De Oliveira Ludovico Migliolo	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902093</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>41</b>
EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS TOXINAS PRESENTE EM LAGARTA <i>Lonomia obliqua</i> (LEPIDOPTERA, SATURNIIDAE) COM ATIVIDADE ANTIBIOFILME	
Patrícia Souza e Silva Luiz Filipe Ramalho Nunes de Moraes Elizangela de Barros Ana Paula de Araújo Boleti Ludovico Migliolo	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902094</b>	
<b>CAPÍTULO 5</b> .....	<b>51</b>
DESENHO RACIONAL DE PEPTÍDEOS ANTIBACTERIANOS ANÁLOGOS A TOXINA DO ESCORPIÃO <i>Tityus sp.</i>	
Lucas Bianchi Nunes Taylla Michelle de Oliveira Flores Patricia Souza e Silva Elizangela de Barros Marlon Henrique Cardoso Octávio Luiz Franco Ludovico Migliolo	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902095</b>	

<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>71</b>
AVALIAÇÃO E SELEÇÃO <i>IN SILICO</i> DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS BIOINSPIRADOS NA L-AMINOÁCIDO OXIDASE DA SERPENTE <i>Bothrops jararacussu</i>	
Odaias Pereira de Almeida Filho	
Breno Emanuel Farias Frihling	
Michel Ângelo Constantino de Oliveira	
Gilberto Astolfi	
Hemerson Pistori	
Ludovico Migliolo	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902096</b>	
<b>CAPÍTULO 7 .....</b>	<b>81</b>
ESTUDO DA NEUTRALIZAÇÃO DOS COMPONENTES DO VENENO DA SERPENTE <i>Bothrops erythromelas</i>	
Ellynes Amancio Correia Nunes	
Renner de Souza Leite	
Álisson Emannuel Franco Alves	
Ludovico Migliolo	
Karla Patrícia de Oliveira Luna	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902097</b>	
<b>CAPÍTULO 8 .....</b>	<b>96</b>
ANÁLISE DO PERFIL PROTEICO POR SDS-PAGE DA SECREÇÃO CUTÂNEA DE <i>Rhinella schneideri</i> , <i>Dermatonotus muelleri</i> , <i>Physalaemus nattereri</i> e <i>Trachycephalus typhonius</i>	
Alexya Sandim Guindo	
Luiz Humberto Guimarães Riquelme Junior	
Luiz Felipe Ramalho Nunes de Moraes	
Ludovico Migliolo	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902098</b>	
<b>CAPÍTULO 9 .....</b>	<b>110</b>
POTENCIAL DE INIBIDORES SERINICOS EM FOLHAS DE <i>Croton urucurana</i> (MALPIGHIALES, EUPHORBIACEAE) PARA O CONTROLE DE <i>Spodoptera frugiperda</i> (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)	
Taylla Michelle de Oliveira Flores	
Liliam Silvia Cândido	
Ludovico Migliolo	
Jannaina Velasques da Costa Pinto	
<b>DOI 10.22533/at.ed.7541902099</b>	
<b>SOBRE OS ORGANIZADORES.....</b>	<b>118</b>

## POTENCIAL DE INIBIDORES SERINICOS EM FOLHAS DE *Croton urucurana* (MALPIGHIALES, EUPHORBIACEAE) PARA O CONTROLE DE *Spodoptera frugiperda* (LEPIDOPTERA, NOCTUIDAE)

### **Taylla Michelle de Oliveira Flores**

Pós-graduação em Biologia Molecular e Celular  
Universidade Federal da Paraíba  
João Pessoa-PB

### **Liliam Silvia Cândido**

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais,  
Universidade Federal da Grande Dourados,  
Dourados-MS

### **Ludovico Migliolo**

*S-Inova Biotech*, Pós-graduação em  
Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco,  
Campo Grande-MS

### **Jannaina Velasques da Costa Pinto**

Centro de Formação em Ciências Agroflorestais,  
Universidade Federal do Sul da Bahia Itabuna-BA.

**RESUMO:** Um dos principais fatores que impedem números mais expressivos de produtividade na cultura do milho é a alta incidência de pragas na lavoura, sobretudo da lagarta-do-cartucho (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera, Noctuidae). Os mecanismos adaptativos dessa praga garantem aquisição de resistência aos compostos químicos após poucas gerações, tornando-a de difícil controle. Nos últimos anos, a prospecção de inibidores de peptidases vem ganhando destaque graças ao seu potencial inseticida, capaz de reduzir a disponibilidade de aminoácidos essenciais ao desenvolvimento das larvas, levando à

morte. Neste trabalho, foi utilizado o extrato proteico de folhas de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) com o objetivo de identificar a presença de inibidores de peptidases e avaliar o seu potencial de uso no controle da *S. frugiperda*. O extrato foi preparado em tampão Tris-HCl 50mM pH 8 e submetido à precipitação proteica com sulfato de amônio na saturação de 30-60%. Ensaio enzimáticos preliminares foram realizados utilizando como substrato Azocaseína (1%) e Tripsina Bovina. Ao constatar atividade antitripticas amostras entre as concentrações de 1,35 a 5,4  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , estas foram submetidas ao ensaio com substrato específico BApNA (1,25mM) em Tripsina Bovina que resultou em atividade inibitória de até 80% para a concentração de 26,95  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Deu-se então prosseguimento ao ensaio com substrato BApNA em homogenato intestinal da lagarta *S. frugiperda*, que apresentou atividade inibitória de 80% quando utilizados 2,7  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  do extrato. Os resultados obtidos determinaram significativo potencial inseticida do extrato proteico das folhas de *C. urucuranae* para a possibilidade de desenvolvimento de um produto biotecnológico destinado ao controle desta lepidóptera. Nesse sentido, novos estudos de bioprospecção desta planta são encorajados.

Palavras chaves: Sangra d'água, proteases, inibidores de proteases, mecanismos de defesa vegetal.

**ABSTRACT:** One of the main factors that prevent more expressive numbers of productivity in the maize crop is the high incidence of pests in the crop, especially of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*, Lepidoptera, Noctuidae). The adaptive mechanisms of this pest guarantee the acquisition of resistance to chemical compounds after a few generations, making it difficult to control. In recent years, the prospection of inhibitors of peptidases has been gaining prominence in relation to the insecticidal potential, capable of reducing the availability of essential amino acids to the development of the larvae, leading to death. In this work, the leaf protein extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) were used in order to detect the presence of inhibitors of peptidases and to evaluate their potential use in the control of *S. frugiperda*. The extracts were prepared in Tris-HCl buffer (50 mM) and submitted to protein precipitation with ammonium sulfate at saturation of 30-60%. Preliminary enzymatic assays were performed using the substrate Azocasein (1%) in Trypsin Bovine. When the antitriptic activity in the sample between the concentrations of 1.35 and 5.4  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  was verified, they were submitted to the BApNA (1.25mM) substrate assay in Trypsin Bovina which resulted in inhibitory activity up to 80% for the concentration of 26.95  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . The assay was then carried out with BApNA substrate in intestinal homogenate of the *S. frugiperda* caterpillar, which showed 80% inhibitory activity when 2.7  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of the extract was used. The results obtained determined a significant insecticidal potential of *C. urucurana* leaf extract and the possibility of developing a biotechnological product destined to the control of this lepidoptera. In this sense, new bioprospecting studies of this plant are encouraged.

**KEYWORDS:** Sangrad'água, proteases, protease inhibitors, plant defense mechanisms.

## 1 | INTRODUÇÃO

A cultura do milho (*Zeamays*, *Poales*, *Poaceae*) é segunda mais importante no Brasil, perdendo apenas para a soja. A colheita anual de grãos chegou a 91,2 toneladas, na safra 2018, ocupando aproximadamente 16 milhões de hectares. Ainda assim, esses números são considerados baixos quando comparados aos de países que priorizam a agricultura de precisão para produção de grãos, a exemplo dos Estados Unidos (CONAB, 2019).

Um dos principais fatores que comprometem a produtividade do milho no Brasil é a grande incidência de insetos pragas na lavoura. Levando-se em conta que o Brasil está inserido numa zona tropical, os fatores climáticos favorecem a colonização, reprodução e adaptação de insetos pragas, que ocorrem de forma mais acelerada comparado a outras zonas do globo (RUBIN, 2009; SANTOS et al., 2004). Dentre as pragas mais incidentes, a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae) (SMITH, 1797), também conhecida como lagarta-do-cartucho, é de difícil controle, podendo levar a uma perda drástica na produção do milho e de outras culturas de grãos (RUBIN, 2009).

O controle de pragas através de defensivos químicos é a técnica mais comumente usada no manejo, no entanto a resistência a diferentes compostos adquirida rapidamente pela *S. frugiperda* tornou-se um grande problema para a produtividade da lavoura. Esta resistência está muitas vezes associada ao manejo inadequado das pulverizações, seja pela dosagem ou pela repetição indiscriminada da prática ao longo do ciclo da lavoura (COSTA et al., 2005; LIMA et al., 2012; WAQUIL, 2007).

A tendência em se prospectar compostos originados do metabolismo primário das plantas, de natureza proteínica, utilizados constitutivamente como mecanismo de defesa natural a campo, vem ganhando espaço no controle à incidência de insetos pragas na lavoura. Um exemplo típico é o uso de inibidores de peptidases serínicas (ADDOR, 1995; MACEDO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013).

Os Inibidores de peptidases (IPs) são compostos proteicos que inibem a atividade de peptidases no intestino das lagartas por meio de bloqueios ao sítio ativo destas enzimas, resultando na redução da disponibilidade de aminoácidos necessários para o crescimento e desenvolvimento da praga, levando-as à morte. Os IPs estão presentes, em sua maioria, nos órgãos de reserva, mas podem também ser encontrados em outros tecidos vegetais e desempenham importante papel na defesa aos ataques de insetos e microrganismos patogênicos em lavouras, podendo ser utilizados como potencial bioinseticida (BAYÉ et al., 2005; DUNSE et al., 2010; TREMACOLDI, 2009; VELASQUES et al., 2017).

A *Croton urucurana* (Malpighiales, Euphorbiaceae), popularmente conhecida como sangra d'água graças ao látex vermelho liberado pelo seu caule, é uma planta comumente encontrada no Cerrado e na Mata Atlântica, e é comumente utilizada entre as populações indígenas tanto para fins medicinais como para propriedades inseticidas (SIMIONATTO et al., 2007).

A literatura especializada também apresenta estudos relacionando o potencial de uso da *C. urucurana* no controle de pragas agrícolas, como as larva de *Anagasta kuehniella* que atacam lavouras de algodão (SILVA et al., 2009). No entanto, não são encontrados dados relacionados aos compostos de origem proteica em extratos da sangra d'água. Diante disso, neste trabalho foram aplicados métodos de prospecção de moléculas proteicas em *C. urucurana* com intuito de identificar a presença de inibidores de peptidase e sua aplicabilidade no controle de lepidóptera, principalmente em modelos agrícolas.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Coleta de Material

Folhas de *Croton urucurana* foram coletadas no Parque das Nações Indígenas, localizado na cidade de Campo Grande – Mato Grosso do Sul (20.4555° S, 54.5797°

W). As folhas foram transportadas até o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular S-Inova Biotech da Universidade Católica Dom Bosco – UCDB. As folhas foram lavadas, secas e colocadas em estufa de circulação fechada, a 36,5° C por quatro dias. Após a secagem das folhas, foi realizada a remoção da nervura central, e o limbo foliar foi moído em moinho de facas para obtenção do material totalmente pulverizado.

## 2.2 Obtenção da Fração 30-60% do Extrato Foliar

Foram homogeneizados 100g de folhas de *Croton urucuran* pulverizadas com adição de 2000 mL de solução tampão de extração Tris-HCl 50 mM pH 8,0 (proporção de 1:20 p:v) sob agitação magnética *overnight*. As amostras foram filtradas e, em seguida, centrifugadas a 10000 rpm por 30 min à 4°C. O pellet foi descartado e o sobrenadante foi posteriormente liofilizado.

O extrato obtido do tampão Tris-HCl foi submetido à precipitação por Sulfato de Amônio segundo metodologia descrita por BURGESS(2009) empregando a faixa de saturação inicial-final de 30-60% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, utilizada nos bioensaios.

## 2.3 Determinação de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais dos extratos foi estimada pelo método descrito por BRADFORD(1976), utilizando a curva de BSA (albumina sérica bovina) como padrão. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (BioDrop) a 595 nm.

## 2.4 Homogenato do Trato Digestivo do Inseto

Larvas de *S. frugiperda* de 5° instar, obtidas no Laboratório de Controle de Pragas da Universidade Católica Dom Bosco, foram dissecadas com auxílio de lupa e pinça, os tratos intestinais selecionados foram transferidos para microtubos contendo 200µL de tampão Tris-HCl 50 mM pH 7,5 e mantidos a ± 0,2°C. O homogenato intestinal foi preparado de acordo com a metodologia estabelecida por TERRA e colaboradores (1977), seguindo algumas modificações feitas por AMORIM(2007). O sobrenadante foi coletado e quantificado pelo método de BRADFORD(1976) em espectrofotômetro (BioDrop) à 595 nm, diluído a 1 µg.µL<sup>-1</sup> e a leitura padronizada para cerca de 0,100 de absorbância.

## 2.5 Ensaio Enzimático

As atividades inibitórias proteolíticas foram conduzidas por meio de ensaio enzimático com tripsina bovina utilizando solução de Azocaseína a 1% e BA<sub>p</sub>NA

1,25mM como substratos.

**Atividade inibitória realizada com substrato não específico Azocaseína a 1%:** Os testes foram realizados de acordo com a metodologia descrita por IVERSEN & JORGENSEN(1995), utilizando diferentes concentrações da amostra (0,084; 0,337; 0,674; 1,350; 2,700; 5,400; 13,500 e 26,950  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A absorbância foi medida a 440 nm.

**Atividade inibitória realizada com substrato BApNA ( $\beta$ -N-benzoil-arginina-p-nitroanilida):** Para a detecção da atividade inibitória, diferentes concentrações da amostra (0,084; 0,168; 0,337; 0,674; 1,350; 2,700; 5,400; 13,500; 26,950  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) foram incubadas com a tripsina e o tampão TrisHCl 50 mM pH 7,5, completando o volume de 500  $\mu\text{L}$ , durante 10 min a 37 °C. Decorrido o tempo, adicionou-se o substrato BAPNA 1,25 mM (benzoil-arginina-paranitroanilida, Sigma), prosseguindo-se a incubação durante 15 min a 37 °C. A reação foi paralisada pela adição de ácido acético 30% (v:v) e a hidrólise do substrato pela enzima foi monitorada fotometricamente à 410 nm (Multiskan Go – Thermo Scientific).

Outros testes de atividades inibitórias proteolíticas foram conduzidos por meio de ensaio enzimático com a amostra nas concentrações de 0,084; 0,168; 0,337; 0,674; 1,350; 2,700  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , utilizando o homogenato intestinal de *S. frugiperda* como enzima de clivagem e substrato específico BApNA (1,25 mM). Todos os ensaios foram realizados em triplicatas e, nos ensaios em branco, o substrato foi adicionado após a reação ter sido parada com adição de ácido acético na concentração final. O cálculo da atividade inibitória foi gerado a partir da determinação da atividade residual da tripsina no ensaio (ERLANGER; KOKOWSKY; COHEN, 1961).

## 2.6 Análise Estatística

A ANOVA foi realizada pelo software SPSS ,com os dados dos ensaios de inibição, utilizando delineamento inteiramente casualizado, seguido dos testes de media Waller-Duncan<sup>a,b</sup> a 5%.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÕES

A extração de proteínas das áreas foliares tem alguns fatores complicadores, devido aos aspectos quantitativos destas biomoléculas nesse tecido vegetal. A fitomassa verde chega a 5% nas folhas, enquanto que nos tecidos de reserva (tubérculos, sementes,etc,) esse valor pode representar até 40% da massa (FERRI, 2006; PIRIE, 1978).

Métodos alternativos, como o isolamento de proteínas por precipitações com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , têm se mostrado mais eficazes, proporcionando resultados mais significativos em relação à concentração de proteínas totais, e principalmente para

os inibidores de peptidases (BHATTACHARYYA; BABU, 2009; GOMES et al., 2005; PANDO et al., 2001). De acordo com a quantificação do extrato de *C. urucurana* precipitado em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na fração de 30-60%, realizada por Bradford, observou-se uma concentração proteica de  $540 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

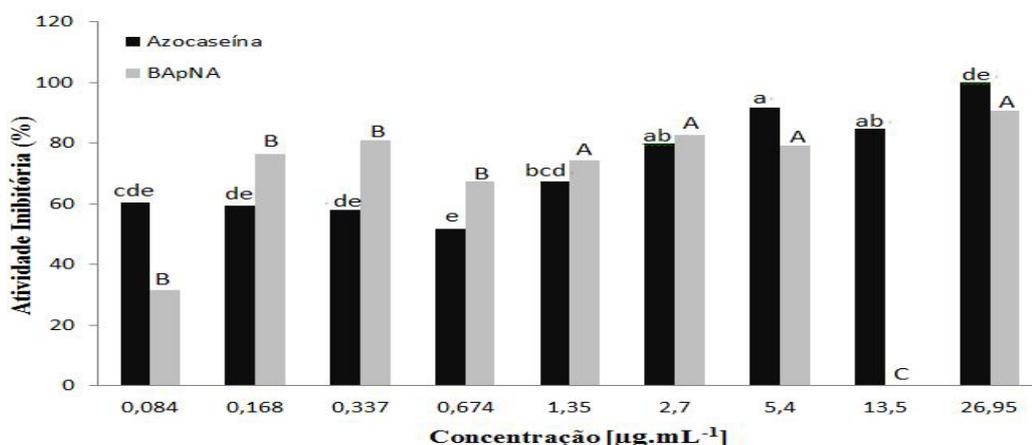


Figura 1: Porcentagem da atividade inibitória contra enzima tripsina ( $0,15 \text{ mg}.\text{mL}^{-1}$ ) utilizando os substratos azocaseína (1%) e BApNA (1,25 mM) em nove concentrações diferentes da fração 30-60 em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  do extrato bruto das folhas de *C. urucurana* em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. Letras maiúsculas distintas diferem as concentrações entre si, dentro de seus substratos, em substrato BApNA (1,25mM), pelo teste Waller-Ducana 5%. Letras minúsculas distintas diferem as concentrações entre si, em substrato azocaseína (1%), pelo teste Waller-Duncan a 5%.

Para confirmar a presença de inibidores de peptidases no extrato de *C. urucurana* precipitado em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  na fração de 30-60% foram realizados os ensaios preliminares da atividade antitriptica utilizando o substrato Azocaseína (1%). De acordo com BURGESS (2009), no precipitado 30-60% são esperadas as maiores concentrações de inibidores de peptidases, sobretudo da família Kunitz. A azocaseína é um substrato não específico e muito usado preliminarmente nos experimentos para avaliar a atividade enzimática dos inibidores mesmo quando não se tem a proteína purificada (IVERSEN; JORGENSEN, 1995).

No ensaio de inibição foram testadas as concentrações de  $0,084$ ;  $0,337$ ;  $0,674$ ;  $1,35$ ;  $2,7$ ;  $5,4$ ;  $13,5$ ;  $26,95 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  (Figura 1). As maiores médias de inibição em contato com o precipitado ocorreram entre as concentrações de  $1,35$  a  $5,4 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , estatisticamente não sendo observada diferença significativa entre elas. ARAÚJO e colaboradores (2014) apresentaram resultados para a mesma fração (30-60%), utilizando extratos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) a qual inibiu 100% da atividade da enzima quando utilizado uma concentração aproximada de  $15 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ . Essa atividade superior à encontrada para a *C. urucurana* pode estar relacionada ao fato de o amendoim pertencer à família Fabaceae, reconhecida pela presença de inibidores de natureza tanto constitutiva como induzida por mecanismos de defesa.

Em função dos resultados obtidos com azocaseína (1%), foram realizados os

testes de atividade inibitória utilizando substrato específico BApNA (1,25 mM) com a amostra nas mesmas concentrações, e os dados obtidos foram comparados.

Para o substrato BApNA (Figura 1) pode-se observar que entre as concentrações de 1,35, 2,7, 5,4 e 26,95  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  não ocorreu diferença estatística significativa, obtendo um média de atividade antitriptica de praticamente 80%. Podendo-se notar estabilização da atividade, independente das concentrações adicionadas. As concentrações 0,084, 0,168, 0,337, 0,674  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  demonstraram atividade inibitória mediana, variando de 50 a 70%.

Os IPs são onipresentes em tubérculos e sementes leguminosas, mas também podem ser encontrados em diferentes tecidos de vários grupos sistemáticos de plantas. VANDERJAGT et al. (2000) apresentaram resultados com as folhas de *Entada africana*, *Senna obtusifolia* e *Sesbania pachycarpa*, nos quais foram detectados uma grande concentração de inibidores de tripsina.

Embora seu papel fisiológico não tenha sido completamente elucidado, há evidência de que as plantas acumulam IPs como proteínas de armazenamentos, em função da sinalização exógena, em situação de estresse nutricional ou lesão mecânica. Por outro lado, os IPs também podem contribuir para a defesa da planta contra a herbivoria, inibindo a atividade da protease no organismo. (SOUZA et al., 2017; VELASQUES et al., 2017).

Dentre os compostos mais bioprospectados, os inibidores de peptidase têm sido amplamente reportados como possíveis agentes inseticidas. Esses fatores vêm ocasionando a morte dos insetos em todos os estágios fenológicos da planta, assim como alteração na morfologia da praga e efeito repelente. Alguns extratos de plantas são capazes de interferir no desenvolvimento larval até a fase adulta (KAMIABI; JAAL; KENG, 2013).

A *S. frugiperda* é uma das maiores pragas da ordem Lepidoptera. Essa espécie se alimenta de uma vasta gama de culturas, sendo considerado um inseto polífono, resultando em perdas severas de rendimentos. De acordo com TERRA & FERREIRA (1994) em quase todas as espécies identificadas da ordem Lepidoptera, foi constatada a presença em grandes quantidades de serino endopeptidases no intestino médio desses insetos.

Nos testes realizados com o homogenato intestinal da *S. frugiperda* utilizando substrato BApNA (1,25 mM) (Figura 2), foi verificado diferença estatística significativa de atividade para as diferentes concentrações do precipitado. Com 2,7  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  obteve-se a melhor média de inibição das peptidases presentes no homogenato intestinal, aproximadamente 80%, e conforme a concentração de extrato diminuía, menor era a média de inibição observada, chegando a aproximadamente 45% de atividade inibitória em 0,084  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ .

A partir disso observa-se que mesmo em baixíssimas concentrações da amostra, ocorria atividade inibitória eficiente, tendo em vista que a média de atividade inibitória considerada ideal para o controle de Lepidópteras é entre 50 a 80%, pois quando

as lagartas são expostas aos inibidores com taxa alta de atividade, seu organismo sofre grande pressão, podendo induzir a polimorfismos ou mutações genéticas, desencadeando resistência pela praga ao inibidor e um curto período de tempo (SOUZA et al., 2016).

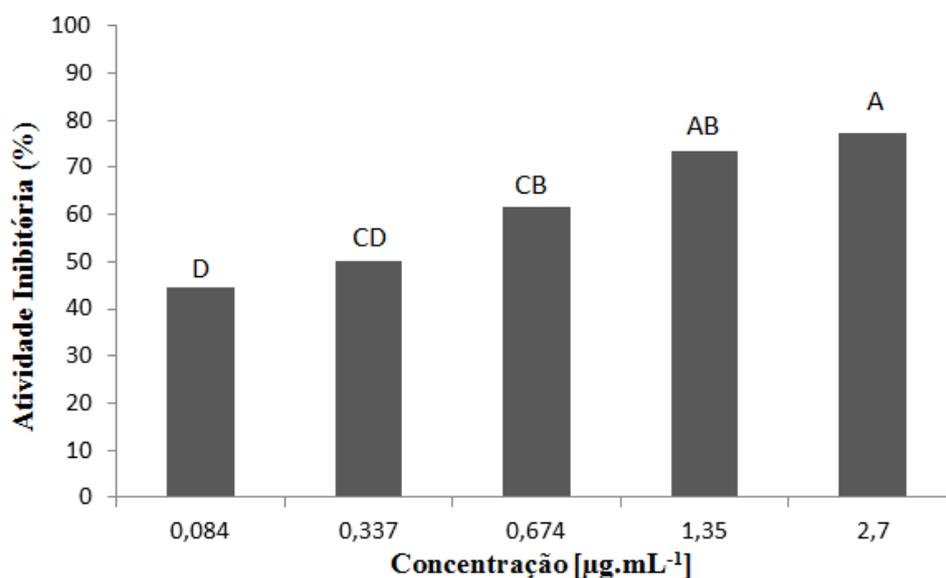


Figura 2: Porcentagem da atividade inibitória contra o homogenato intestinal de *S. frugiperda* utilizando o substrato BApNA (1,25 mM) em cinco concentrações diferentes da amostra fracionada em  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  do extrato bruto das folhas de *C. urucurana* em tampão Tris-HCl 50 mM pH 8. Letras maiúsculas distintas diferem as concentrações entre si pelo teste Waller-Ducana 5%.

A eficiência no controle de insetos pragas ocorre à capacidade de alguns inibidores de peptidases de interferir na ação das peptidases presentes no sistema digestivo dos insetos, através de ligações competitivas com a peptidase digestiva impedindo que ocorra a ligação substrato-peptidase, resultando na deficiência de aminoácidos e, conseqüentemente, prejudicando o crescimento, desenvolvimento, fecundidade e sobrevivência dos insetos (AZZOUZ et al., 2005; OPPERT et al., 2003; VELASQUES et al., 2017).

Diante disso há uma busca incessante por alternativas ao uso de compostos sintéticos e da crescente bioprospecção de extratos vegetais ricos em proteínas em busca de novas moléculas bioativas e eficazes no combate às pragas (KIM et al., 2010). Devido à sua natureza constitutiva, o papel dos inibidores pode ser ativado por um único gene, diante disso vários estudos sobre a expressão de IPs em plantas transgênicas vem sendo realizados em um esforço para aumentar a resistência das culturas contra esses insetos-pragas que desolam as plantações (MAHESWARAN et al., 2007; MEDEIROS et al., 2016; VELASQUES et al., 2017).

## 4 | CONCLUSÃO

Dessa forma podemos observar que os estudos realizados com o extrato foliar obtido da *C. urucurana* demonstrou ser uma fonte rica de inibidores de peptidases serínicas, por meio dos ensaios enzimáticos específicos realizados. Os resultados mostraram efeito inibitório significativo sobre a peptidase Tripsina Bovina, em torno de 80% de inibição de sua atividade. Quando testado com o homogenato intestinal da *S. frugiperda*, a atividade inibitória se manteve dentro da faixa de inibição considerada para a prospecção a campo (50% - 80%). Contudo são necessários mais estudos com o intuito de comprovar a atividade inseticida tanto *in vivo* como *in situ*.

## REFERÊNCIAS

- ADDOR, R. W. **Insecticides**. New York: Agrochemicals from natural products, 1995.
- AMORIM, T. M. L. DE. **Avaliação da ação bioinseticida de SBTI e vicilina de Erythrina velutina em enzimas digestivas e membrana peritrófica de larvas de Plodia interpunctella** (Lepidoptera: Pyralidae). 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- ARAÚJO, J. M. DE et al. **Determination Of Antitryptic Activity In Proteins From Peanut Products Isolated By Affinity Chromatography**. Química Nova, v. 37, n. 10, p. 1618–1623, 2014.
- AZZOUZ, H. et al. **Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman-Birk inhibitor, on the aphid Macrosiphum euphorbiae (Homoptera, Aphididae) and its parasitoid Aphelinus abdominalis** (Hymenoptera, Aphelinidae). Journal of Insect Physiology, v. 51, n. 1, p. 75–86, 1 jan. 2005.
- BAYÉ, A. et al. **Structural basis of the resistance of an insect carboxypeptidase to plant protease inhibitors**. PNAS, v. 102, n. 46, 2005.
- BHATTACHARYYA, A.; BABU, C. R. **Purification and biochemical characterization of a serine proteinase inhibitor from Derris trifoliata Lour. seeds: Insight into structural and antimalarial features**. Phytochemistry, v. 70, n. 6, p. 703–712, 1 abr. 2009.
- 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, 7 maio 1976.
- BURGESS, R. R. **Protein Precipitation Techniques**. Methods in Enzymology, v. 463, p. 331–342, 1 jan. 2009.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Sagra Brasileira - Grãos**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>.
- COSTA, M. A. G. et al. **Eficácia de diferentes inseticidas e de volumes de calda no controle de Spodoptera frugiperda nas culturas do milho e sorgo cultivados em várzea**. Ciência Rural, v. 35, n. 6, p. 1234–1242, dez. 2005.
- DUNSE, K. M. et al. **Molecular basis for the resistance of an insect chymotrypsin to a potato type II proteinase inhibitor**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 107, n. 34, p. 15016–21, 2010.

- 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.
- FERRI, P. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DE FOLHA DE MANDIOCA (Manihot esculenta Crantz) PARA OBTENÇÃO DE CONCENTRADO PROTÉICO.** [s.l.] Universidade Estadual do Oeste do Parana, 2006.
- GOMES, C. E. M. et al. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly).** Plant Physiology and Biochemistry, v. 43, n. 12, p. 1095–1102, 2005.
- IVERSEN, S. L.; JORGENSEN, M. H. Azocasein assay for alkaline protease in complex fermentation broth.** Biotechnology Techniques, v. 9, n. 8, p. 573–576, 1995.
- KAMIABI, F.; JAAL, Z.; KENG, C. L. Bioefficacy of crude extract of *Cyperus aromaticus* (Family: Cyperaceae) cultured cells, against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes.** Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, v. 3, n. 10, p. 767–775, 2013.
- KIM, S.I. et al. Toxicity and repellency of origanum essential oil and its components against *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) adults.** Journal of Asia-Pacific Entomology, v. 13, n. 4, p. 369–373, 2010.
- LIMA, I. DOS S. et al. Infestação de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) e seus inimigos naturais em milho nas condições de sequeiro e irrigado.** Dourados-MS: Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), 2012. v. 5
- MACEDO, M. L. R. et al. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 158, n. 2, p. 164–172, 2011.
- MAHESWARAN, G. et al. A proteinase inhibitor from *Nicotiana glauca* inhibits the normal development of light-brown apple moth, *Epiphyas postvittana* in transgenic apple plants.** Plant Cell Reports, v. 26, n. 6, p. 773–782, 14 maio 2007.
- MEDEIROS, A. et al. Sugarcane Serine Peptidase Inhibitors, Serine Peptidases, and Clp Protease System Subunits Associated with Sugarcane Borer (*Diatraea saccharalis*) Herbivory and Wounding.** International Journal of Molecular Sciences, v. 17, n. 9, p. 1444, 2016.
- OLIVEIRA, C. F. R. DE et al. Insensitive trypsins are differentially transcribed during *Spodoptera frugiperda* adaptation against plant protease inhibitors.** Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, v. 165, n. 1, p. 19–25, 2013.
- OPPERT, B. et al. Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinases and growth of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae).** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 134, n. 4, p. 481–490, 2003.
- PANDO, S. C. et al. Primary sequence determination of a Kunitz inhibitor isolated from *Delonix regia* seeds.** Phytochemistry, v. 57, n. 5, p. 625–631, 1 jul. 2001.
- PIRIE, N. W. Leaf protein and other aspects of fodder fractionation.** Cambridge-UK: Cambridge University Press., 1978.
- RUBIN, L. A. Manejo Da Lagarta-Do-Cartucho, *Spodoptera Frugiperda* (Lepidoptera, Noctuidae), Na Cultura Do Milho.** Santa Maria - RS: Universidade Federal de Santa Maria, 2009.
- SANTOS, L. M. DOS et al. Fertilidade e longevidade de *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith)**

**(Lepidoptera: Noctuidae) em genótipos de milho.** *Ciência Rural*, v. 34, n. 2, p. 345–350, abr. 2004.

SILVA, L. B. et al. **Effects of croton urucurana extracts and crude resin on *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae).** *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 52, n. 3, p. 653–664, jun. 2009.

SIMIONATTO, E. et al. **Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark.** *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 5, p. 879–885, 2007.

SMITH, J. E. **The natural history of the rarer lepidopterous insects of Georgia.** London : Printed by T. Bensley, for J. Edwards [etc.], 1797.

SOUZA, T. P. et al. **Comparative analysis of expression profiling of the trypsin and chymotrypsin genes from Lepidoptera species with different levels of sensitivity to soybean peptidase inhibitors.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, v. 196–197, p. 67–73, 2016.

SOUZA, T. P. et al. **Defense-related proteins involved in sugarcane responses to biotic stress.** *Genetics and Molecular Biology*, v. 40, n. 1 suppl 1, p. 360–372, 2017.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 109, n. 1, p. 1–62, 1994.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C.; DE BIANCHI, A. G. **Action pattern, kinetical properties and electrophoretical studies of an alpha-amylase present in midgut homogenates from *rhynchosciara americana* (diptera) larvae.** *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 56, n. 2, p. 201–209, 1 1977.

TREMACOLDI, C. R. **Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas.** *Embrapa Amazonia Oriental*, P. 44, 2009.

VANDERJAGT, D. J. et al. **The trypsin inhibitor content of 61 wild edible plant foods of Niger.** *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 55, n. 4, p. 335–346, 2000.

VELASQUES, J. et al. **The rescue of botanical insecticides: A bioinspiration for new niches and needs.** *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 143, p. 14–25, 2017.

WAQUIL, J. C. MANEJO FITOSSANITÁRIO E AMBIENTAL: MILHO TRANSGÊNICO Bt E RESISTÊNCIA DAS PLANTAS AO ATAQUE DA LAGARTA-DO-CARTUCHO. Disponível em: <[http://www.infobibos.com/Artigos/2007\\_1/ManFito/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/ManFito/Index.htm)>, p. 117–131, 2007.

## **SOBRE OS ORGANIZADORES**

**REGINA MENESES GONÇALVES** é graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Católica Dom Bosco (2017) e mestranda em Biotecnologia pelo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia da Universidade Católica Dom Bosco. Atualmente, seu foco de pesquisa é avaliação de peptídeos antimicrobianos frente a bactérias patogênicas humanas e animais, com intuito do desenvolvimento de novas terapias.

**BRENO EMANUEL FARIAS FRIHLING** - Graduado em Ciências Biológicas, Mestre em Biotecnologia e Doutorando em Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco, tem experiência na área de manejo de animais de laboratório convencionais (ratos e camundongos) e não-convencionais (serpentes), manejo de animais silvestres, captura e manejo de pequenos mamíferos, educação ambiental e técnicas clássicas de purificação. Atualmente trabalha com caracterização bioquímica e bioprospecção de moléculas bioativas presentes nas toxinas de serpentes da região do estado de Mato Grosso do Sul. Além disso, participa de projetos com ênfase na análise de águas com a identificação de fármacos presentes em amostras naturais, rurais e urbanas.

**LUDOVICO MIGLIOLO** é graduado em Ciências Biológicas (Bacharelado E Licenciatura) pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2005 e 2006). Mestre em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (2008) e Doutor em Ciências Genômicas e Biotecnologia pela Universidade Católica de Brasília (2012), com período sanduíche em *The University of Queensland* (Austrália). Atuou como pós doutor bolsista PNPD CAPES na área de Biotecnologia durante 2 anos na Universidade Católica de Brasília, na bioprospecção e síntese de peptídeos bioativos para o desenvolvimento de novas terapias. Atualmente é professor de graduação e pós graduação além de ser pesquisador nível 2 na área de Biotecnologia pela Universidade Católica Dom Bosco, Mato Grosso do Sul. Tem experiência na área de Bioquímica, Biofísica e Bioinformática com ênfase em Purificação de Proteínas e Peptídeos Naturais e Sintéticos, Modelagem Molecular de Estruturas Proteicas e Peptídeos, Estudos de Interação Proteína-Proteína, Peptídeo-Proteína, Peptídeo-DNA, Peptídeo-Membranas Biológicas, Estudos com Dicroísmo Circular e Espectrometria de Massa. Além disso, atua na área de desenho racional de peptídeos bioativos análogos de toxinas de serpente, escorpião, anuros, aranhas e insetos. Aplicação destas metodologias nos seguintes temas: defesa de plantas, peptídeos antimicrobianos, imunomoduladores, anticongelantes e análises proteômicas animais, vegetais e de microrganismos.

Agência Brasileira do ISBN  
ISBN 978-85-7247-575-4

