

INIBIÇÃO DA TRIPSINA DE BICHO-MINEIRO DO CAFEIEIRO POR UM FATOR NÃO-PROTÉICO PRESENTE EM EXTRATOS DE FOLHAS DE MAMONA

Coffee leaf miner trypsin inhibition with castor bean leaf extracts mediated by a non-protein agent

Guilherme Duarte Rossi¹, Custódio Donizete dos Santos², Maria das Graças Cardoso²,
Angelita Duarte Corrêa², Celeste Maria Patto de Abreu², Luciano Vilela Paiva²

RESUMO

Inibidores de tripsina representam uma estratégia de controle de insetos e, por isso, a identificação e caracterização desses inibidores são etapas muito importantes para que novas formas de controle de pragas sejam desenvolvidas. Os inibidores de tripsina atuam na digestão primária de proteínas e comprometem o processo digestivo por completo, reduzindo a disponibilidade de aminoácidos ao inseto. A incorporação de inibidores de tripsina na dieta de insetos-praga é uma forma de controle cuja eficácia foi verificada por diferentes autores. Este projeto foi conduzido a fim de se observar a eficiência de extratos de folhas de mamona na inibição “in vitro” de proteinases do tipo tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro. Após testes realizados com os extratos de folhas de mamona não-fervidos e fervidos com e sem a adição de β -mercaptoetanol 0,2% (v/v) e mediante precipitações com acetona, verificou-se que o inibidor é uma molécula termoresistente e não-protéica. Desta forma, iniciou-se um processo de purificação da molécula inibidora por meio de cromatografia de adsorção com posterior análise em espectrômetro de massas. Os resultados dos testes de inibição indicaram a presença de um inibidor de tripsina eficaz contra o bicho-mineiro do cafeeiro nos extratos de folhas de mamona capaz de inibir $2,48 \pm 0,15$ UTI, o que representa aproximadamente 40% de inibição. Em testes realizados com tripsina bovina observou-se que o extrato de folhas de mamona não apresenta poder de inibição sobre essa enzima.

Termos para indexação: Bicho-mineiro do cafeeiro, inibição de tripsina, mamona.

ABSTRACT

Trypsin inhibitors stand for a strategy of insect control and, therefore, the identification and characterization of these inhibitors are very important steps for new forms of pest control to be developed. Trypsin inhibitors act in the primary digestion of proteins and endanger the digestive process wholly, reducing the availability of aminoacids to the insect. The incorporation of trypsin inhibitors in the diet of pest insects is a control form whose efficacy was verified by different authors. In order to observe the efficiency of castor bean leaf extracts in inhibiting trypsin-like enzymes of the coffee leaf miner, an experiment was carried out with the purpose of observing an “in vitro” inhibition phenomenon. The results of the trypsin inhibition tests with normal and boiled with and without β -mercaptoethanol 0.2% (v/v) castor bean leaf extracts and the results of the acetone precipitation process indicated that the inhibitor is a heat-resistant molecule and it is not a protein. This way, the purification process was made by adsorption chromatography with later analysis in mass spectrometer. The reached results indicated that the presence of a trypsin inhibitor of the coffee leaf miner in the castor bean leaf extracts is capable of inhibiting 2.48 ± 0.15 UTI, which stands for about 40% of inhibition. Tests performed with bovine trypsin indicated that the castor bean leaf extract have no inhibiting power on this enzyme.

Index terms: Coffee leaf miner, trypsin inhibition, castor bean.

(Recebido em 24 de julho de 2007 e aprovado em 11 de julho de 2008)

INTRODUÇÃO

A presença de metabólitos secundários com a função de defesa em plantas é um fato muito conhecido na natureza (DUKE, 2007; HAMMERSCHMIDT, 1999). Dessa forma, é interessante detectar, isolar e caracterizar essas

moléculas de defesa presentes naturalmente nas plantas e utilizá-las no controle de pragas ou doenças que afetam a produção agrícola. Apesar de diversas moléculas oriundas de plantas terem sido caracterizadas, o modo de ação de poucas é conhecido (LEHANE & BILLINGSLEY, 1996).

¹Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/ESALQ – Universidade de São Paulo/USP – Departamento de Entomologia, Fitopatologia e Zoologia Agrícola/LEF – Avenida Pádua Dias, 11 – Cx. P. 9 – 13418-900 – Piracicaba, SP – gdrossi2@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Lavras/UFLA – Departamento de Química /DQI – Lavras, MG

Uma classe muito conhecida de compostos secundários presentes em plantas são os inibidores de tripsina, uma serinoprotease relacionada com a digestão primária de proteínas. Esses inibidores apresentam a propriedade de inibir enzimas relacionadas com a digestão protéica e impedem que o organismo que os ingere tenha seu desenvolvimento adequado, podendo até mesmo interromper o ciclo de vida da espécie em questão (LEE et al., 1999; MCMANUS et al., 1999; XU et al., 1996).

Existem diversos tipos de inibidores de tripsina de natureza protéica e esses são classificados de acordo com suas características em pelo menos 7 famílias (LEHANE & BILLINGSLEY, 1996). Mas existem também inibidores de tripsina de natureza não-protéica, como o 4-(2-aminoetil) benzenosulfonil fluoreto hidrocloreto (MEGYERY et al., 2006) e o fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF).

Objetivou-se com este trabalho analisar a atividade de um inibidor de tripsina de bicho-mineiro do cafeeiro presente em extratos de folhas de mamona, verificar sua ação sobre a tripsina bovina e iniciar um processo de purificação desse inibidor de tripsina.

MATERIALE MÉTODOS

Preparo dos extratos de folhas de mamona (*Ricinus communis*)

Para o preparo do extrato com inibidor, utilizaram-se folhas de mamona de um espécime de ocorrência espontânea no *Campus* da UFLA denominado mamoninha de caule vermelho. Em testes nos quais se utilizaram outras cultivares, verificou-se que a mamoninha de caule vermelho foi a única a apresentar inibição para a tripsina dos lepidópteros testados (bicho-mineiro do cafeeiro e *Spodoptera frugiperda*) e não inibir a tripsina bovina.

Foram coletadas folhas jovens de tamanho e aspectos visuais padronizados, evitando-se folhas que apresentassem sinais de lesões por pragas, doenças ou qualquer outro tipo de injúria. Após serem destacadas da planta, as folhas foram colocadas em uma caixa de isopor a 4°C e transportadas até o laboratório, onde retiraram-se os pecíolos e nervuras principais, cortando-as em pedaços de aproximadamente 1 cm². Em seguida, maceraram-se as folhas cortadas utilizando-se um almofariz e um pistilo resfriados a 4°C.

Após obter uma massa homogênea, adicionou-se o meio de extração (água) resfriado a 4°C, numa proporção definida em 1:3 (peso de folhas/volume de meio de extração) e colocou-se para extração do inibidor em um agitador orbital a 4°C sob agitação a 150 rpm por 30 min. Decorrido esse tempo, a amostra foi centrifugada a 10.000 x g por 10

min e a 4°C. Após a centrifugação, descartou-se o sedimento e armazenou-se o sobrenadante a -20°C, que foi utilizado posteriormente nos ensaios de inibição.

Coleta e retirada das lagartas das minas

As lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro foram coletadas a partir de folhas infestadas de um cafezal e de uma casa-de-vegetação no *Campus* da Universidade Federal de Lavras-MG (UFLA). As folhas foram acondicionadas em sacos de papel e transportadas até o laboratório, onde foram retiradas das minas com o auxílio de um estilete e uma pinça. Depois de retiradas das minas, cada conjunto de 12 lagartas foi colocado em Eppendorf, pesado e armazenado a -20°C, até sua utilização nos ensaios enzimáticos.

Extração enzimática

Em razão do tamanho diminuto das lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro, a retirada do intestino médio não foi realizada, homogeneizando, desta forma, a lagarta inteira. Cada conjunto de 12 lagartas foi previamente macerado no próprio Eppendorf com o auxílio de um bastão de vidro com a ponta torneada, juntamente com 0,1 mL de água destilada a 4°C. Após essa pré-maceração, transferiu-se a solução para um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem, onde se realizou a homogeneização em um volume de solução igual a 1 mL.

Após homogeneização final, filtrou-se a solução obtida em uma tela de nylon com poros de 100 µm de diâmetro e completou-se o volume final para 1 mL. Esse homogeneizado foi utilizado na determinação das atividades enzimáticas. Cada conjunto de 12 lagartas constituiu um ensaio. A determinação das atividades enzimáticas foi feita em triplicata.

Ensaio de inibição da atividade da tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro

A atividade do inibidor de tripsina foi determinada pela comparação entre um ensaio cinético (com pelo menos 4 períodos de tempo) da atividade de tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro na presença e ausência do extrato de folhas de mamona que continha o inibidor. Utilizou-se o substrato BApNA na concentração de 0,87mM, preparado em tampão glicina-NaOH 0,1 M no pH ótimo da tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro (9,7) (Rossi et al., 2009) e quantificou-se a atividade por meio da metodologia proposta por Erlanger et al. (1961). Ensaios-controle, como o branco de substrato (atividade na ausência de enzima e inibidor), branco de enzima (atividade na ausência de substrato e inibidor), branco de inibidor (atividade na ausência de substrato e enzima) e a atividade de tripsina

no extrato de mamona foram realizados da mesma maneira que os tubos experimentais. Os resultados foram expressos em unidades de tripsina inibida (UTI), que consiste no desaparecimento da absorção de luz correspondente a 1 mmol de p-nitroanilina (produto formado durante a atividade da tripsina sobre o substrato BapNA) durante 1 min de reação, em 1 g de folhas frescas de mamona.

Estabilidade do inibidor presente no extrato de folhas de mamona

A fim de se verificar a desnaturação do inibidor de tripsina presente nas folhas de mamona, foram realizados ensaios da tripsina de bicho-mineiro na presença de um extrato de folhas de mamona fervido durante cinco minutos, para verificar sua estabilidade quando submetido ao calor.

Como os inibidores de tripsina protéicos podem ser termorresistentes, outro tratamento foi realizado no extrato de folhas de mamona. Esse tratamento consistiu em adicionar b-mercaptoetanol 0,2% e posterior fervura por 5 min.

Inibição da atividade da tripsina bovina

Testes com tripsina bovina (4 mg/200mL HCl 0,001 N) do fabricante MERCK foram realizados da mesma forma que o ensaio descrito para inibição de tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro, mas em tampão TRIS/HCl 0,1 M pH=7,0.

Extração de enzimas digestivas de *Spodoptera frugiperda*

Como as lagartas do bicho-mineiro do cafeeiro eram de difícil obtenção, utilizaram-se enzimas provenientes de lagartas de *S. frugiperda* para se testar a ação inibitória do extrato de folhas de mamona sobre sua tripsina durante os processos de purificação.

As lagartas foram coletadas em campo e colocadas sob gelo picado até ficarem imóveis (aproximadamente 10 min). Cortaram-se a cabeça e o ânus de cada lagarta e, com o auxílio de pinças, estiletes e tesouras, retiraram-se seus tegumentos, deixando apenas seus intestinos. Separou-se o intestino médio, descartando-se os intestinos anterior e posterior.

O intestino médio foi macerado em homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem na proporção de 1 intestino médio de *S. frugiperda* para 4 mL de água a 4°C. Após maceração, filtrou-se o homogeneizado em tela de nylon de 100 mm. Essa solução constituiu o extrato enzimático de *S. frugiperda*, utilizado como fonte de

tripsina nos ensaios de purificação que exigiam grandes quantidades de enzima.

Precipitação das proteínas do extrato de folhas de mamona com acetona

Para realizar a precipitação com acetona, adicionou-se acetona a -20°C nas proporções de 10, 20, 30, 40, 50, 60 70 e 80% (v/v) ao extrato de folhas de mamona. Após 12 horas (overnight) a -20°C centrifugaram-se as soluções de extrato de mamona mais acetona a 10.000 x g, por 10 min a 4°C. O sedimento foi ressuspenso no mesmo volume do extrato de folhas de mamona inicialmente colocado e o sobrenadante foi evaporado em banho-maria a 37°C e ressuspenso em água no volume inicial de extrato de folhas de mamona. A atividade da tripsina inibida (UTI) foi determinada no sobrenadante e no sedimento de cada precipitação com acetona.

Preparo das amostras para cromatografia de adsorção

As folhas de mamona foram congeladas e liofilizadas em liofilizador (Labconco Freeze Dry System/Freezone 4,5) até massa constante.

Após a liofilização, as folhas foram moídas utilizando almofariz e pistilo. O pó de folhas de mamona obtido após maceração foi armazenado em recipiente de vidro hermeticamente fechado e protegido da luz sob temperatura ambiente até as análises. O processo de liofilização indicou uma umidade média aproximada de 70% nas folhas de mamona.

A amostra aplicada na coluna foi preparada adicionando-se 5 mL de metanol P.A. a 1 g de folhas de mamona liofilizadas, deixando a extração do inibidor ocorrer por 30 min em um agitador orbital a 150 rpm. Filtrou-se essa solução em papel de filtro e aplicou-se 1 mL do extrato metanólico de folhas de mamona no topo da coluna.

Cromatografia de adsorção

Utilizou-se uma coluna de vidro de 50 cm de comprimento e 2,5 cm de diâmetro. A sílica utilizada foi Kieselgel 60 (0,040 – 0,063 mm; 230-400 mesh) do fabricante Merck.

A coluna foi preenchida com uma mistura pastosa composta por sílica e clorofórmio P.A. Essa “pasta” foi colocada na coluna, tomando-se o cuidado para não formar bolhas. Acima da sílica, adicionou-se terra diatomácea e, finalmente, acoplou-se uma bomba de pressão ao topo dessa coluna.

A série eluotrópica utilizada foi a seguinte: hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol.

As frações coletadas tinham um volume aproximado de 100 mL e a troca de solventes ocorreu pela observação de manchas na coluna. Coletaram-se as diferentes manchas formadas de acordo com a eluição dos diferentes solventes em recipientes distintos.

Concentração das frações

As frações obtidas na cromatografia foram evaporadas até a total eliminação do solvente. Ressuspendeu-se o remanescente com 5 mL do solvente em questão, concentrando e padronizando as frações.

Utilizaram-se as seguintes temperaturas de ebulição no banho do rotoevaporador: hexano = 69°C; diclorometano = 40°C; acetato de etila = 77°C; etanol = 78°C.

Inibição das frações obtidas na cromatografia de adsorção

Realizou-se uma partição das frações obtidas em solventes apolares (hexano, diclorometano e acetato de etila) adicionando 5 mL de água a cada fração. Utilizaram-se as fases aquosas nos ensaios de inibição, pois, por experiências anteriores (dados não publicados), verificou-se que o inibidor apresenta grande afinidade pela água e outros solventes polares. As frações ressuspensas em etanol foram utilizadas diretamente nos ensaios de inibição, realizando ensaios-controle na presença de etanol.

Espectrometria de massas das frações obtidas na cromatografia de adsorção

A fim de se identificar qual molécula era responsável pela inibição da tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro, realizou-se a espectrometria de massas de frações que não inibiam a tripsina e de frações que inibiam a tripsina.

A espectrometria de massas foi realizada pelos processos Foto-Fenton e UV/H₂O₂ e foram analisados por LC/MS Trap (Agilent-1100). As amostras foram ionizadas com tampão formato de amônio pH 5,5 e inseridas no aparelho por infusão a um fluxo de 5 µL/min, com controle de carga no quadropolo (ICC) ajustado para 30000. A temperatura do gás de secagem (N₂) foi de 325°C e fluxo de 4 L min⁻¹, com potencial de extração de íons de -3500 V.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inibição das tripsinas do bicho-mineiro do cafeeiro, de *Spodoptera frugiperda* e bovina por extratos de folhas de mamona

Utilizando o extrato de folhas de mamona denominada mamoninha de caule vermelho, pôde-se

observar a eficiência desse para inibir a tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro. O inibidor presente no extrato de folhas de mamona foi capaz de inibir a atividade da tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro, com atividade de $2,48 \pm 0,154$ UTI. Essa inibição representa $45,6 \pm 8,4\%$ (Figura 1).

Os tratamentos térmicos por fervura do extrato de folhas de mamona na presença e ausência de β -mercaptoetanol 0,2%, a fim de se desnaturar o inibidor indicaram que a inibição se manteve mesmo após ambos os tratamentos.

Com tais resultados, verificou-se que o inibidor de tripsina presente nas folhas de mamona é uma molécula não-protéica, pois o tratamento de fervura com adição de β -mercaptoetanol 0,2% é suficiente para desnaturar todas as proteínas do extrato, mesmo as termoresistentes.

Caso o inibidor fosse protéico, ele se desnaturaria e perderia sua função, não sendo possível observar a inibição nos extratos fervidos ou fervidos com adição de β -mercaptoetanol 0,2% (v/v).

O mesmo comportamento de inibição de tripsina utilizando extratos de folhas de mamona pode ser observado para o lepidóptero *S. frugiperda*, cuja tripsina foi inibida em $2,49 \pm 0,8$ UTI.

Esse valor representa $35,7 \pm 6,9\%$ da tripsina de *S. frugiperda* inibida e é semelhante ao valor obtido para o bicho-mineiro do cafeeiro (Figura 1).

Já o teste de inibição de tripsina realizado com tripsina bovina na presença do extrato de folhas de mamona indicou que esse não apresenta propriedade inibitória sobre essa enzima, pois sua atividade foi de 100% nos ensaios de inibição (Figura 1).

Precipitação das proteínas do extrato de folhas de mamona com acetona

A precipitação das proteínas do extrato de folhas de mamona com acetona a -20°C, variando a proporção de acetona de 10% a 80% em solução, indicou definitivamente que o inibidor não apresenta características de proteínas com relação à precipitação na presença de acetona.

Nas faixas de precipitação nas quais se espera menor quantidade de proteínas (sedimento de 10, 20, 30, 40 e 50% de acetona a -20°C em solução), verificou-se maior inibição (ou menor atividade de tripsina), ao passo que nas faixas de precipitação onde se espera maior quantidade de proteínas (sedimento de 60, 70, 80%)

verificou-se uma menor inibição da tripsina (maior atividade da tripsina).

A análise da inibição no sobrenadante mostrou que, conforme se aumenta a proporção de acetona à -20°C em solução, maior a capacidade deste solvente solubilizar o inibidor.

Análise da inibição das frações obtidas na cromatografia de adsorção

Ao se realizar o teste de inibição de tripsina na presença das frações provenientes dos solventes apolares hexano (frações 1, 2, 3 e 4) e diclorometano (frações de 5, 6, 7, 8 e 9), não se observou a propriedade de inibição de tripsina de *S. frugiperda* (enzima-modelo de comportamento semelhante à tripsina do bicho-mineiro do cafeeiro, conforme Figura 1).

Porém, ao se realizar o teste de inibição da tripsina nas frações cujo eluente utilizado foi o acetato de etila, observou-se a inibição nas frações 10, 11 e 12, mas, na fração 13 do mesmo eluente, não se observou inibição. A partir da fração 14 (elução com etanol), outro pico de inibição de tripsina foi diagnosticado, sugerindo que possam existir moléculas diferentes envolvidas no processo de inibição (Figura 2).

Para verificar a estabilidade da molécula inibidora de tripsina presente nas frações, realizou-se um teste de inibição de tripsina após 7 dias em relação ao primeiro teste. Como pode ser observado na Figura 2, o mesmo perfil de inibição de tripsina foi verificado após decorrido o tempo de avaliação.

Não se testou a inibição de tripsina após 7 dias utilizando-se as frações que não apresentaram inibição (anteriores à décima).

Espectrometria de massas das frações obtidas

Na tentativa de se obter a massa molecular da substância responsável pela inibição da tripsina dos insetos analisados, realizou-se a espectrometria de massas das frações obtidas na cromatografia de adsorção.

Comparações realizadas entre as frações que apresentavam o poder de inibição de tripsina (frações 10, 11, 12, 14 e 15) com a fração que não apresentava o poder de inibição (fração número 13) não permitiram sugerir a massa da molécula responsável pela inibição de tripsina presente no extrato de folhas de mamona.

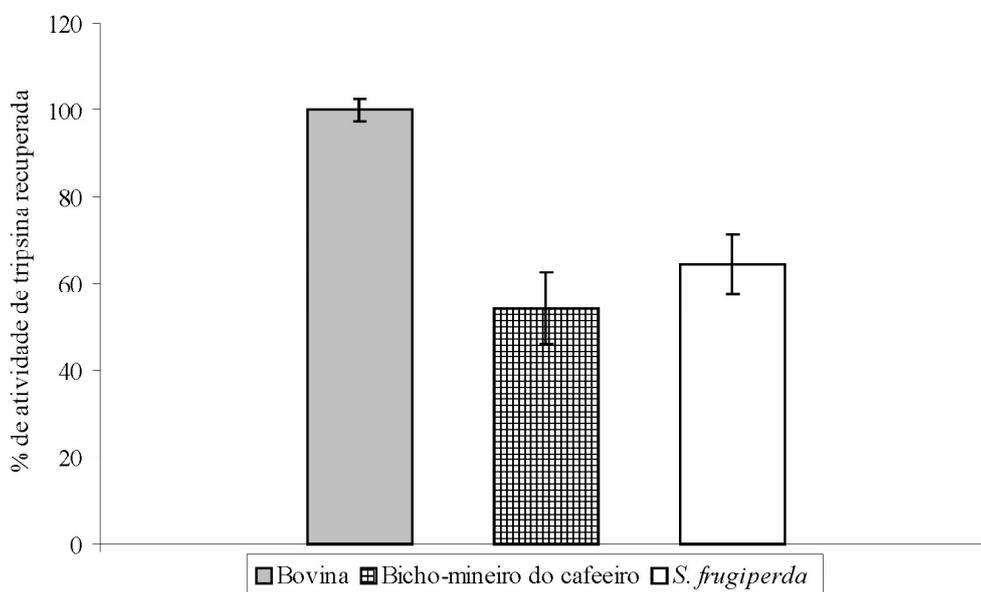


Figura 1 – Atividade de tripsina bovina, de bicho-mineiro do cafeeiro e de *Spodoptera frugiperda* na presença de extratos de folhas de mamona.

Médias e desvios padrão obtidos a partir de triplicatas.

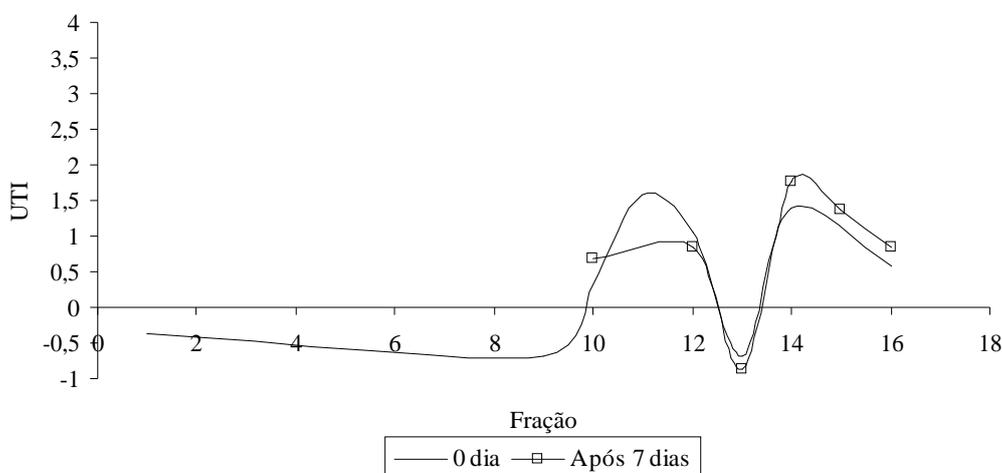


Figura 2 – UTI (*Spodoptera frugiperda*) na presença das frações imediatamente após obtenção e após 7 dias.

CONCLUSÕES

O inibidor de tripsina presente no extrato de folhas de mamona apresentou propriedades de inibição de tripsina de lepidópteros (bicho-mineiro do cafeeiro e *S. frugiperda*), mas não foi capaz de inibir a tripsina bovina.

O inibidor de tripsina de bicho-mineiro do cafeeiro e *S. frugiperda* encontrado nas folhas de mamona é uma molécula não-protéica, termorresistente e resistente ao calor mais adição de b-mercaptoetanol 0,2%, demonstrando que não se trata de um inibidor de natureza protéica.

Os processos de purificação e detecção de massa molecular adotados não puderam sugerir a massa da molécula responsável pela inibição de tripsina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

DUKE, S. O. **Natural pesticides from plants**. Disponível em: <<http://www.hort.purdue.edu/newcrop/proceedings1990/v1-511.html>>. Acesso em: 23 jan. 2007.

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

HAMMERSCHMIDT, R. Phytoalexins: what have we learned after 60 years? **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 37, p. 285-306, 1999.

LEE, S. I.; LEE, S. H.; KOO, J. C.; CHUN, H. J.; LIM, C. O.; MUN, J. A.; SONG, Y. H.; CHO, M. J. Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI) confers resistance to the brown

planthopper (*Nilaparvata lugens* Staal) in transgenic rice. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 1-9, 1999.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. (Eds.). **Biology of the insect midgut**. London: Chapman and Hall, 1996. 486 p.

MCMANUS, M. T.; BURGESS, E. P. J.; PHILIP, B.; WATSON, L. M.; LAING, W. A.; VOISEY, C. R.; WHITE, D. W. R. Expression of the soybean (Kunitz) trypsin inhibitor in transgenic tobacco: effects on larval development of *Spodoptera litura*. **Transgenic Research**, Dordrecht, v. 8, n. 5, p. 383-395, 1999.

MEGYERY, P. et al. **4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride attenuates tumor necrosis-factor--induced blood brain barrier opening**. Disponível em: <<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&epsid=1876088>>. Acesso em: 27 nov. 2006.

ROSSI, G. D.; SANTOS, C. D. dos; CARVALHO, G. A.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P. de; CARVALHO, G. A. Enzimas digestivas do bicho-mineiro do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, Edição Especial, p. 1871-1876, 2009.

XU, D. P.; XUE, Q. Z.; McELROY, D.; MAWAL, Y.; HILDER, V. A.; WA, T. Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTi, transgenic rice plants confers resistance to two major rice insects pests. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 2, n. 2, p. 167-173, 1996.