

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Estudos com o Jaburetox: efeito tóxico de *E. coli* liofilizadas carregadas com o peptídeo
e análise da influencia do epitopo V5 na formação de agregados

Karine Kappaun

Porto Alegre, novembro de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Estudos com o Jaburetox: efeito tóxico de *E. coli* liofilizadas carregadas com o peptídeo e análise da influencia do epitopo V5 na formação de agregados

Karine Kappaun

Trabalho de Conclusão

da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof^a Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini

Orientadora

MSc. Anne Helene Souza Martinelli

Co-orientadora

Porto Alegre, novembro de 2011

Este trabalho foi realizado no LAPROTOX (Laboratório de Proteínas Tóxicas), no Centro de Biotecnologia e no Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob a orientação da Prof^a Dra. Célia Regina Ribeiro da Silva Carlini e Co-orientação da MSc. Anne Helene Souza Martinelli. Os auxílios financeiros foram obtidos do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

Dedico este trabalho aos
meus pais Bertoldo e Ágata, e
ao meu namorado Anderson

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Célia não apenas por ter me orientado nesse trabalho, mas sim pela oportunidade, atenção e paciência dados ao longo de grande parte da minha graduação.

À minha co-orientadora Anne, que sempre esteve disponível para colaborar com o que fosse preciso, e pelo aprendizado como iniciação científica.

Aos colegas do LAPROTOX que de alguma forma contribuíram com a minha formação e pelos momentos de descontração.

Às gurias que já moraram comigo, e as que moram comigo, Angela e Carol pelas conversas e por compartilharem comigo as suas vida.

Aos meus pais, Bertoldo e Ágata, pela educação dada e por não medirem esforços para que eu concluísse a faculdade.

Ao meu namorado Anderson pelo amor e companheirismo.

A todos, que mesmo não citados, mas colaboraram de alguma forma.

RESUMO

Ureases (E.C. 3.5.1.5) são enzimas níquel dependentes que estão envolvidas na biodisponibilidade de nitrogênio e em mecanismos de defesa contra predadores e patógenos em plantas. Nosso grupo descreveu a atividade inseticida da Canatoxina, uma isoforma da urease de *Canavalia ensiformis*. Essa toxicidade depende da liberação de um peptídeo interno de 10 kDa, o Pepcanatox, que é liberado pela hidrólise da proteína por enzimas digestivas do tipo-catepsinas dos insetos suscetíveis. Baseado na sequência N-terminal do Pepcanatox, um fragmento de 270 pb correspondente ao pepcanatox foi clonado e expresso em *Escherichia coli*. Este peptídeo denominado Jaburetox-2Ec, fusionado com um epitopo V5 e seis histidinas na região C-terminal foi testado contra insetos e causou 100% de mortalidade em modelos como *Dysdercus peruvianus*, e *Spodoptera frugiperda* após a ingestão de microgramas do peptídeo purificado. A fim de retirar o epitopo V5 da sequência do peptídeo, a sequência de DNA do Jaburetox-2Ec foi reamplificado por PCR, clonado em plasmídeo pET23a obtendo o peptídeo adicionado apenas da cauda de seis histidinas, o Jaburetox-V5. Nesse trabalho foi testada a atividade inseticida de *E. coli* liofilizadas, carregadas com o Jaburetox-V5, contra insetos modelo que se mostraram suscetíveis ao Jaburetox-2Ec (*D. peruvianos* e *S. frugiperda*), bem como contra o *Aedes aegypti*. Além disso, foi analisado se o epitopo V5 influencia na agregação do peptídeo purificado, pela comparação entre o Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5 por SDS-PAGE a 15% durante 4 semanas, com os peptídeos armazenados em diferentes tampões e em duas temperaturas, 4°C e -20°C. Os resultados demonstraram letalidade do peptídeo acumulado na célula bacteriana liofilizadas apenas contra o mosquito *A. aegypti* e que há influência do epitopo V5 no processo de agregação dos peptídeos.

LISTA DE ABREVIATURAS

°C: graus Celcius

CNTX: canatoxina

cDNA: DNA complementar

C-terminal: região carboxiterminal de uma proteína

DL₅₀: dose letal para 50% dos indivíduos testados

DTT: ditioneitol

EDTA: Ácido etilenodiamino-tetraacético

ELISA: ensaio de enzima ligada ao imunoabsorvente

h: hora(s)

His: histidina

IgG: Imunoglobulina G

IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo

JBU: Jack bean urease (urease de *Canavalia ensiformis*)

kDa: quilodaltons (1000 daltons)

L: litro(s)

LB: meio de cultura Luria-Bertani

mg: miligrama(s)

min: minuto(s)

mM: milimolar(s)

m/m: relação massa/massa

NaPB: tampão fosfato de sódio

ng: nanograma(s)

PCR: Reação em Cadeia da DNA polimerase

pH: potencial hidrogeniônico

pI: ponto isoeletrico

TBS: tris-HCl salina

OD₆₀₀: absorvância a 600nm

RPM: rotações por minuto

s: segundo(s)

SDS: dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida na presença de SDS

v.o.: administração por via oral

v/v: relação volume/volume

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da unidade estrutural das ureases.....	13
Figura 2. A leguminosa <i>Canavalia ensiformis</i>	14
Figura 3. Atividade inseticida do Jaburetox-2Ec em <i>D. peruvianus</i>	16
Figura 4. Ensaio da atividade inseticida contra <i>S. frugiperda</i>	17
Figura 5. Sequência de aminoácidos do Jaburetox-2Ec.....	18
Figura 6. Esquema do ciclo de vida do inseto <i>D. peruvianus</i>	20
Figura 7. Ciclo de vida de <i>S. frugiperda</i>	21
Figura 8. Esquema do ciclo biológico de <i>A. aegypti</i>	23
Figura 9. Efeito de <i>E. coli</i> liofilizadas carregadas com o Jaburetox-V5 a <i>D. peruvianus</i>	31
Figura 10. Semente artificial após bioensaio.....	31
Figura 11. Bioensaio em <i>S. frugiperda</i>	32
Figura 12. Efeitos de liofilizados de <i>E.coli</i> carregadas com Jaburetox-V5 em <i>A. aegypti</i>	34
Figura 13. Análise por SDS-PAGE a 15% após uma semana de armazenamento.....	37
Figura 14. Análise por SDS-PAGE a 15% após duas semanas de armazenamento.....	37
Figura 15. Análise por SDS-PAGE a 15% após três semanas de armazenamento.....	38
Figura 16. Análise por SDS-PAGE a 15% após quatro semana de armazenamento.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeito do pH, da força iônica e da temperatura de armazenamento por 4 semanas na agregação/precipitação dos peptídeos Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5..... 40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Inseticidas e biopesticidas.....	12
1.2 Ureases.....	13
1.3 <i>Canavalia ensiformis</i>	13
1.4 Jaburetox-2Ec.....	15
1.5 Purificação do Jaburetox.....	18
1.6 Estado de Agregação e Atividade biológica.....	19
1.7 Insetos modelos dos bioensaios.....	19
1.7.1 <i>Dysdercus peruvianus</i>	19
1.7.2 <i>Spodoptera frugiperda</i>	21
1.7.3 <i>Aedes aegypti</i>	22
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivos gerais.....	24
2.2 Justificativa.....	24
2.3 Objetivos específicos.....	22
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Expressão dos peptídeos Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5.....	25
3.2 Liofilização das células contendo o Jaburetox-V5.....	26
3.3 Quantificação do peptídeo nas células por ELISA.....	26
3.4 Bioensaios.....	27
3.4.1 <i>Dysdercus peruvianus</i>	27
3.4.2 <i>Spodoptera frugiperda</i>	27
3.4.3 <i>Aedes aegypti</i>	28
3.5 Análise dos agregados.....	28

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
Parte I-Efeito tóxico de <i>E. coli</i> liofilizadas carregadas com o peptídeo Jaburetox-V5 insetos modelos	30
4.1 Quantificação do Jaburetox-V5 por ensaio de ELISA.....	30
4.2 Ensaio Biológicos.....	30
4.2.1 <i>Dysdercus peruvianus</i>	30
4.2.2 <i>Spodoptera frugiperda</i>	32
4.2.3 <i>Aedes aegypti</i>	33
Parte II- Análise da influencia do epitopo V5 na formação de agregados.....	35
4.3 Análise de agregados.....	35
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	41
5.1 Conclusões.....	41
5.2 Perspectivas.....	42
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 Inseticidas e biopesticidas

O controle de pragas na agricultura e de vetores de doenças é feito principalmente usando inseticidas químicos. No entanto, esses produtos podem causar sérios danos ao meio ambiente e também efeitos deletérios na saúde humana (Devine e Furlong, 2007), justificando a busca a novos métodos de combate.

Os biopesticidas de origem vegetal e microbiana têm sido usados para controle de pragas e como forma de proteção ao meio ambiente. Biopesticidas são produtos derivados de organismos que combatem populações de pragas; esses organismos podem ser plantas ou mesmo micro-organismos como bactérias, fungos e vírus (Thakore, 2006). Um biopesticida bastante utilizado são as toxinas Bt (*Bacillus thuringiensis*), usadas no controle de insetos lepidópteros, dípteros e alguns coleópteros, e que tem como vantagem o fato de serem seletivas para algumas famílias de insetos e não gerar resíduos poluentes, além de não atingir outros organismos como mamíferos e pássaros (Gatehouse, 2002).

Muitas classes de proteínas de plantas têm efeito tóxico em insetos. Como exemplo as ureases, que apresentam efeito entomotóxico que independe da atividade catalítica (Follmer *et al.*, 2001).

1.2 Ureases

As ureases (EC 3.5.1.5) são enzimas que catalisam a hidrólise de uréia à amônia e a dióxido de carbono, sendo necessário o níquel como cofator enzimático (Dixon *et al.*, 1975). As ureases são sintetizadas por diversos organismos como bactérias, fungos e

plantas, mas não animais (Mobley e Hausinger, 1989). Em bactérias, as ureases são formadas por duas ou três subunidades diferentes, como é o caso em *Helicobacter pylori* e *Klebsiella aerogenes*, respectivamente. Em plantas e fungos, as ureases são hexâmeros formados por seis subunidades idênticas de cerca de 90 kDa (Figura 1).

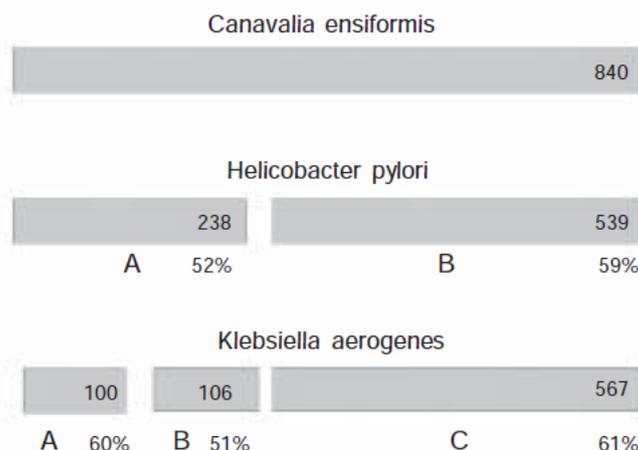


Figura 1. Esquema da unidade estrutural das ureases. O número de aminoácidos de cada subunidade está indicado e a porcentagem de identidade correspondente em relação à região equivalente da urease de *C. ensiformis* é mostrado nas subunidades bacterianas (Olivera-Severo *et al.*, 2006).

A principal função da urease em plantas parece estar relacionada a reciclagem do nitrogênio (Andrews *et al.*, 1986), mas diversas atividades biológicas que independem da atividade ureolítica têm sido demonstradas (Follmer *et al.*, 2001), sugerindo que esta possa estar envolvida na proteção da planta a patógenos.

1.3 *Canavalia ensiformis*

A *C. ensiformis*, uma planta conhecida popularmente como feijão-de-porco (Figura 2), é uma leguminosa com grande resistência a insetos, sendo suas sementes

uma rica fonte de urease (JBU), a primeira enzima cristalizada, em 1926 por James Sumner. Além da urease, são encontradas outras proteínas de interesse bioquímico e biotecnológico, como a concanavalina A (Sumner e Howell, 1936) e a canatoxina (CNTX) (Carlini e Guimarães, 1981).



Figura 2. A leguminosa *Canavalia ensiformis* a qual apresenta diferentes proteínas de interesse.

A CNTX, que foi descrita por Carlini e Guimarães em 1981, e mais tarde identificada como uma isoforma de urease por Follmer *et al.*(2001), é uma urease dependente de níquel e zinco, com massa molecular de 184 kDa quando analisada por gel-filtração (pH 7,5) e de 90 kDa, quando analisada em meio redutor por SDS-PAGE, sugerindo tratar-se de um dímero. Ao ser tratada com *p*-hidroximercuribenzoato, um inibidor irreversível de urease, há perda da atividade ureolítica, mas não de outras atividades biológicas descritas para a CNTX, indicando que existem outros domínios proteicos responsáveis por essas atividades (Follmer *et al.*, 2001). A CNTX possui de 30-40% da atividade ureolítica da urease majoritária (JBU) e comparações das

sequências da CNTX e a JBU demonstram grande homologia (aprox.85%) (Follmer *et al.* 2001; Mulinari *et al.*, 2011).

Quando administrada intraperitonealmente a ratos e camundongos, há bradicardia, hipertensão e hipotermia, seguida de convulsões e morte ($DL_{50} = 0,5-2,0$ mg/kg) (Carlini *et al.*, 1984). O mesmo não ocorre ao se administrar por v.o, provavelmente devido à instabilidade da proteína no pH ácido do estômago (Carlini e Guimarães, 1991). Tanto CNTX como JBU apresentam *in vitro* atividade secretagoga sobre vários sistemas isolados, por exemplo, induzindo agregação e secreção de plaquetas (Carlini *et al.*, 1985; Barja-Fidalgo *et al.*, 1991; Follmer *et al.*, 2001). Apresentam também atividade letal para insetos como *Callosobruchus maculatus* e *Rhodnius prolixus* (Carlini *et al.*,1997; Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000), e *Dysdercus peruvianus* (Stanisçuaski *et al.*, 2005) e atividade fungicida/fungistática (OLIVEIRA *et al.*, 1999; Becker-Ritt *et al.*, 2007). A atividade inseticida das ureases envolve, em grande parte, a hidrólise da proteína e a formação de peptídeos entomotóxicos, liberados pelas enzimas digestivas tipo-catepsina dos insetos suscetíveis. Um dos peptídeos entomotóxicos derivados da hidrólise *in vitro* da CNTX por enzimas de *C. maculatus* foi isolado e denominado Pepcanatox (Ferreira-DaSilva *et al.*, 2000; Carlini *et al.*, 2000).

1.4 Jaburetox-2Ec

Baseado na sequência N-terminal do Pepcanatox, e utilizando como *template* o cDNA da isoforma de urease JBURE-II (Pires-Alves *et al.*, 2003), um peptídeo recombinante equivalente, denominado Jaburetox-2Ec, foi expresso em *E. coli* utilizando como vetor de expressão o plasmídeo pET 101 D-TOPO, ao qual está fusionado um epitopo V5 e uma cauda de 6 His (Mulinari *et al.*, 2007). O Jaburetox-

2Ec, com 14,13 kDa, apresentou atividade tóxica contra ninfas de *D. peruvianus* (Figura 3), quando alimentados em sementes artificiais contendo 0,01% do peptídeo purificado (m/m). O efeito se mostrou tempo dependente, com fase de latência de 3-4 dias, alcançando 100% de mortalidade após 11 dias de ensaio, uma toxicidade maior que a observada na CNTX na mesma dose (Mulinari *et al.*, 2007).

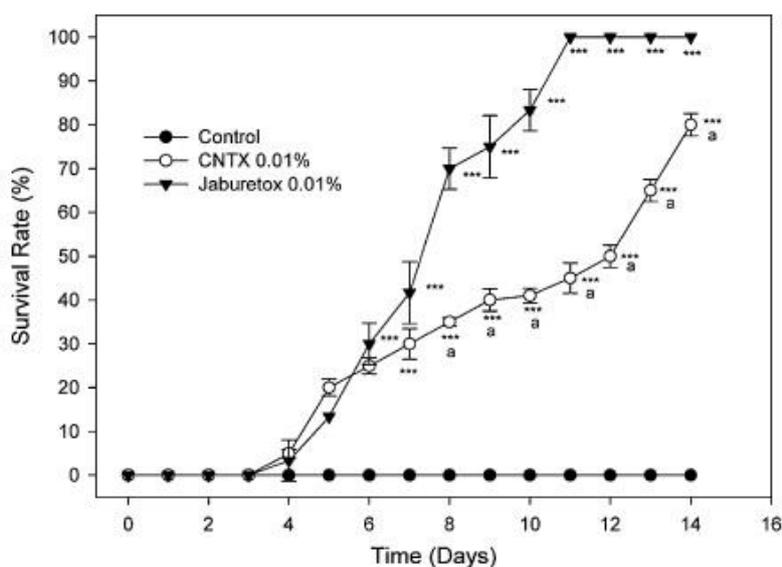


Figura 3. Atividade inseticida do Jaburetox-2Ec em *D. peruvianus* (ninfas de terceiro ínstar) alimentados com sementes artificiais de algodão contendo 0,01% (m/m) de Jaburetox-2Ec (Mulinari *et al.*, 2007).

Demonstrou-se também que o Jaburetox-2Ec apresenta toxicidade contra larvas de *S. frugiperda* (Figura 4), insetos que apresentam digestão do tipo tripsina (Mulinari *et al.*, 2007), que não são sensíveis a CNTX intacta (Carlini *et al.*, 2007)

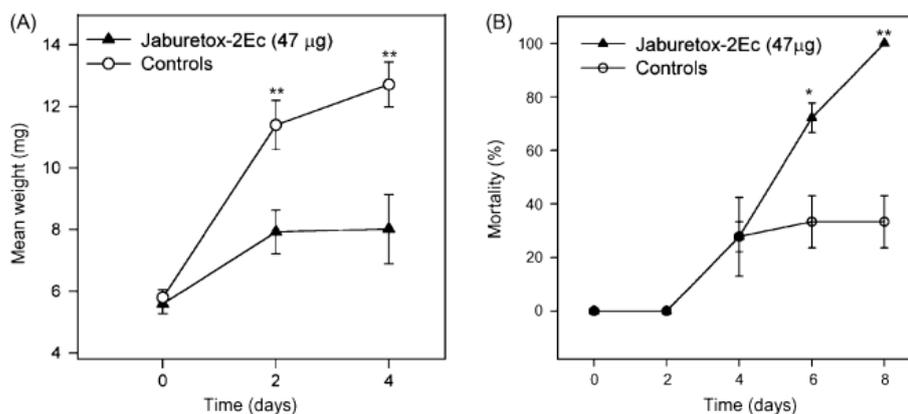


Figura 4. Ensaio de atividade inseticida contra *S. frugiperda*, alimentadas com discos foliares de *Phaseolus vulgaris* contendo o Jaburetox-2Ec. (A) Ganho de peso individual dos insetos (B) Mortalidade (%) das larvas de *S. frugiperda* (Mulinari *et al.*, 2007).

Quando injetado intraperitonealmente em ratos e camundongos, o Jaburetox-2Ec não produziu efeito tóxico, ao contrário da CNTX que causa convulsão e morte, em poucas horas. Quando administrado por via oral nas mesmas doses, como observado para a CNTX, o Jaburetox-2Ec não se mostrou tóxico (Mulinari *et al.*, 2007). O Jaburetox-2Ec apresenta efeito antidiurético em túbulos de Malpighi isolados de *R. prolixus* (Stanisquaski *et al.*, 2008) e induz a formação de poros em membranas lipídicas (Barros *et al.*, 2009).

Em nosso laboratório, estudos de mutagênese sítio dirigida estão sendo aplicados visando identificar qual(is) região(ões) da molécula do peptídeo é/são responsável(is) por essas atividades biológicas. Em uma primeira abordagem, foram retirados os 26 aminoácidos correspondentes ao epítipo V5, de origem viral, que não existem no peptídeo produzido naturalmente por hidrólise da CNTX com enzimas de inseto. Para tal, o cDNA do Jaburetox-2Ec foi reamplificado por PCR, e clonado no plasmídeo pET 23a, resultando no peptídeo denominado Jaburetox-V5, de 11,5 kDa contendo apenas

os 6 resíduos de His na região C-terminal (Martinelli *et al.*, 2009). Portanto o que difere os 2 peptídeos é a presença do epítipo V5 utilizado para reconhecimento do produto recombinante, que está presente apenas no Jaburetox-2Ec. Na Figura 5, está sendo mostrada a sequência de aminoácidos do peptídeo Jaburetox-2Ec, sendo marcada a região do epítipo V5, presente apenas nesse peptídeo. O Jaburetox-2Ec apresenta massa molecular teórica de 14,13 kDa e o Jaburetox-V5 de 11,50 kDa. O pI é de 5,08 para o Jaburetox-2Ec e 4,92 para o Jaburetox-V5 (calculados pelo programa ExPASy)

```

M G P V N E A N C K A A M E I V C R R E 20
F G H K E E E D A S E G V T T G D P D C 40
P F T K A I P R E E Y A N K Y G P T I G 60
D K I R L G D T D L I A E I E K D F A L 80
Y G D E S V F G G G K V I k g e l n s k 100
l e g k p i p n p l l g l d s t r t g h 120
h h h h h 125

```

Figura 5 Sequência de aminoácidos do Jaburetox-2Ec, em destaque epítipo V5, ausente no Jaburetox-V5. Os números de aminoácidos estão indicados à direita (Modificado de Mulinari *et al.*, 2007).

1.5 Purificação do peptídeo Jaburetox

O rendimento do Jaburetox-2Ec geralmente é menor (em torno de 7 mg de peptídeo) contra 13,5 mg do Jaburetox-V5, ambos purificados de cultura com 800 mL de meio.

O processo de expressão, purificação e diálise, dura em torno 5 dias; assim seria adequado o uso de *E.coli* liofilizadas carregadas com o peptídeo Jaburetox-V5, já que haveria uma diminuição tanto no tempo de preparação, como nos custos do processo de preparo e purificação.

1.6 Estado de agregação e atividade biológica

Como descrito no trabalho de Follmer *et al.*(2001), as ureases apresentam diversas atividades biológicas que independem da atividade catalítica da enzima. Essas propriedades biológicas são alteradas conforme o tempo de armazenamento. À medida em que vai havendo a agregação da proteína, formando inicialmente oligômeros solúveis até culminar com a precipitação, há diminuição nessas atividades (Follmer *et al.*, 2001; Follmer *et al.*, 2004). Estudos do nosso grupo mostraram que a agregação da JBU está relacionada com características e propriedades do meio, como o tipo de tampão, pH, temperatura, presença de sais, agentes oxidantes e redutores, etc (Follmer *et al.*, 2004).

Na rotina do nosso laboratório é possível observar que os peptídeos Jaburetox-2Ec (Barros *et al.*, 2009) e Jaburetox-V5 apresentam também o comportamento de agregação, resultando em alterações de suas propriedades biológicas com o tempo de armazenamento. Porém, ainda não há estudos mostrando se o epitopo V5 (presente na versão Jaburetox-2Ec), o meio em que se encontra, assim como a temperatura de armazenagem, alteram essa característica de agregação.

1.7 Insetos modelos de bioensaios nesse estudo

1.7.1 Dysdercus peruvianos

Conhecido popularmente como percevejo manchador do algodoeiro, o *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae) é inseto-praga do algodão do tipo

sugador-picador, provocando grandes perdas econômicas, desde manchas nas fibras, causadas pelas excretas do inseto que apresentam coloração avermelhada, até introdução de fungos e bactérias fitopatogênicos (Gallo *et al.*, 1988). Seu ciclo de vida inicia no solo e dura em torno de 45 dias, podendo variar de 25 até 69 dias dependendo da temperatura. As fêmeas ovipositam em solos próximos ao algodoeiro, cobrindo os ovos ligeiramente com terra. Os ovos esbranquiçados vão passando a amarelo-claro brilhante, conforme o desenvolvimento embrionário. Após o período de incubação (cerca de 10 dias), há eclosão das ninfas que inicialmente têm coloração alaranjada, passando a avermelhada ao longo da passagem por 5 instares (Figura 6).

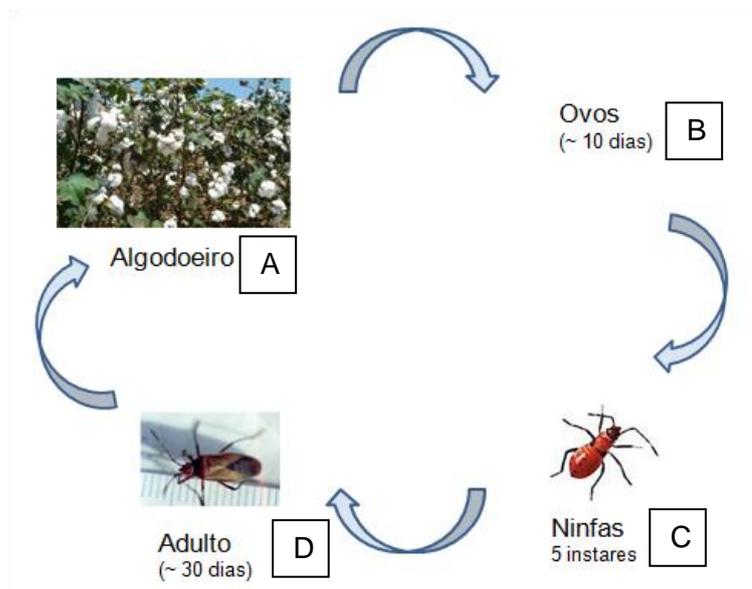


Figura 6. Esquema do ciclo de vida do inseto *D. peruvianus*. (A) Fêmeas ovipositam no solo próximo ao algodoeiro; (B) Ovos; (C) Ninfas do inseto; (D) Adulto.

Tanto ninfas como adultos penetram entre as fibras dos capulhos onde sugam as sementes. Os adultos surgem aproximadamente 30 dias após a postura e apresentam coloração marrom escura (Gallo *et al.*, 2002). Em estudos prévios, demonstramos que

ninfas desse inseto apresentam alta suscetibilidade ao Jaburetox-2Ec purificado (Mulinari *et al.*, 2007).

1.7.2 *Spodoptera frugiperda*

A *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae), conhecida como lagarta-do-cartucho, é considerada a principal praga na cultura do milho no Brasil, demandando grande investimento para seu controle (Valicente e Tuelher, 2009).

Cada mariposa da lagarta-do-cartucho põe até 2000 ovos nas folhas (Figura 7), após 3 dias, nascem as lagartas, que alimentam-se das folhas mais novas do milho. O período larval dura de 12 a 30 dias, quando penetram no solo para se transformarem em pupas, fase que dura de 8 a 25 dias (Capinera, 2001).

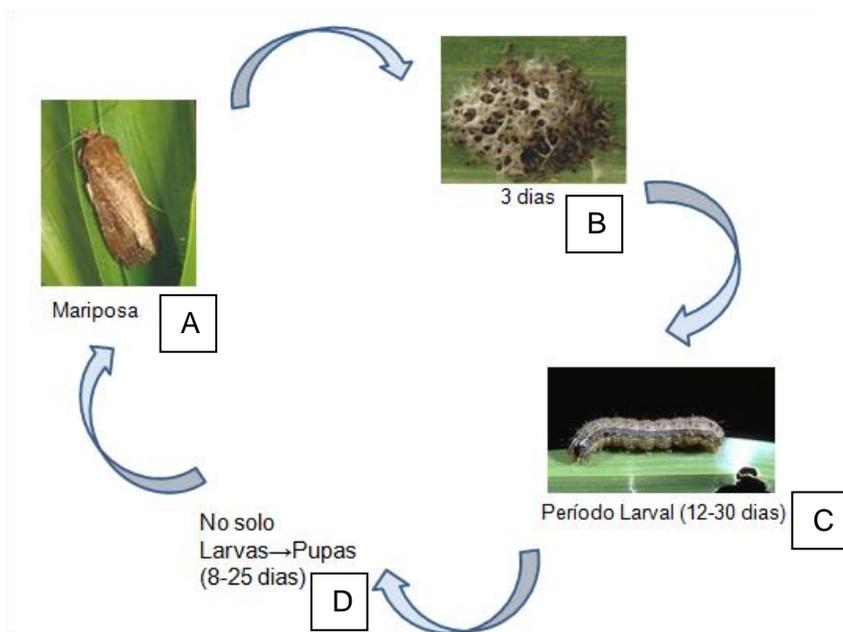


Figura 7. Ciclo de vida de *S. frugiperda*. (A) Mariposa; (B) Ovos em eclosão; (C) Larvas do inseto; (D) Transformação no solo das larvas em pupas.

Normalmente é encontrada no cartucho do milho, podendo ser encontrada em outras partes da planta (Cruz e Monteiro, 2004).

Reduções na produção do milho por esse inseto atingem 34%, com perdas que variam conforme a fase de desenvolvimento da planta atacada, com a cultivar, com o local de plantio e áreas adjacentes conforme as práticas agronômicas (Cruz, 1995). Em estudos prévios, demonstramos que as larvas dessa lagarta são susceptíveis ao Jaburetox-2Ec (Mulinari *et al.*, 2007).

1.7.3 *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é vetor de vírus responsável pela transmissão de doenças a humanos, como a febre amarela urbana e a dengue. A vacinação contra a febre amarela é uma forma eficiente de combate à doença, enquanto que a vacina contra a dengue está ainda em fase de testes (Neves, 2009).

A dengue hemorrágica permanece com alta letalidade, principalmente porque nem sempre o atendimento aos pacientes é adequado e precoce. O principal modo de controle da dengue é o combate ao seu vetor, o mosquito *Aedes aegypti*. O combate a esse inseto é complexo e exige ações coordenadas de vários setores da sociedade além de mudanças nos hábitos sociais da população (Tauil, 2001).

Os ovos do mosquito são colocados nas paredes de recipientes, em grupos de 10 a 30, podendo permanecer viáveis por mais de 1 ano. Ao entrar em contato com a água, as larvas eclodem em 15 minutos, sofrem mudas, passando pelo estágios L1, L2, L3, L4, ao longo de 6 a 7 dias, em temperatura em torno de 25°C, para então transformarem-se em pupas, ficando nessa fase de 3 a 5 dias, para emergirem como adultos. O mosquito adulto vive cerca de 20 dias. Os criadouros desse mosquito são sempre recipientes com água limpa, como pneus, garrafas, pratos de vasos de plantas, entre outros. O *A. aegypti*

adulto apresenta coloração bem escura, com duas marcações centrais retas e duas marcações curvas, de cor prata, no tórax, formando desenho em forma de “lira”. O abdome apresenta anelações prateadas e as patas também apresentam marcações pratas e negras (Neves, 2009). Na Figura 8, está apresentado um desenho esquemático do ciclo de vida do inseto.

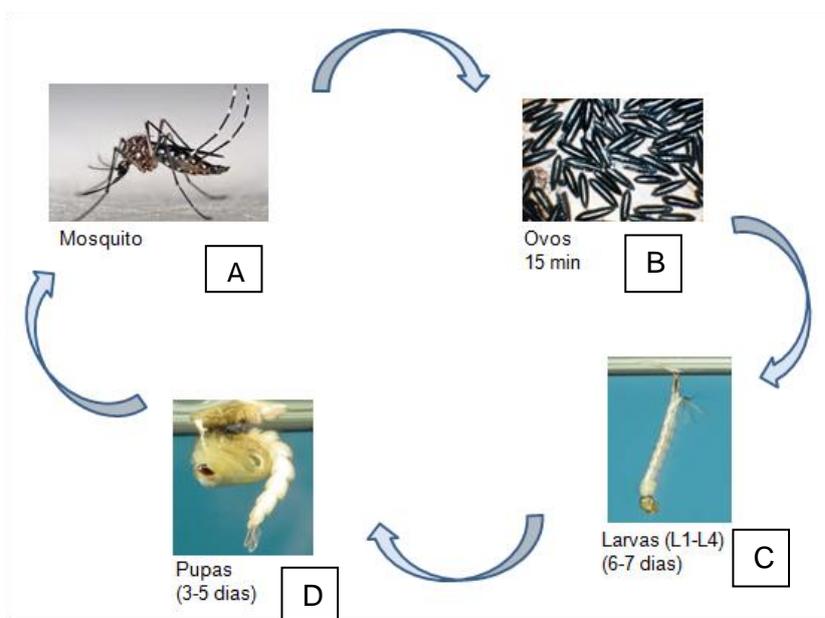


Figura 8 Esquema do ciclo biológico de *A. aegypti*. (A) Fêmea de *Aedes aegypti* ; (B) ovos do inseto;(C) estágios larvais do *Aedes aegypti*(L1 até L4); (D) pupa.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Estudar o efeito tóxico de *E. coli* liofilizadas carregadas com o peptídeo Jaburetox-V5 frente a insetos modelos.
- Analisar, por SDS-PAGE, a influência do epitopo V5 na formação de agregados dos peptídeos Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5.

2.2 Justificativa

O estudo de novos bioinseticidas é de grande interesse, visando seu uso no controle de pragas da agricultura e de vetores transmissores de doenças em humanos.

O uso das células bacterianas (*E. coli*) liofilizadas, carregadas com o peptídeo Jaburetox-V5, diminuiria enormemente o tempo de preparo e gastos com o processo de purificação. Além disso, a manutenção do peptídeo dentro da célula liofilizada facilita a armazenagem, podendo ser mantido à temperatura ambiente.

2.3 Objetivos específicos

- Testar a atividade inseticida de *E. coli* liofilizadas carregadas com o peptídeo Jaburetox-V5 contra os seguintes modelos:

Dysdercus peruvianus

Spodoptera frugiperda

Aedes aegypti

- Analisar a influência do epitopo V5 na agregação dos peptídeos Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5, acompanhados por SDS-PAGE durante 4 semanas de armazenamento sob diferentes condições.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Expressão dos peptídeos Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5

A expressão dos peptídeos Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5 foi feita segundo Mulinari *et al.*, 2007, com algumas modificações. Resumidamente, células *E. coli* transformadas e estocadas em glicerol, foram pré-inoculadas em tubos Falcon contendo meio LB, ampicilina 100 mg/mL e sob agitação de 150 RPM a 37°C, por 16 h. Às células (*E. coli* RIL) transformadas para expressão do Jaburetox-V5 foi adicionado também cloranfenicol 40 mg/mL. A inoculação de 2 mL dos pré-inóculo foi feita em Erlenmeyers de 1 L contendo 200 mL do mesmo meio de cultura, pH e antibióticos, deixando a cultura multiplicar até atingir OD₆₀₀ 0,6-0,8. As células foram então induzidas com 0,5 mM de IPTG (concentração final) por 2 h. Em um dos Erlenmeyers não foi feita a indução, para ser utilizado como controle negativo nos ensaios biológicos. Em seguida, a cultura bacteriana foi centrifugada a 5000 RPM durante 15 min, e o sobrenadante descartado. O *pellet* de células foi congelado a -20 °C para posterior liofilização (ensaios biológicos) ou purificação (ensaio da agregação dos peptídeos).

3.2 Purificação dos peptídeos

A purificação é feita com resina *Chelating Sepharose* (GE Healthcare), imobilizada com NiCl, pré-equilibrada com Tampão de equilíbrio (50 mM de Tris base, 500 mM NaCl, e 5 mM imidazol, pH 7,5). As células são ressuspensas no mesmo tampão e lisadas por ultrassom. O sobrenadante resultante é circulado na coluna cromatográfica, e o peptídeo eluído com Tampão de eluição (50 mM de Tris base, 500 mM NaCl, e 200 mM imidazol, pH 7,5).

3.3 Liofilização das células contendo Jaburetox-V5

Os *pellets* das células induzidas e não induzidas foram ressuspensos com NaPB 20 mM pH 7,5, transferidos para tubos Falcon previamente pesados e centrifugados a 5000 RPM por 10 min, sendo descartado o sobrenadante. Os *pellets* foram então congelados em nitrogênio líquido e, então, liofilizados.

3.4 Quantificação do peptídeo nas células por ELISA

Placas de ELISA foram sensibilizadas *overnight* com 50 μ L de amostra/poço diluídas em TBS 1x a 4 °C. A curva padrão foi feita com o Jaburetox-V5 purificado, nas concentrações de 3, 10, 50, 70 e 100 ng diluído com TBS 1x. Em paralelo, uma massa de 18,6 mg de células liofilizadas (*E.coli*) carregadas com o peptídeo Jaburetox-V5 foi ressuspensa em TBS 1x, lisadas por ultrassom em 5 ciclos de 20 s, seguida de centrifugação a 5000 RPM por 20 min, coletando-se o sobrenadante como um extrato total. Deste foi feita uma diluição seriada em TBS 1x, em triplicata, de 1:10 à 1:10000 (v/v), aplicando-se 50 μ L de amostra/poço. Após o período de sensibilização, as placas foram bloqueadas com 5% de caseína em TBS 1x por 1 h. A placa foi incubada, após 3 lavagens com TBS, com anticorpo primário Anti-Jaburetox com diluição 1:10 000(v/v), adicionado de 2% de caseína por 1 h. Transcorrido o tempo, mais 3 lavagens foram feitas e as amostras foram expostas ao anticorpo secundário anti IgG de coelho marcado com fosfatase alcalina (Sigma) em concentração 1:15 000 (v/v) com 2% de caseína durante 1 h. Procedeu-se a revelação de 1 h com 50 μ L de solução composta por 1 mM de *p*-nitrofenilfosfato, 10 mM de borato de sódio e 0,25 mM de MgCl₂, pH 9,8, sendo a leitura da absorbância feita em leitor de placas SpectraMax M3 a 405 nm. Os resultados foram expressos como μ g de Jaburetox-V5 por mg de células liofilizadas.

3.5 Bioensaios

3.5.1 *Dysdercus peruvianus*

Colônia de *D. peruvianus* foi mantida em insetário do LAPROTOX, em sala climatizada, com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade controlada ($70\% \pm 5\%$) e fotoperíodo de 14:10 h (claro/escuro) (Milano *et al.*, 1999). Grupos de 10 insetos de 3º instar (em triplicata) foram alimentados com sementes artificiais de algodão, segundo Stanisçuaski *et al.* (2005), com algumas modificações.

Cápsulas de gelatina nº 2 ou 3, confeccionadas manualmente, contendo 0,01% e 0,02% do Jaburetox-V5 contido da célula bacteriana liofilizada, misturado a farinha de algodão, foram oferecidas aos insetos, que tiveram acesso livre à água em bebedouros de plástico. Os insetos foram acompanhados por 14 dias, registrando-se a sobrevivência diariamente. Como controle, foram usadas cápsulas com mesma massa de células não induzidas e farinha de algodão.

3.5.2 *Spodoptera frugiperda*

Para o ensaio com *S. frugiperda*, utilizou-se larvas de 3º instar, provenientes de colônia do Laboratório de Controle de Pragas do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, mantidas em dieta artificial baseada em feijão (Greene *et al.*, 1976), em sala climatizada a $27^\circ\text{C} \pm 1$, umidade relativa de $50\% \pm 10\%$ e fotoperíodo de 14:10h (Bertholdo-Vargas *et al.*, 2008). Sobre pedaços da dieta, foram adicionadas doses de células liofilizadas contendo 47 µg do peptídeo Jaburetox-V5. O ensaio consistiu de vinte lagartas, alimentadas em potes individuais, medindo-se sobrevivência e peso dos insetos no primeiro, quarto e nono dia. Como controle, outro

grupo de insetos recebeu pedaços da dieta adicionados de massa equivalente de células liofilizadas não induzidas. Esse ensaio foi realizado pela Dra. Lucia Rosane Bertholdo Vargas, na Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS.

3.5.3 *Aedes aegypti*

Para o experimento com *A. aegypti*, foram utilizadas larvas provenientes de uma colônia de mantida no Laboratório de Bioquímica de Lipídeos e Lipoproteínas, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. Os mosquitos adultos são alimentadas com sangue de coelho, mantidos a 28°C com fotoperíodo de 8:16 h (claro/escuro). O experimento foi feito em duplicata, em potes contendo 25 larvas imersas em água destilada. As larvas foram alimentadas com ração de peixes ornamentais, adicionada de células de *E. coli* liofilizadas, contendo 10 µg e 100 µg de Jaburetox-V5. Após a oferta da dieta contendo Jaburetox-V5, acompanhou-se a sobrevivência e progressão de fase do ciclo biológico para pupa e adulto, expressas em porcentagem do número inicial de larvas. As observações foram feitas nos 3 primeiros dias, e uma última observação no sexto dia. Esse experimento foi realizado pela Dra. Georgia Atella, no Laboratório de Bioquímica de Lipídeos e Lipoproteínas, na Universidade de Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

3.6 Análise dos agregados por SDS-PAGE

Os peptídeos Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5 foram purificados e dialisados contra diferentes tampões (Tampão de Urease, 20 mM NaPB, 1 mM EDTA, 5 mM β-mercaptoetanol, pH 7,5; NaPB a 20 mM nos pHs 7,5 e 6,5 e NaPB 200 mM em pH 7,5) e armazenados a 4°C e -20°C. A cada semana de armazenamento, num total de 4

semanas, amostras dos peptídeos em cada condição de armazenamento, foram analisados por SDS-PAGE a 15%, para avaliação da presença de agregados .

Previamente à eletroforese, as amostras foram fervidas por 5 min em tampão de amostra contendo 2 % SDS e 20 mM de DTT, adicionadas de mais 250 mM de β -mercaptoetanol. Os géis foram corados com Coomassie Blue ou Coomassie Blue Coloidal e foram, então, digitalizados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Parte I- Efeito tóxico de *E. coli* liofilizadas carregadas com o peptídeo Jaburetox-V5 insetos modelos

4.1 Quantificação do Jaburetox-V5 por Ensaio de ELISA

Após a purificação do Jaburetox-V5 em coluna cromatográfica de níquel, obtivemos o peptídeo na concentração de 0,9 mg/mL. O peptídeo foi diluído em TBS 1x nas quantidades de 3, 10, 50, 70 e 100 ng em 50 uL para a curva padrão do ELISA. A curva padrão foi linear ($r=0,9857$) nas concentrações escolhidas, resultando na equação $y=0,0014x + 0,0989$. Utilizando-se essa equação, foi possível estimar a quantidade de peptídeo presente nas células bacterianas, e estimar a dose para os bioensaios, tendo-se como resultado $27\mu\text{g}/\text{mg}$ de célula.

4.2 Ensaios biológicos

4.2.1. *Dysdercus peruvianus*

As células *E. coli* liofilizadas carregadas com peptídeo Jaburetox-V5 foram misturadas a farinha de algodão nas doses de 0,01% e 0,02%, de forma a garantir homogeneidade, e testado contra ninfas de terceiro ínstar de *D. peruvianus*. As células não mostraram toxicidade nessas concentrações (Figura 9), ao contrário do que era esperado, já que o Jaburetox-2Ec purificado é altamente tóxico para ninfas desse estágio (Mulinari *et al.*, 2007).

Uma vez que o liofilizado de células bacterianas tem uma cor mais clara do que a farinha de algodão, a observação do conteúdo que restou nas sementes artificiais após o bioensaio indicou que as células bacterianas não são, ou são menos ingeridas pelo

inseto, do que a farinha em si (Figura 10). *D. peruvianus* é um inseto sugador de sementes “injetando” amilases salivares durante o ato de sugar que solubilizam o amido da farinha, facilitando sua posterior ingestão. Claramente, o processo de solubilização da farinha não afetou o liofilizado de células, resultando na não ingestão, ou pouca ingestão, das células pelo inseto. Outro aspecto a se considerar é que a liberação do Jaburetox-V5 de dentro da célula bacteriana depende do rompimento da célula bacteriana pelas enzimas digestivas de *D. peruvianus*, um processo que pode ser pouco eficiente nesse inseto.

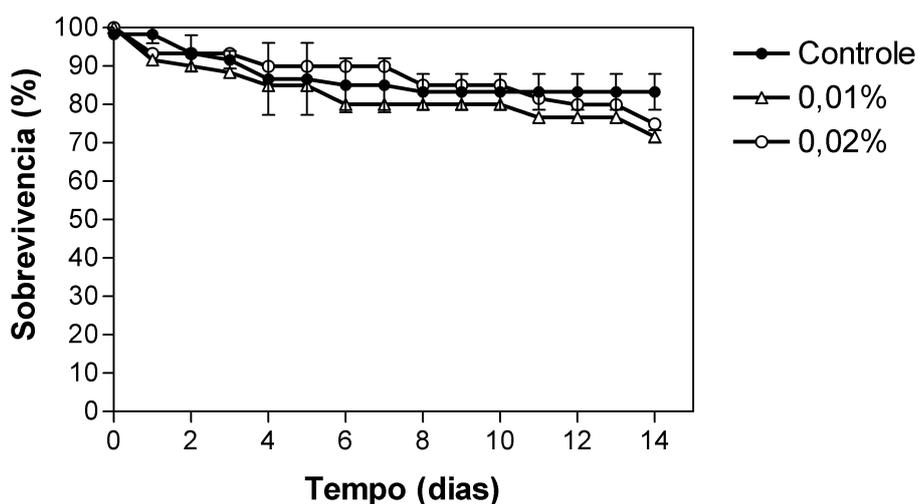


Figura 9. Efeito de *E.coli* liofilizadas carregadas com o Jaburetox-V5 em ninfas de 3º ínstar de *D. peruvianus* nas concentrações de 0.01% e 0.02%. A sobrevivência foi acompanhada por 14 dias. Os resultados são expressos como média e desvio padrão de 2 experimentos independentes.



Figura 10. Semente artificial após o bioensaio.

4.2.2 *Spodoptera frugiperda*

Lagartas de *S. frugiperda* foram alimentadas com dieta artificial contendo *E. coli* liofilizadas carregadas com Jaburetox-V5 na dose de 47 μg do peptídeo. Após 10 dias de bioensaio, não houve letalidade ou diferença de ganho de peso entre os grupos experimentais (Figura 11).

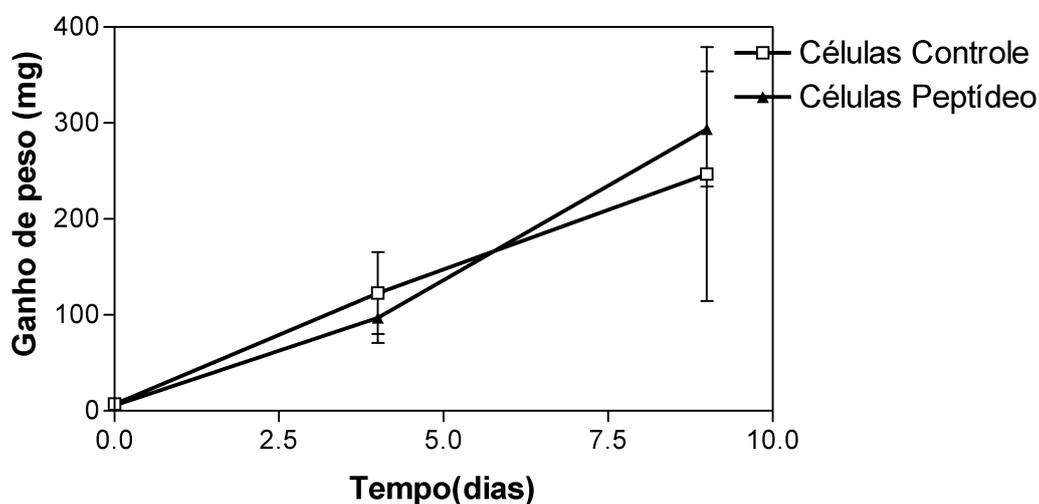


Figura 11. Bioensaio em *S. frugiperda* alimentadas com liofilizado de *E. coli* contendo Jaburetox-V5 (47 μg) mostrando que não há diferença no ganho de peso entre o controle e as células contendo o peptídeo. Não houve letalidade no experimento.

Os resultados contrastam com os obtidos anteriormente (Mulinari *et al.*, 2007), em que observou-se 100 % de mortalidade em 3 dias de *S. frugiperda* que ingeriram 47 μg de Jaburetox-2Ec. Naquele estudo, o peptídeo purificado foi adicionado na superfície de discos foliares de feijão, sendo esses totalmente consumidos ao final do ensaio. No presente trabalho, o liofilizado de células bacterianas contendo o Jaburetox-V5 foi

adicionado sobre pedaços de dieta artificial, oferecidos individualmente às lagartas. Ao final do ensaio, ainda havia dieta não ingerida. Portanto, não foi possível saber o quanto das células bacterianas foi ingerido por cada lagarta. Além disso, a suspensão bacteriana pode não ter se distribuído de forma homogênea nos pedaços de dieta. Outro aspecto a se considerar é que composição da dieta artificial é muito mais rica em nutrientes do que a folha de feijão, sendo possível que algum componente da dieta possa neutralizar/interferir na atividade do peptídeo.

4.2.3 *Aedes aegypti*

Larvas de *A. aegypti* foram alimentadas com ração de peixes ornamentais embebida com a suspensão de *E. coli* carregada com o peptídeo Jaburetox-V5. Já no 1º dia de observação, a dose de 100 µg de Jaburetox-V5 produziu 90% de mortalidade, registrando-se 97,5 % no 6º dia (Figura 12).

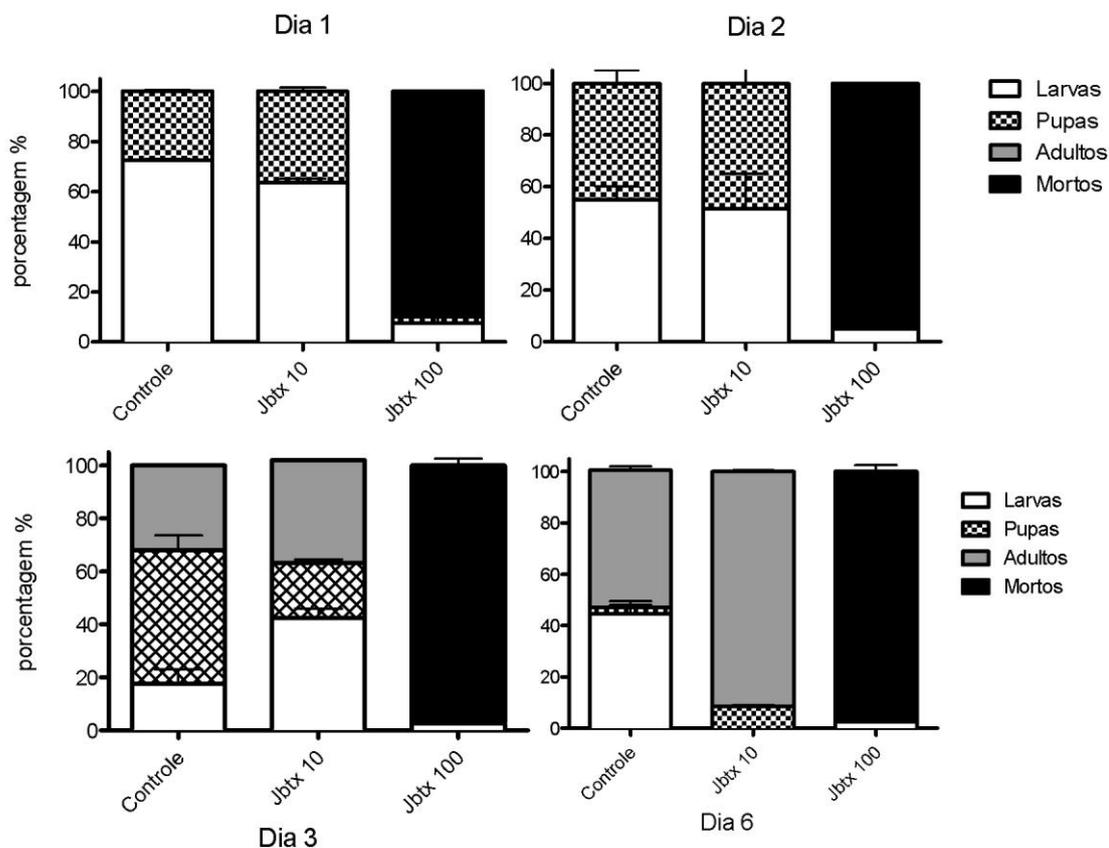


Figura 12. Efeitos de liofilizados de *E. coli* carregadas com Jaburetox-V5 em *A. aegypti*. Larvas do mosquito receberam ração de peixe ornamental embebida numa suspensão de *E. coli* liofilizadas contendo 0 (controle), 10 ou 100 μg de Jaburetox-V5. Nos dias 1, 3 e 6 foram registrados a mortalidade e as fases do ciclo de vida dos sobreviventes. Os resultados são média de duplicatas, e expressos como percentagem em relação ao número inicial de insetos.

Na dosagem de 10 μg , não foi observada letalidade. No entanto, essa dose provocou uma alteração relevante na proporção de insetos nas fases mais adiantadas do ciclo de vida, quando comparada aos controles, observável a partir do 3^o dia. Como a ração de peixes contendo o Jaburetox-V5 somente foi oferecida no início do ensaio,

uma possibilidade que poderia explicar esse fato é que a preparação de células liofilizadas tenha se multiplicado em contacto com a água. Como a expressão do Jaburetox-V5 é induzida, o crescimento bacteriano não seria acompanhado de produção de mais peptídeo, servindo agora apenas como um reforço protéico para a ração. Outra hipótese seria que o efeito do estresse do peptídeo a ser investigado posteriormente.

A alta mortalidade das larvas com a dose de 100 µg de Jaburetox-V5 já no 1º dia de observação é um resultado de grande interesse. A dengue, transmitida pelo *A. aegypti*, ainda é uma doença com alta letalidade e o combate ainda na fase larval do inseto seria muito vantajosa, principalmente domiciliarmente. Pretendemos agora otimizar do uso de células bacterianas ou leveduras carregadas com Jaburetox-V5 como um potencial produto bioinseticida.

Parte II- Análise da influência do epitopo V5 na formação de agregados

4.3 Análise de agregados

Após as diálises para ajustes das condições de pH e sais, amostras da solução de peptídeo foram armazenadas a 4°C e -20°C. Semanalmente foram realizadas SDS-PAGES para o acompanhamento do grau de agregação dos peptídeos, ilustrados nas Figuras 13 a 16.

Duas considerações são importantes para a análise dos resultados:

1) A purificação e a resolução em SDS-PAGE do Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5 foram feitas em momentos diferentes, por isso há diferença na visualização dos agregados dos peptídeos. No caso do Jaburetox-2Ec, o gel foi corado com Coomassie Blue coloidal, e para o Jaburetox-V5, utilizou-se Coomassie Blue convencional. Os resultados indicaram que o Coomassie Blue coloidal mostrou ser mais adequado como

corante. Ainda assim, foi possível realizar a análise comparativa de agregação dos dois peptídeos.

2) O objetivo do tratamento das amostras, antes da eletroforese, por fervura em presença de SDS e agentes redutores, é descomplexar agregados proteicos até se obter as formas monoméricas dos polipeptídeos. Nas condições do presente estudo, essa descomplexação não foi completa, para que fosse possível observar os agregados, e assim, permitir identificar os fatores que interferem no processo.

Na primeira semana (Figura 13 A e B), tanto o Jaburetox-2Ec como o Jaburetox-V5 aparecem na SDS-PAGE majoritariamente como monômeros, embora, no caso do Jaburetox-2Ec, seja possível visualizar agregados, provavelmente por diferença na sensibilidade dos corantes utilizados.

As bandas dos monômeros dos peptídeos ainda são majoritárias após a segunda semana, como pode ser visto na Figura 14 A e B, indicando pouca variação no processo de agregação após esse tempo nas condições de armazenamento e temperatura utilizados. A exceção foi para o Jaburetox-V5 armazenado sob alta força iônica (tampão NaPB a 200 mM, pH 7,5), que precipitou nas duas temperaturas de armazenamento testadas, mais intensamente a 4°C. O desaparecimento das bandas indica que o peptídeo formou agregados maiores do que seria possível penetrar na malha do gel de poliacrilamida a 15% utilizado no SDS-PAGE, eventualmente chegando a precipitar, saindo da solução.

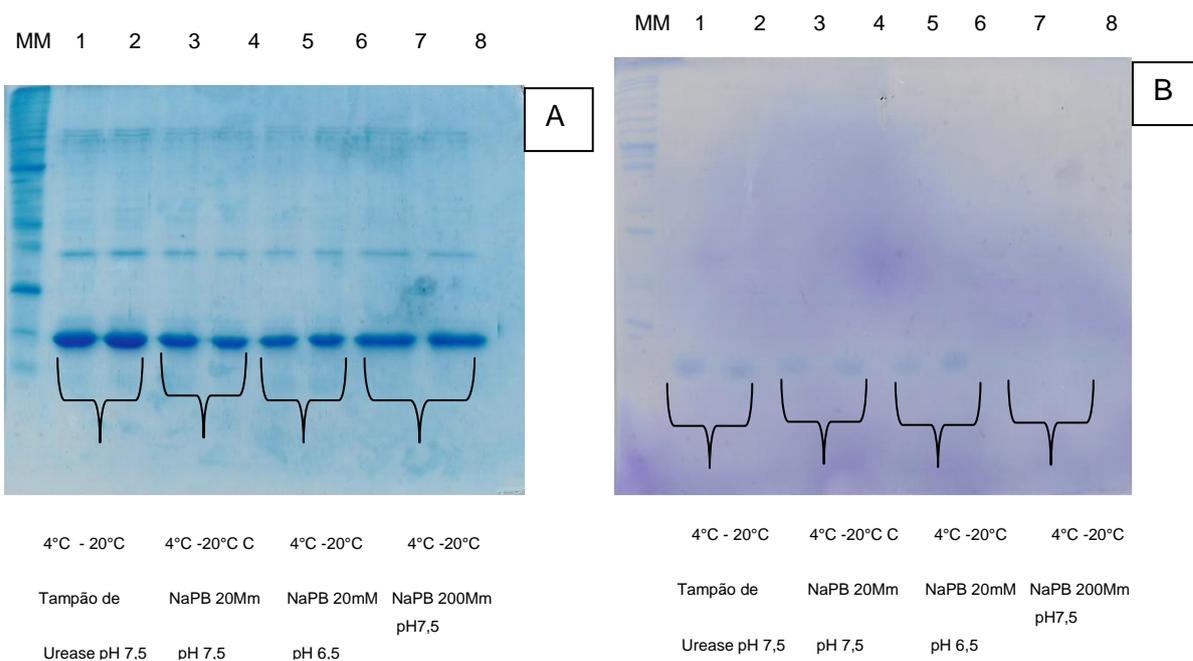


Figura 13. Análise em SDS-PAGE a 15% após uma semana de armazenamento **A)** Jaburetox-2Ec, e **B)** Jaburetox-V5. **MM** marcador molecular. **1 e 2.** Amostra em tampão de urease pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente **3 e 4.** Amostra em NaPB 20 mM pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente **5 e 6** Amostra em NaPB 20 mM pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente **7 e 8.** Amostra em NaPB 200 mM pH 7,5 a 4°C e -20°C, respectivamente

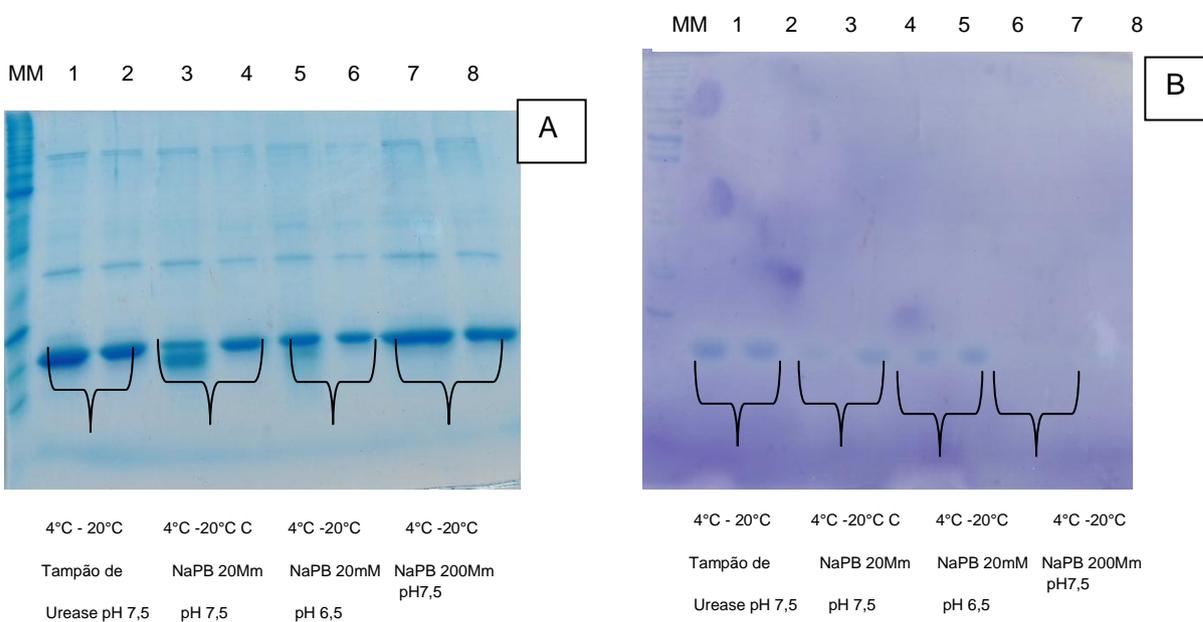


Figura 14. Análise em SDS-PAGE a 15% após duas semanas de armazenamento. **A)** Jaburetox-2Ec, e **B)** Jaburetox-V5, **MM** marcador molecular. **1 e 2.** Amostra em tampão de urease pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente **3 e 4.** Amostra em NaPB 20 mM pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente **5 e 6** Amostra em NaPB 20 mM pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente **7 e 8.** Amostra em NaPB 200 mM pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente.

Ao completar três semanas de armazenamento (Figura 15 A e B), o processo de agregação está bastante adiantado, tanto para o Jaburetox-2Ec como para o Jaburetox-V5, resultando no desaparecimento da banda dos monômeros na SDS-PAGE.

É possível verificar que o Jaburetox-2Ec (Figura 15A) a 4°C em NaPB a 20 mM, pH 6,5 e 7,5 está totalmente agregado, enquanto nas mesmo tampão a -20°C, a agregação foi impedido/retardada, preservando o monômero. Contrastando com o comportamento do Jaburetox-V5 desde as primeiras 2 semanas, o aumento da força iônica (NaPB a 200 mM), em pH 7,5, também protegeu o peptídeo contendo o epitopo V5, preservando o monômero em solução por 3 semanas, mesmo a 4°C. O Jaburetox-V5 (Fig 15B) agregou em NaPB a 20 mM, pH 7,5 e pH 6,5, somente a 4°C, e em ambas as temperaturas em NaPB a 200 mM (mais intensamente a 4°C). Ao contrário ao observado para o Jaburetox-2Ec, a ausência do epitopo V5 protegeu contra precipitação em pH 6,5 a 4°C.

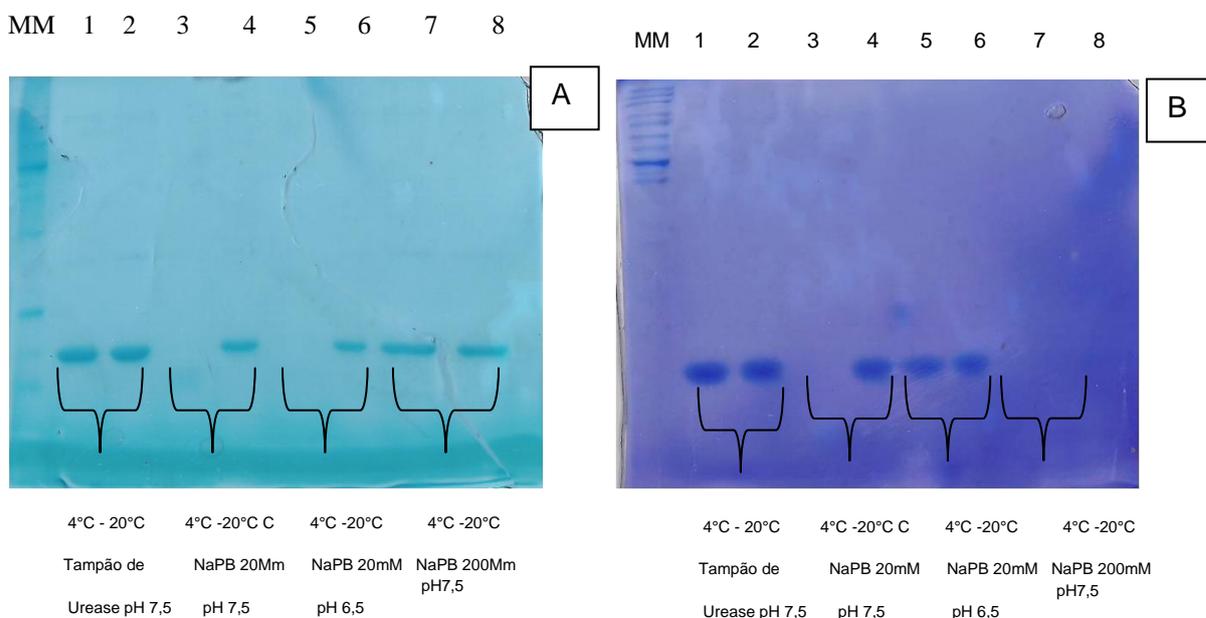


Figura 15. Análise em SDS-PAGE a 15% do após três semanas de armazenamento. **A)** Jaburetox-2Ec, e **B)** Jaburetox-V5 MM marcador molecular. **1 e 2.** Amostra em tampão de urease pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente; **3 e 4.** Amostra em NaPB 20 mM pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente; **5 e 6** Amostra em NaPB 20 mM pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente; **7 e 8.** Amostra em NaPB 200 mM pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente

Na última semana de observação, com 4 semanas de armazenamento, o Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5 repetiram os padrões de agregação verificados (Fig 16 A e B). Dessa vez, a banda majoritária do Jaburetox-V5 armazenado em NaPB 200 mM a -20°C é mais visível do que nos outros géis, por ter sido utilizado um corante recém-preparado.

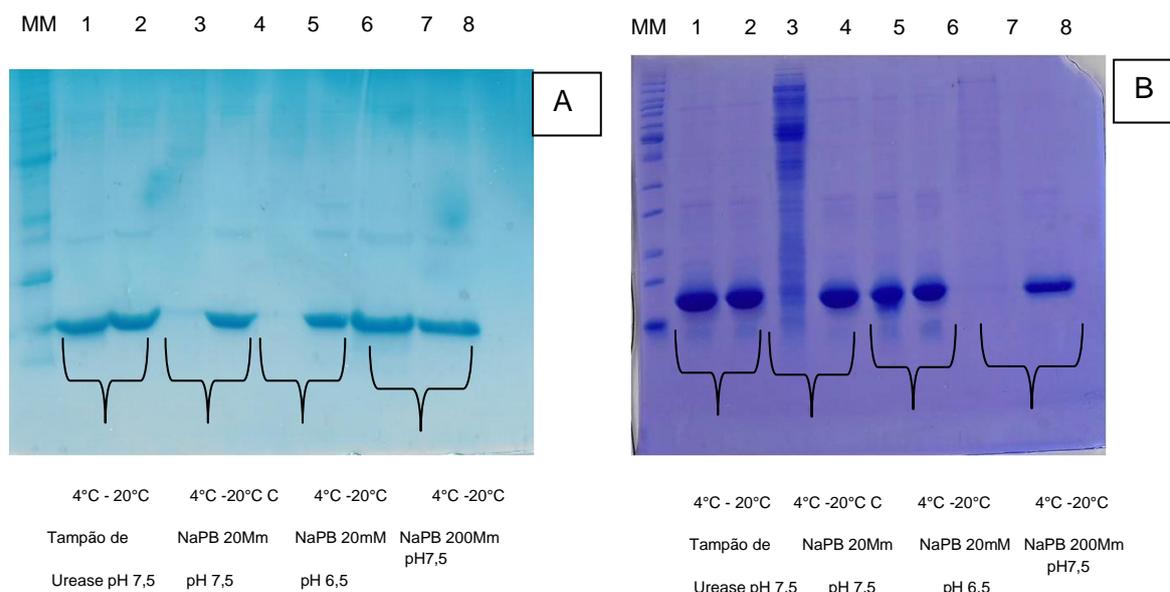


Figura 16. Análise em SDS-PAGE a 15% na quarta semana de armazenamento. **A)** Jaburetox-2Ec **B)** Jaburetox-V5 **MM** marcador molecular. **1 e 2.** Amostra em tampão de uréase pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente **3 e 4.** Amostra em NaPB 20 mM pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente **5 e 6** Amostra em NaPB 20 mM pH 7,5 a 4°C e -20°C respectivamente **7 e 8.** Amostra em NaPB 200 mM pH 7,5 a 4°C e -20°C.

Os resultados após essas 4 semanas demonstraram que a melhor condição de armazenamento de ambos os peptídeos é no tampão de urease, que contém 20 mM de NaPB, pH 7,5, 5 mM de β -mercaptoetanol, 1 mM de EDTA. A presença do agente redutor e/ou do EDTA protegeu os peptídeos de precipitação a 4°C, quando comparado apenas ao 20 mM de NaPB. Apesar de não conter pontes dissulfeto e não evitar sozinho o processo de agregação, um efeito protetor parcial do β -mercaptoetanol para o peptídeo Jaburetox-2Ec foi previamente descrito por Barros *et al.* (2009). A melhor temperatura

de armazenamento de ambos os peptídeos foi de -20°C . Observar que nesse trabalho não foi investigado o efeito de ciclos de congelamento-descongelamento, pois amostras individuais foram preparadas para cada tempo de armazenamento.

Por outro lado, foi possível observar que o epítipo V5 influencia a tendência de agregação dos peptídeos, conforme ilustrado na tabela abaixo:

Tabela 1: Efeito do pH, da força iônica e da temperatura de armazenamento por 4 semanas na agregação/precipitação dos peptídeos Jaburetox-2Ec e Jaburetox-V5. As células sombreadas na tabela indicam a presença de agregados e/ou desaparecimento da banda do monômero em SDS-PAGE a 15% após 3-4 semanas de armazenamento.

Peptídeo	NaPB 20 mM pH 7,5		NaPB 20 mM pH 6,5		NaPB 200 mM pH 7,5	
	4°C	-20°C	4°C	-20°C	4°C	-20°C
	Jaburetox-2Ec					
Jaburetox-V5						

Assim, a ausência do epítipo V5 diminui a solubilidade do peptídeo em alta força iônica, provavelmente por conter, numa sequência de 26 aminoácidos, 17 resíduos com cadeias laterais hidrofílicas neutras ou carregadas, resultando num aumento de hidrofobicidade do Jaburetox-V5 em relação ao -2Ec. Por outro lado, o epítipo V5 aumenta a solubilidade do Jaburetox-V5 em pH 6,5, de acordo com a mudança do ponto isoelétrico teórico de 5,08 para 4,92.

5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

5.1 Conclusões

Nesse trabalho, foi testada a atividade inseticida de *E. coli* liofilizadas carregadas com o peptídeo Jaburetox-V5. Entre os três insetos modelos e nas concentrações testadas, observamos uma alta letalidade para larvas de *Aedes aegypti*, evidenciando o potencial biotecnológico dessa abordagem experimental. Um desdobramento possível desses resultados seria o desenvolvimento de liofilizados de células expressando o peptídeo inseticida para controle de focos de mosquitos em corpos de água, aplicação domésticas, etc.

Por outro lado, observamos ausência de efeitos entomotóxicos para os insetos fitófagos *D. peruvianus* e *S. frugiperda*. Como descrito anteriormente, o Jaburetox-2Ec purificado e administrado por v.o apresentou alta toxicidade a *D. peruvianus* e *S. frugiperda* nas doses de 0,01% (m/m). Considerando as condições experimentais utilizadas nesse trabalho, é possível descartar a possibilidade de utilização de células liofilizadas carregadas com Jaburetox como uma metodologia eficiente para controle de insetos sugadores, como é o caso do *D. peruvianus*, devido às características do aparelho sugador e do seu modo de alimentação. Por outro lado, outras abordagens experimentais deverão ser aplicadas para o caso de lagartas, como a *S. frugiperda*, devendo-se testar a suspensão de bactérias aplicada diretamente sobre folhas, evitando o emprego de dietas artificiais, para se aproximar mais de uma situação a campo.

Em relação à formação dos agregados dos peptídeos, os resultados possibilitaram estabelecer condições preferenciais de pH, força iônica e temperatura para armazenamento a longo prazo que protegem os peptídeos contra a agregação/inativação. Os resultados mostraram ainda que o epitopo V5, presente no

Jaburetox-2Ec e ausente no Jaburetox-V5, é um determinante importante nesse processo, alterando a tendência de agregação em pH mais ácido e conforme a força iônica do meio. Os resultados possibilitaram, assim, definir condições apropriadas para armazenagem dos dois peptídeos.

5.2 Perspectivas

Quanto à utilização de células carregadas com o Jaburetox-V5 como biopesticida:

- Realizar curvas dose-efeito em larvas *A. aegypti* e testar variedades do mosquito resistentes a diferente inseticidas;
- Testar liofilizados contra outros insetos modelos como *Rhodnius prolixus* e *Drosophila melanogaster*, bem como o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus*.

Quanto aos estudos de estabilidade do peptídeo Jaburetox-V5:

- Testar atividade biológica dos peptídeos purificados que não agregaram em SDS-PAGE após quatro semanas, para confirmar se eles continuam bioativos contra insetos.
- Testar outras condições de armazenamento e outros potenciais agentes estabilizadores.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDREWS, R.K.; BLAKELEY, R.L.; ZERNER, B. Urea and urease. **Adv. Inorg. Biochem.**, v.6, p.245-283, 1984.

BAILEY, K.L.; BOYETCHKO.S.M.; LÄNGLE, T. Social and economic drivers shaping the future of biological control: A canadian perspective on the factors affecting the development and use of microbial biopesticides. **Biological Control**, v. 52, p.221-229, 2010.

BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J.A.; CARLINI, C.R. Lipoxygenase-mediated secretory effect of canatoxin, the toxic protein from *Canavalia ensiformis* seed. **Toxicon**, v. 29, p. 453-459, 1991.

BARROS, P.R.; STANSEN, H.; FREITAS, M.S; CARLINI, C.R; NASCIMENTO, M.A; FOLMER, C. Membrane-disruptive properties of the bioinsecticide Jaburetox-2Ec: Implications to the mechanism of the action of insecticidal peptides derived from ureases. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1794 (12), p.1848-1854, 2009.

BECKER-RITT, A.B.; MARTINELLI, A.H.; MITIDIERI, S., FEDER, V.; WASSERMANN, G.E.; SANTI, L.; VAINSTEIN, M.H.; OLIVEIRA, J.T.A.; PASQUALI, G.; CARLINI, C.R. Antifungal activity of plant and bacterial ureases. **Toxicon**, v.50, p. 971-983, 2007.

BERTOLDO-VARGAS, L.R.; MARTINS, J.N.; BORDIN, D.; SALVADOR, M.; SCHAFFER, A.E.; BARROS, N.M.; BARBIERI, L.; STIRPE, F.; CARLINI, C.R. Type 1 ribosome-inactivating protein-Entomotoxic, oxidative and genotoxic action on *Anticarsia gemmatilis*(Hübner) and *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **J. Insect Physiol.**, v.55, p.51-58 , 2008.

CAPINERA, J.L. **Handbook of vegetable pests**. Primeira edição. Academic Press p. 403-407, 2001.

CARLINI, C.R.; FERREIRA-DA SILVA, C.T.; GAMBAROVITS, M.C. Peptídeo entomotóxico da Canatoxina: Processo de produção. Instituto Nacional de Propriedade Industrial Patente industrial n° 0003334-0 Rio de Janeiro, Brasil, 2000.

CARLINI, C.R.; GOMES, C. B.; GUIMARÃES, J.A.; MARKUS, R. P.; SATO, H.; TROLIN, G.. Central nervous effects of the convulsant protein canatoxin. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v.54, p.161-166, 1984.

CARLINI, C. R.; GUIMARÃES, J.A. Characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (Jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, v.19, p.667-675, 1981.

CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. Plant and microbial toxic proteins as hemilectins: emphasis on canatoxin. **Toxicon**, v.29, p.791-806, 1991.

CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A.; RIBEIRO, J.M. Platelet release reaction and aggregation induced by canatoxin, a convulsant protein: evidence for the involvement of the platelet prostanoid pathway. **Br J. Pharmacol.**, v. 84, p. 551-560, 1985.

CARLINI, CR; OLIVEIRA, A.E.; AZAMBUJA, P.; XAVIER-FILHO, J.; WELLS, M.A. Biological effects of canatoxin in different insect by insect cathepsin-like enzymes. **J. Econ. Entomol.**, v.90, p. 340-348, 1997.

CARLINI, C. R.; UDEDIBIE, A. B. I. Comparative effects of processing methods on hemagglutinating and antitryptic activities of *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* seeds. **J. Agric. Food Chem**, v.45: 4372-4377,1997.

CRUZ, I. A lagarta-do-cartucho na cultura do milho. Sete Lagoas. EMBRAPA. **Circular técnico**, v.21, p. 45, 1995.

CRUZ, I.; MONTEIRO, M.A.R. Controle Biológico da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, utilizando o parasitóide de ovos *Trichogramma pretiosum*. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, n.98, 2004.

DEVINE, G.J.; FURLONG, M.J. Insecticide use: contexts and ecological consequences. **Agr. Hum.**, v.24, p.281-306, 2007.

DIXON, N.E.; GAZZOLATC, BLAKELEY, R.L.; ZERMER, B. Jack bean Urease (EC 3.5.1.5). a metalloenzyme. A simple biological role for nickel? **J Am chem. Soc**, v.97, p.4131-4133, 1975.

FERREIRA-DASILVA, C.T; GOMBAROVITS, M.E.C.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, C;M; CARLINI, C.R. Proteolytic activation of canatoxin, q plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Arch. Insect Biochem Physiol**, v.44, p.162-171, 2000.

FOLLMER, C.; BARCELLOS, G.B.S.; ZINGALI, R.B.; MACHADO, O.L.T.; ALVES, E.W.; BARJA-FIDALGO, C.; GUIMARÃES, J.A.; CARLINI, C.R. Canatoxin, a toxic protein of Jack bean urease (*Canavalia ensiformis*), is a variant from urease (EC 3.5.1.5). Biological effects of independent of its ureolytic activity. **Biochem J**, v.360, p.217-224, 2001.

FOLLMER, C.; PEREIRA, F.V.; DASILVA, N.P.; CARLINI, C.R. Jack bean urease (EC 3.5.1.5) aggregation monitored by dynamic static scattering. **Biophys. Chem.**, v.111, p.79-87, 2004.

GALLO, D. **Manual de Entomologia Agrícola**. Segunda edição CERES. São Paulo p. 649, 1988.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA-NETO, S.; CARVALHO, R.P.L.; BAPTISTA, G.C.; BERTI-FILHO, E.; PARVA, J.R.; ZUCCHI, R.A.; ALVES, S.B.; VENDRAMIN, J.D.; MARCHINI, L.C.; LOPES, J.R.S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola**, Piracicaba p. 920, 2002.

GATEHOUSE, J.A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytologist**, v.156 , p. 145-169, 2002.

GREENE,G.L., LEPPLA,N.C.; DICKERSON,W.A. Velvetbeans caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. **J. Econ. Entomol.**, v.69, p.487-488, 1976.

MARTINELLI, A. H. S.; KAPPAUN, K. ; MULINARI, F. ; STANISCUASKI, F. ; BECKER-RITT, A.B. ; BERTHOLDO-VARGAS, L.R. ; PASQUALI, G. ; CARLINI, C. R. . Jaburetox-2EC, a Recombinant Urease-Derived Insecticidal Peptide: Site-Directed Mutagenesis Studies. **XXXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular**, 2009.

MILANO, P.; CÔNSOLI, F.L.; ZÉRIO, N.G.; PARRA, J.R.P. Exigências térmicas de *Dysdercus peruvianus* Guérin-Méneville (Heteroptera: Pyrrhocoridae), o percevejo manchador do algodoeiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 28 p. 233 e 238, 1999.

MOBLEY, H.L.; HAUSINGER, P.P. Microbial ureases: significance, regulation and molecular characterization. **Microbiol. Rev.** v.53 ,p. 85-108, 1989.

MULINARI, F.; BECKER-RITT, A.B.; DEMARTINI, D.R.; LIGABUE-BRAUN, R.; STANISCUASKI, F.; VERLI, H.; FRAGOSO, R.R.; SCHOROEDER, E.K; CARLINI, C.R.; GROSSI-DE-SÁ, M.F. Characterization of JBUREII isoform of *Canavalia ensiformis* (L.) DC urease. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1814, p. 1758-1768, 2011.

MULINARI, F.; STANISÇUASKI, F.; BERTHOLDO-VARGAS, L.R.; POSTAL, M.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; RIGDEN, D.J.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; CARLINI, C.R. Jaburetox-2Ec: an insecticidal peptide derived from an isoform of urease from the plant *Canavalia ensiformis*. **Peptides**, v 28, p.2042-50, 2007.

NEVES, D.P. **Parasitologia Dinâmica**. Terceira edição. São Paulo: Atheneu, 2009.

OLIVEIRA, A.E.A.; GOMES, V.M.; SALES, M.P.; FERNANDES, K.V.S.; CARLINI, C.R. AND XAVIER-FILHO, J. The toxicity of jack bean [*Canavalia ensiformis*(L.) DC.] Canatoxin to plant pathogenic fungi. **Rev. Brasil. Biol**, v.59, p.59-62, 1999.

OLIVERA-SEVERO, D.; WASSERMANN, G.E.; CARLINI, C.R. Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria? **Braz J of Med Biol Res**, v.39, p.851-861, 2006.

PIRES-ALVES, M.; GROSSI-DE-SÁ, M.F.; BARCELLOS, G.B.; CARLINI, C.R.; MORAES, M.G. Characterization and expression of a novel member (JBURE-II) of the urease gene family from jackbean (*Canavalia ensidormis* (L.)). **Plant Cell Physiol.**, v.44, p.130-145, 2003.

STANISÇUASKI,F.; BRUGGE,VT.; CARLINI, C.R.; ORCHARD, I. *In vitro* effect of *Canavalia ensiformis* urease and the derived peptide Jaburetox-2Ec in *Rodnius prolixus* Malpighian tubules. **J Insect Physiol**, v.55, p. 255-263, 2008.

STANISÇUASKI, F.; FERREIRA-DASILVA, C.T; MULINARI, F.; PIRES-ALVES M; CARLINI, C.R. Insecticidal effects of canatoxin on cotton stainer bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**, v.45, p. 753-60, 2005.

SUMNER, J.B. The isolation and crystallization of the enzyme urease. **J Biol Chem.**, v.69, p.435-441, 1926.

SUMNER, J.B; HOWELL, S. F. Identification of the hemagglutinin of jack bean with concanavalin A. **J. Bacteriol.**, V.32, p. 227-240, 1936.

TAUIL, P.L. O desafio do controle do *Aedes aegypti* e da assistência adequada ao dengue. **Epidemiol. Serv Saúde**, v.16, p.153-154, 2001.

THAKORE, Y. The biopesticide market for global agricultural use. **Indust Biotech**, v.2, p.194-208, 2006.

VALICENTE, F.H.; TUELHER.E.S. Controle biológico da lagarta do cartucho, *Spodoptera frugiperda* com baculovírus. **Circular técnica EMBRAPA**, v.114- Sete lagoas, MG, 2009.