

## Inhibidores de proteasas de plantas efectivos contra las aspártico proteasas de *Hypothenemus hampei*

Plant protease inhibitors effective against aspartic proteases from Coffee Berry Borer (*Hypothenemus hampei*)

DIANA MOLINA V<sup>1</sup>, ALEJANDRO BLANCO-LABRA<sup>2</sup> y HUMBERTO ZAMORA E.<sup>3</sup>

**Resumen:** La broca del café (*Hypothenemus hampei*), produce las pérdidas económicas más graves al cultivo de café (*Coffea arabica*). En extractos proteínicos de insectos adultos se identificaron aspártico proteasas las cuales mostraron dos bandas de actividad proteolítica en los zimogramas y una actividad máxima a pH 2,5 en los ensayos espectrofotométricos. Esta enzima se clasificó como cathepsina D considerando su inhibición por pepstatina A y la hidrólisis de hemoglobina. Para encontrar inhibidores de las aspártico proteasas de *H. hampei*, se evaluaron extractos proteínicos de semillas de plantas no-huésped como: *Lupinus bogotensis*, *Brachiaria humidicola*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus coccineus*, *Hyptis suaveolens*, *Centrosema pubescens* y *Trifolium repens*. El extracto proteínico de *L. bogotensis* produjo la mayor inhibición de las aspártico proteasas con una actividad específica de 74,1 UI/mg; en comparación con los extractos de *H. suaveolens*, *B. humidicola* y *A. hypochondriacus* que presentaron una inhibición menor de las aspártico proteasas. Los demás extractos proteínicos no inhibieron la actividad aspártico proteasa. La actividad proteolítica de *H. hampei* se inhibió en un 90% con 100 µg del extracto crudo de *L. bogotensis*, mientras que se necesitó 1 mg de extracto crudo de *H. suaveolens* y *B. humidicola* para inhibir la actividad en 70 y 60%, respectivamente. Los zimogramas identificaron posibles inhibidores de proteasas en los extractos de *L. bogotensis*, *H. suaveolens*, *B. humidicola* y *A. hypochondriacus* que bloquearon *in vitro* la actividad de las aspártico proteasas del insecto. La expresión de genes de inhibidores de proteasas en café es una alternativa para obtener variedades resistentes.

**Palabras clave:** *Lupinus bogotensis*. Leguminosae. Inhibidor de aspártico proteasa. Aspártico proteasa. *Hypothenemus hampei*.

**Abstract:** The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, is one of the most devastating coffee pests (*Coffea arabica*). Aspartic proteases were identified in protein extracts of adult insects, showing two bands of proteolytic activity in zymograms and a maximum activity at pH 2.5 in the spectrophotometric assays. Considering its inhibition by pepstatin A and hemoglobin hydrolysis this enzyme was classified as cathepsin D. Seeds extracts of *Lupinus bogotensis*, *Brachiaria humidicola*, *Amaranthus hypochondriacus*, *Phaseolus acutifolius*, *Phaseolus coccineus*, *Hyptis suaveolens*, *Centrosema pubescens*, and *Trifolium repens* were evaluated to identify aspartic protease inhibitors. The greatest inhibitory activity of aspartic proteases was found in *L. bogotensis* extract with a specific activity of 74.1 IU/mg, compared with extracts of *H. suaveolens*, *B. humidicola*, and *A. hypochondriacus* that showed a lower inhibition of aspartic proteases. Other protein extracts did not inhibit aspartic protease activity. The proteolytic activity of *H. hampei* was inhibited by 90% with 100 µg of crude extract of *L. bogotensis*, whereas it took 1 mg of crude extract of *H. suaveolens* and *B. humidicola* to inhibit the activity at 70 and 60% respectively. The zymograms identified potential protease inhibitors in extracts of *L. bogotensis*, *H. suaveolens*, *B. humidicola* and *A. hypochondriacus* that blocked *in vitro* activity of aspartic proteases of the insect. The expression of protease inhibitor genes in coffee is an alternative to obtain resistant varieties.

**Key words:** *Lupinus bogotensis*. Leguminosae. Aspartic protease inhibitor. Aspartic protease. *Hypothenemus hampei*.

### Introducción

El café (*Coffea* spp., Rubiaceae) es el producto agrícola más importante en 70 países de la región tropical húmeda (Jaramillo *et al.* 2006). En Colombia, el cultivo de café representa el 12,4 % del producto interno bruto agropecuario (MADR-IICA-OAC 2008). La broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Curculionidae) es el insecto plaga que causa las mayores pérdidas económicas al café; debido a que se alimenta del endospermo disminuyendo el rendimiento y alterando la calidad del grano (Duque y Baker 2003; Bustillo 2008).

Muchos caficultores controlan *H. hampei* con insecticidas como endosulfán, clorpirifos, pirimifos metil y fenitrotion (Villalba *et al.* 1995). La creciente preocupación ambiental y el incremento de la resistencia de *H. hampei* a los insecti-

cidas (Navarro *et al.* 2010), han estimulado la búsqueda de estrategias de control amigables con el ambiente (Jaramillo *et al.* 2006). Entre estas estrategias, diversas proteínas vegetales tienen potencial para el control de insectos incluyendo las lectinas, los inhibidores de proteasas (IPs), los inhibidores de  $\alpha$ -amilasas y las proteínas de almacenamiento de las semillas, vicilinas, leguminas y arcelinas (Macedo *et al.* 2007; Prasad *et al.* 2010; Barbosa *et al.* 2010; Sales *et al.* 2005).

La habilidad de los IPs para interferir con el crecimiento y desarrollo de insectos se atribuye a su capacidad para impedir el acceso al sustrato, reduciendo la disponibilidad de aminoácidos de las proteínas ingeridas Ryan (1990); y en algunos casos ocasionando la muerte, como el inhibidor de tripsina Kunitz de soja sobre el coleóptero *Anthonomus grandis* Boheman, 1843 (Franco *et al.* 2004). Los IPs se clasifican según la enzima digestiva con la que interactúan en

<sup>1</sup> Investigador Científico Ph.D. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), Disciplina de Mejoramiento genético, Plan Alto Km. 4 - vía antigua a Manizales, Chinchiná, Caldas, Colombia. [Diana.molina@cafedecolombia.com](mailto:Diana.molina@cafedecolombia.com). Autor para correspondencia. <sup>2</sup> Investigador titular Ph.D. Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (Cinvestav) Unidad Irapuato, Km 9.6 Libramiento Norte, Carretera Irapuato - León, C.P. 36821 Irapuato, Guanajuato, México. [ablanco@ira.cinvestav.mx](mailto:ablanco@ira.cinvestav.mx). <sup>3</sup> Profesor asociado Ph.D. Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, Carrera 30 #45-03, Ciudad universitaria, Bogotá, Cundinamarca, Colombia. [hmzamora@unal.edu.co](mailto:hmzamora@unal.edu.co)

serín, cisteín, aspártico, metalo, glutámico y treonín proteasa (Laskowski *et al.* 2003). Según, Molina *et al.* (2010) la digestión en el intestino medio de *H. hampei* es facilitada por aspártico proteasas activas al pH ácido de esa región corporal (Ossa *et al.* 2000). De acuerdo con esta información, la inhibición de las aspártico proteasas es un mecanismo de defensa promisorio para el control de este coleóptero.

Todas las plantas tienen algún nivel de resistencia endógena al ataque por insectos plaga. Sin embargo, como resultado de la co-evolución los insectos se adaptan a los mecanismos de defensa de las plantas por evasión o detoxificación (Gatehouse 2002). Por ejemplo, los coleópteros se alimentan de leguminosas que tienen un alto contenido de compuestos tóxicos, mientras que otros insectos no utilizan estas semillas como fuente de alimento (Sales *et al.* 2005). Además, los insectos comprometen las estrategias de defensa de las plantas usando sus mecanismos de señalización, es así como *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) emplea las moléculas de señalización, jasmonato y salicilato de las plantas huésped, para activar cuatro de sus genes citocromo P450, facilitando la inducción de sus enzimas de detoxificación de manera rápida y específica (Li *et al.* 2002). Esta asociación es altamente específica, por esto semillas de muy pocas especies sirven de alimento a un insecto particular (Gatehouse 2002).

La co-evolución de *H. hampei* y el género *Coffea* sugiere que es necesario evaluar el efecto de IPs de plantas no huésped como leguminosas y solanáceas, en las cuales se han identificado IPs efectivos contra insectos (Sumikawa *et al.* 2010; Tamhane *et al.* 2007). Recientemente se identificó el primer inhibidor de aspártico proteasa de *Lupinus bogotensis* (LbAPI) que tiene una identidad de 76% con vicilinas de las semillas de *Lupinus albus* (Linnaeus, 1753). Esto sugiere que los IPs de aspártico proteasas son proteínas multifuncionales que actúan como proteínas de almacenamiento de las semillas, inhiben aspártico proteasas, y también pueden unirse a las estructuras que contienen quitina en el intestino medio de coleópteros como *H. hampei* (Molina *et al.* 2010). Sin embargo, para conseguir resistencia durable contra un insecto es necesario utilizar varios IPs, por esto el objetivo de este trabajo es la identificación de inhibidores de las aspártico proteasas en plantas no huésped y sus variaciones en especificidad contra las proteasas digestivas de *H. hampei*.

### Materiales y Métodos

**Materiales.** Se evaluaron semillas de cinco plantas de la familia Fabaceae: *L. bogotensis* (Benth, 1845), *Centrosema pubescens* (Benth, 1839), *Trifolium repens* (Linnaeus, 1753), *Phaseolus acutifolius* (Gray, 1852) y *Phaseolus coccineus* (Linnaeus, 1753) y de una planta de la familia Poaceae: *Brachiaria humidicola*; estas semillas se adquirieron en la empresa Semicol (Bogotá, Colombia). También se probaron semillas de una Amaranthaceae: *Amaranthus hypochondriacus* (Linnaeus, 1753), y una Lamiaceae: *Hyptis suaveolens* (L., Poit. 1806), suministradas por el Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados (Cinvestav), Irapuato, México.

Los insectos adultos de la broca del café proporcionados por la unidad de cría de Cenicafe (Chinchiná, Colombia), se criaron en café pergamino seco con una humedad de 45% y se mantuvieron bajo condiciones controladas a una temperatura de 27°C con una humedad relativa del 65-75%; los insectos empleados para la extracción estaban recién emergidos de las semillas de café.

Se utilizaron reactivos grado analítico, NaCl, HCl, cloroformo, metanol y ácido acético de Merck (Darmstadt, Germany). La hemoglobina bovina, albúmina sérica bovina (BSA), pepsina (EC 3.4.23.1), pepstatina A, tripsina (EC 3.4.21.4), N  $\alpha$ -benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE), fenilmetilsulfonilo fluoruro (PMSF), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), trans epoxisuccinilo-L-leucilo-amida (4) guanidino butano (E-64), Tris, dodecil sulfato de sodio (SDS), glicerol, casa comercial Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La solución de Bradford, la solución de acrilamida-bis-acrilamida, persulfato de amonio de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). La resina de exclusión Bio-Gel® P-6DG empacada en una columna Econo-Pac® 10DG de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Las membranas de ultrafiltración de 30 kDa (Amicon, Millipore) y el dispositivo de filtración centrífuga Centriprep®, membrana Ultracel YM-3, límite de peso molecular nominal 3 kDa (Amicon, Millipore) (Beverly, MA, USA). Las membranas de diálisis de 3,5 kDa (Spectra/Por®) (Broadwick Street, CA, USA).

**Extracción de las aspártico proteasas de *H. hampei* (APH).** Para la extracción de las aspártico proteasas se maceraron 100 g de insectos adultos en 0,2 M de búfer succínico pH 6,0 en una relación 1:5 p/v a 4°C. El homogeneizado se centrifugó a 9.500 g por 15 min a 4°C. El sobrenadante se dializó tres veces cada seis horas contra 5 l de H<sub>2</sub>O con 100 ml de búfer succínico 50 mM pH 6,0 utilizando una membrana de 3,5 kDa (Spectra/Por®), el dializado se liofilizó y se utilizó como fuente de aspártico proteasas.

**Ensayos de actividad inhibitoria.** La actividad proteolítica de las aspártico proteasas de *H. hampei* y pepsina se determinó evaluando la hidrólisis de hemoglobina a 280 nm en 0,2 M de búfer citrato, 0,1 M NaCl pH 2,5 (Lenney 1975). El extracto proteínico se incubó con 1,3 ml de hemoglobina al 1% como sustrato. Después de dos horas se adicionaron 2,5 ml de Cl<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H 0,34 N para detener la reacción. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza un incremento en 0,01 unidades de absorbancia. El inhibidor se incubó con el extracto proteínico de *H. hampei* durante 15 min (Lenney 1975). Una unidad de inhibición se definió como la diferencia entre las actividades proteolíticas medidas en ausencia y presencia del inhibidor. Las variables medidas fueron: las unidades de inhibición por ml de extracto (UI ml<sup>-1</sup>), las unidades de inhibición por gramo de tejido (UI g<sup>-1</sup>), las unidades de inhibición totales (UI) y la actividad específica, unidades de inhibición por miligramo de tejido (UI mg<sup>-1</sup>). Se evaluó la inhibición de las aspártico proteasas por E-64 (Oliveira *et al.* 2002); EDTA; PMSF (Schwartz y Takenaka 1955) y pepstatina A (Lenney 1975). Una concentración final de 1  $\mu$ M se utilizó para todos los inhibidores con la excepción de pepstatina A, el cual se usó en una concentración final de 1  $\mu$ M.

**Electroforesis en gel de poliacrilamida.** La electroforesis en gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) se realizó según Schagger y von Jagow (1987). Las proteínas usadas como estándar de peso molecular fueron: miosina (210 kDa),  $\beta$ -galactosidasa (118 kDa), BSA (82 kDa), anhidrasa carbónica (40 kDa), inhibidor tripsina de soya (31 kDa), lisozima (17 kDa) y aprotinina (6 kDa). Las proteínas se detectaron por tinción con 0,1% de azul de Coomassie brillante G-250 por 30 min y la destinción se realizó con AcOH:H<sub>2</sub>O (1:9, v/v) por 1 h.

**Zimogramas.** Para el zimograma de actividad proteolítica 20 mg de extracto proteínico del intestino medio de *H. hampei* se separaron en un gel nativo al 10%. El gel se incubó en una solución de hemoglobina al 1% en 0,2 M de búfer citrato pH 2,5 durante 1 h a 4°C. Después, se retiró el exceso de sustrato y el gel se incubó durante 4 h a 30°C. Finalmente, el gel se tiñó con azul de Coomassie durante 30 min, y se destiñó con AcOH:H<sub>2</sub>O (1:9, v/v) por 1 h.

En el zimograma de inhibición se preincubaron 20 µg de extracto proteínico del intestino medio de *H. hampei* con 40 µg de los extractos de las semillas de *L. bogotensis*, *A. hypochondriacus*, *B. humicola* e *H. suaveolens* durante 30 min a 30°C. Después, se siguió el mismo procedimiento descrito en el zimograma de actividad proteolítica.

Para el zimograma del inhibidor, los extractos crudos de las semillas se separaron por SDS-PAGE. El gel se incubó en una solución de 1% de hemoglobina bovina en 0,2 M de búfer citrato pH 2,5 durante 1 h a 4°C. Luego, el gel se lavó con H<sub>2</sub>O desionizada y se incubó en una solución con 10 mg/ml de extracto proteínico de *H. hampei*, durante 4 h a 30°C. Finalmente, el gel se tiñó con azul de Coomassie durante 30 min, y se destiñó con AcOH:H<sub>2</sub>O (1:9, v/v) por 1 h. Los inhibidores de aspártico proteasas se observaron como bandas azules sobre fondo claro, porque las aspártico proteasas digieren la hemoglobina presente en el gel, a excepción del lugar donde la banda (inhibidor) está localizado.

**Actividad de APH en función del pH.** Para determinar la actividad de las aspártico proteasas en función del pH, el extracto crudo de adultos de *H. hampei* (1 mg/ml) se incubó 30 min a 37°C con diferentes búfer (100 mM): citrato de sodio (pH 2 - 4), acetato de sodio (pH 5), fosfato de sodio (pH 6-7), Tris-HCl (pH 7,5). Después, se ajustó el pH a 2,5 para evaluar la actividad inhibidora contra las aspártico proteasas de *H. hampei* según Lenney (1975). Los resultados representan el promedio de tres pruebas independientes.

**Identificación de los inhibidores de aspártico proteasas (IAP) en las semillas.** Para la identificación de los IAP se realizaron ensayos enzimáticos y zimogramas. 200 g de las semillas secas se molieron en un molino criogénico marca Restch, la harina se tamizó a través de dos mallas de 1,4 mm y 0,85 mm en un separador estándar. La fracción más fina (150 g) se desgrasó en agitación durante 30 min en una mezcla de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (750 ml, 4:1, v/v); este proceso se repitió tres veces. La extracción de proteínas a partir de harina seca (100 g) se realizó en H<sub>2</sub>O (500 ml) o 0,2 M de búfer succínico pH 4,5 por 6 h a 4°C. Con todas las semillas se utilizó una relación 1:5, p/v a excepción de *T. repens* con una relación de 1:10, p/v. La suspensión se clarificó por centrifugación a 7.500 g por 30 min a 4°C. El precipitado se descartó y la suspensión liofilizada de los extractos de las semillas se adicionaron a una columna de exclusión por tamaño Econo-Pac® 10DG, empacada con Bio-Gel P-6DG para eliminar pigmentos (Molina *et al.* 2010). La proteína del extracto proteínico se precipitó con 80% de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. El precipitado se disolvió en búfer Tris-HCl 20 mM pH 8,0, se dializó contra H<sub>2</sub>O desionizada en una membrana de 3,5 kDa (Spectra/Por®) y se liofilizó. Las proteínas liofilizadas se disolvieron en 10 ml de búfer Tris-HCl 20 mM pH 8,0 para fraccionarlas por ultrafiltración con una membrana de 30 kDa. Las fracciones eluidas de la membrana de 30 kDa, que mostraron actividad inhibidora contra las aspártico proteasas de *H. hampei*,

se concentraron utilizando el dispositivo Centriprep®, límite de exclusión 3 kDa y se utilizaron como fuente de inhibidor. Se evaluó la actividad inhibidora de los extractos crudos de las semillas contra *H. hampei* siguiendo el método de Lenney (1975).

**Determinación de proteína.** La concentración de proteína se determinó por el ensayo de Bradford modificado por Zor y Selinger (1996) usando BSA como estándar.

**Análisis estadístico.** Para la determinación de las mejores condiciones de extracción de los IPs se utilizó un experimento multifactorial, los tratamientos evaluaron el empleo o no de desgrase y la extracción con agua o 0,2 M de búfer succínico pH 4,5, se utilizó un diseño experimental completamente al azar y el número de repeticiones 3. Para la identificación de la semilla que produce la mayor inhibición de las aspártico proteasas de *H. hampei* se realizó un experimento unifactorial, se utilizó un diseño experimental completamente al azar y el número de repeticiones 3. La unidad experimental fue un tubo conteniendo las aspártico proteasas de *H. hampei*, el inhibidor de aspártico proteasas, el sustrato y ácido tricloroacético.

A los experimentos se les aplicó un análisis descriptivo: se estimaron el promedio y la varianza para las unidades de inhibición totales (UI). Se comprobó la homogeneidad de varianza y se realizó el análisis de varianza, bajo un diseño completamente al azar. La comparación de medias se realizó mediante prueba de Duncan al 5%. Los datos se procesaron en un computador IBM con el programa SAS versión 9.1.

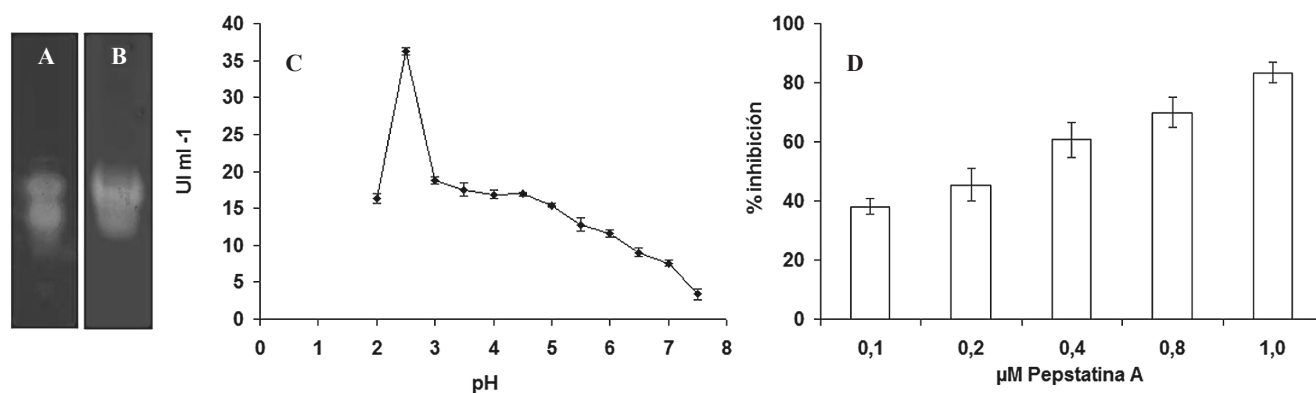
## Resultados

**Zimograma de las APH.** Los zimogramas mostraron dos bandas de actividad aspártico proteasa en los extractos de intestinos (Fig. 1A) y de adultos completos de *H. hampei* (Fig. 1B), resultados similares registró Molina *et al.* (2010). También, Preciado *et al.* (2000) encontraron tres bandas de actividad proteolítica en el intestino medio y en brocas adultas. El hallazgo de actividad aspártico proteasa en el intestino medio confirmó su función digestiva. De acuerdo con estos resultados y considerando que *H. hampei* es de 0,8 a 0,7 mm de longitud (Bergamin 1943), se utilizaron extractos proteínicos de adultos completos, para obtener la cantidad suficiente de enzima para los ensayos de actividad proteolítica y de inhibición.

**Actividad de las APH en función del pH.** Las APH son activas a pH entre 2 a 5, con una actividad máxima a pH 2,5 (Fig. 1C). Una característica particular de este tipo de enzimas es su rango óptimo de actividad a pH entre 2 - 6 (Silva y Xavier-Filho 1991; Blanco *et al.* 1996; Wilhite *et al.* 2000; Liu *et al.* 2004; Valencia y Arboleda 2005), el cual coincide con el pH ácido del intestino medio de *H. hampei* (Ossa *et al.* 2000). La actividad de las APH se evaluó usando como sustrato hemoglobina y BSA, encontrando que las aspártico proteasas digirieron 100% de hemoglobina y 10% de BSA. Esto demostró que estas enzimas digestivas son catépsina D, como previamente registraron Valencia y Arboleda (2005).

**Inhibición de la actividad de las APH por IPs.** Pepstatina A en una concentración de 1 µM inhibió la actividad pro-





**Figura 1.** A. Zimograma del extracto crudo de intestino de *H. hampei* usando un perfil electroforético nativo al 10%. B. Zimograma de extracto crudo de insectos adultos de *H. hampei* usando un perfil nativo al 10%. C. UI ml<sup>-1</sup> de las APH en función del pH. D. Porcentaje de inhibición de la actividad APH en función de la concentración de pepstatina A (μM).

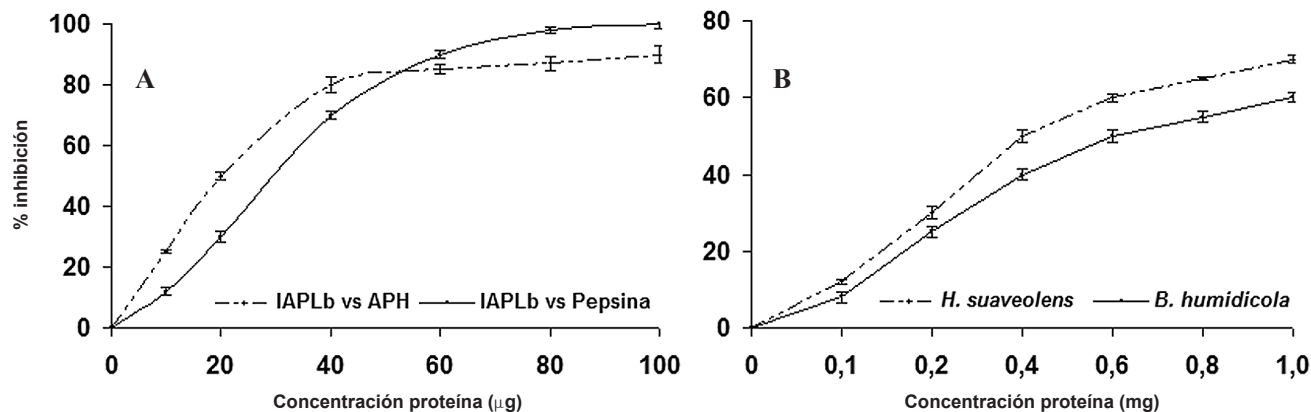
teolítica de *H. hampei* en 83,3% (Fig. 1D), al igual que lo registrado por Valencia y Arboleda (2005). Mientras que los inhibidores de serín proteinasa: PMSF (1mM), cisteín proteinasa: E-64 (1mM) y metaloproteinasa: EDTA (1mM), no inhibieron las enzimas digestivas del insecto. Esto confirmó la presencia de aspártico proteasas en el intestino medio.

**Extracción de los IAP en las semillas de *L. bogotensis* y *B. humidicola*.** El extracto acuoso de *L. bogotensis* con harina desgrasada presentó 8.764 UI y una actividad específica de 97,4 UI mg<sup>-1</sup>, siendo esta inhibición significativamente superior al resto de los tratamientos, según la prueba de Duncan al 5%. Del mismo modo, el extracto acuoso de *B. humidicola* con harina desgrasada mostró la mayor inhibición de las APH con 2.426 UI son miles no decimas (Tabla 1). El empleo de harina desgrasada en la extracción con agua o con búfer succínico 0,2 M pH 4,5, aumentó significativamente la inhibición ( $P<0,0001$ ) de las APH (4.284 UI) en comparación con la harina sin desgrasar (2.572 UI). Esto indica que la grasa interfiere con la determinación de la actividad inhibidora de las APH. La extracción de los IPs fue mejor con agua, obteniéndose una inhibición mayor de las proteasas de *H. hampei* (4.215 UI) que con búfer succínico 0,2 M pH 4,5 (2.641 UI). Con base en estos resultados se seleccionó la extracción de

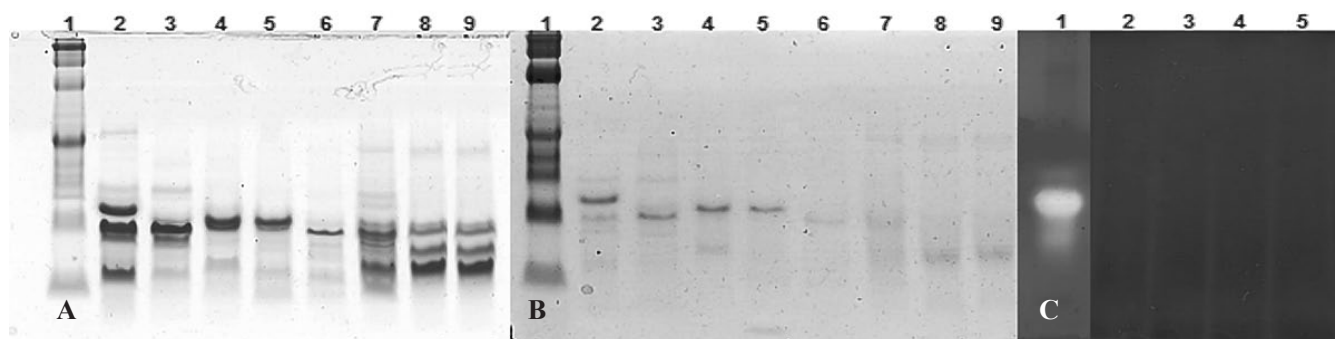
los inhibidores de aspártico proteasas de harina desgrasada y agua en una relación 1:5, p/v.

**Identificación de IAP en los extractos vegetales.** 100 μg del extracto conteniendo los inhibidores de aspártico proteasas de *L. bogotensis* (IAPLb) disminuyeron en 100% y 90% la actividad de pepsina y de las APH, respectivamente (Fig. 2A); mientras que con *B. humidicola* e *H. suaveolens* se requiere 1 mg de extracto crudo para inhibir la actividad de las APH en 60% y 70%, respectivamente (Fig. 2B). Estos resultados son promisorios ya que se inhibió la actividad de las APH con una concentración muy baja de IAPLb.

El extracto de *L. bogotensis* produjo la mayor inhibición de las proteasas de *H. hampei* con 5.560 UI y una actividad específica de 74,1 UI mg<sup>-1</sup>, en comparación con *H. suaveolens*, *B. humidicola* y *A. hypochondriacus* que fueron iguales, según la prueba de Duncan al 5% (Tabla 2). Los extractos proteínicos de *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *T. repens* y *C. pubescens* no inhibieron las aspártico proteasas de *H. hampei*. Las diferencias en la inhibición podrían deberse a la selectividad que los inhibidores de plantas han desarrollado para reconocer enzimas específicas de insectos, a la inactivación de los IPs por proteasas digestivas y a variaciones en afinidad entre los IPs y las enzimas digestivas (Ryan 1990).



**Figura 2.** A. Porcentaje de inhibición de las APH y pepsina en función de la concentración de proteína (μg) de los IAPLb. B. Porcentaje de inhibición de las APH en función de la concentración de proteína (mg) del extracto de *B. humidicola* e *H. suaveolens*.



**Figura 3.** A. Separación electroforética de los extractos proteínicos de las semillas de plantas. B. Zimograma de los extractos proteínicos de las semillas de plantas, en condiciones denaturantes al 16%. 1. Marcador de peso molecular. 2. *B. humicola*. 3. *H. suaveolens*. 4. *L. bogotensis*. 5. *A. hypochondriacus*. 6. *C. pubescens*. 7. *T. repens*. 8. *P. acutifolius*. 9. *P. coccineus*. C. Zimograma de inhibición de las APH por inhibidores de proteasas de los extractos proteínicos, usando electroforesis nativa al 10%. 1. Control, extracto de adultos de *H. hampei*. 2. *L. bogotensis*. 3. *B. humicola*. 4. *H. suaveolens*. 5. *A. hypochondriacus*.

**Zimogramas para la identificación de IAP.** los zimogramas son determinaciones cualitativas, que se utilizaron para identificar las bandas de IPs en los extractos proteínicos, mientras que los ensayos de inhibición cuantifican la inhibición de las aspártico proteasas de *H. hampei* por los IPs de extractos de plantas. Valencia *et al.* (2007) usaron este método para la detección de inhibidores de  $\alpha$ -amilasas de *Phaseolus vulgaris* (Linnaeus, 1753). La separación electroforética de los extractos proteínicos de las semillas mostró la presencia de bandas en un rango de masa molecular entre 6 a 30 kDa (Fig. 3A). El zimograma mostró que las bandas de proteína de *B. humicola*, *H. suaveolens*, *L. bogotensis* y *A. hypochondriacus* son resistentes a la digestión por las APH del insecto; esto sugiere que son inhibidores tipo aspártico proteasa (Fig. 3B). Mientras que las proteínas de los extractos de *C. pubescens*, *T. repens*, *P. acutifolius* y *P. coccineus*, son digeridas por las aspártico proteasas de *H. hampei* y no actúan como IPs; confirmando los resultados de los ensayos de inhibición.

**Zimograma de inhibición.** En este zimograma (Fig. 3C) no se observaron las bandas de actividad proteolítica cuando se incubó el extracto de *H. hampei* con los inhibidores presentes en los extractos de *L. bogotensis*, *B. humicola*, *H. suaveolens* y *A. hypochondriacus*, confirmando los resultados de los ensayos de inhibición. Esto indica que los IPs se unen al sitio activo de las aspártico proteasas inhibiendo su actividad, lo

cual se refleja en la desaparición de las dos bandas de actividad proteolítica.

### Discusión

Para la identificación de inhibidores de las APH se utilizaron extractos proteínicos de insectos adultos que representan la actividad aspártico proteasa. De forma similar, extractos de las larvas del coleóptero *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) se emplearon para purificar la aspártico proteinasa tipo cathepsina D, debido a que los zimogramas mostraron actividad proteolítica en intestinos y larvas, demostrando la naturaleza digestiva de esta enzima (Blanco *et al.* 1996). En otra investigación se encontró que en *Prostephanus truncatus* (Horn, 1878) la actividad  $\alpha$ -amilasa es mayor en larvas de segundo instar y en adultos (Mendiola *et al.* 2000). Además, la actividad de  $\alpha$ -amilasa y de tripsina de *P. truncatus* fue más alta en adultos que en larvas; esto sugiere que es mejor utilizar adultos para evaluar el efecto de inhibidores de estas enzimas (Vásquez *et al.* 1999).

Las aspártico proteasas de *H. hampei* presentaron un rango óptimo de actividad a pH 2 a 5. De manera similar, otros coleópteros como *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775), *T. castaneum*, *P. truncatus*, *Hypera postica* (Gyllenhal, 1813), *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833), *Leptinotarsa decemlineata* (Say, 1824) y *Diabrotica virgifera* (LeConte,

**Tabla 1.** Actividad inhibidora de los IAPs de las semillas de *L. bogotensis* y *B. humicola* contra las APH.

Especie	Tratamiento	Búfer	UI ml <sup>-1</sup>	Actividad inhibición total UI	Actividad específica UI mg <sup>-1</sup>
<i>L. bogotensis</i>	Desgrasado	Agua	219,1	8764 *	97,4
<i>L. bogotensis</i>	Desgrasado	B succínico 0.2 M pH 4.5	123,3	4314	47,9
<i>L. bogotensis</i>	Sin desgrasar	Agua	109,8	4391	48,8
<i>L. bogotensis</i>	Sin desgrasar	B succínico 0.2 M pH 4.5	88,4	3449	38,3
<i>B. humicola</i>	Desgrasado	Agua	73,5	2426	27,0
<i>B. humicola</i>	Desgrasado	B succínico 0.2 M pH 4.5	52,7	1633	18,1
<i>B. humicola</i>	Sin desgrasar	Agua	42,7	1280	14,2
<i>B. humicola</i>	Sin desgrasar	B succínico 0.2 M pH 4.5	34,3	1167	13,0

\* = p < 0.0001.

**Tabla 2.** Actividad inhibidora de los IAPs de las semillas de *L. bogotensis*, *B. humidicola*, *A. hypochondriacus* e *H. suaveolens* contra las APH.

Especie	UI ml <sup>-1</sup>	Actividad inhibición total UI	UI g <sup>-1</sup>	Actividad específica UI mg <sup>-1</sup>
<i>L. bogotensis</i>	139,0	5560 A	556,0	74,1
<i>B. humidicola</i>	58,0	1380 B	138,0	18,6
<i>H. suaveolens</i>	29,6	1392 B	139,0	18,4
<i>A. hypochondriacus</i>	16,8	673,3 B	67,3	9,0

Promedios seguidos por la misma letra son iguales ( $P < 0,0001$ ).

1868), que utilizan aspártico proteasas para la digestión de las proteínas del alimento, tienen una actividad proteolítica óptima en un rango de pH de 3 a 6 (Silva y Xavier-Filho 1991; Blanco *et al.* 1996; Vásquez *et al.* 1999; Wilhite *et al.* 2000; Lemos *et al.* 1990; Wolfson y Murdock 1987; Liu *et al.* 2004). En general, las aspártico proteasas se han encontrado en insectos de los ordenes hemiptera y coleóptero que se caracterizan por el pH ácido del intestino medio (Houseman y Downe 1983).

La presencia de aspártico proteasas en el intestino medio de *H. hampei* se confirmó por su inhibición con pepstatina A, este inhibidor ha sido utilizado para identificar aspártico proteasas en el intestino medio de varios coleópteros como *T. castaneum*, *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* e *H. hampei*, por la pérdida de la actividad proteolítica de la enzima (Blanco *et al.* 1996; Silva y Xavier-Filho 1991; Valencia y Arboleda 2005). La actividad aspártico proteasa del intestino medio de las larvas de *Z. subfasciatus* fue inhibida completamente con el empleo de 14  $\mu$ M de pepstatina A (Lemos *et al.* 1990). Del mismo modo, la actividad proteolítica del intestino medio de *H. postica* se redujo en 50% por la adición de pepstatina A y del inhibidor de catepsina D de papa (Mares *et al.* 1989). Mientras que el inhibidor de aspártico proteasas de calabaza (SQAPI), que inhibe pepsina pero no catepsina D (Christeller *et al.* 1998), no inhibió la actividad proteolítica de *H. postica*, esto confirmó que catepsina D es la principal aspártico proteinasa de este gorgojo (Wilhite *et al.* 2000).

Se concluye que las aspártico proteasas de *H. hampei* son de tipo catepsina D porque digieren casi exclusivamente hemoglobina. De forma similar, la enzima aislada de *T. castaneum* se clasificó como catepsina D porque digiere únicamente hemoglobina (Blanco *et al.* 1996). También, la aspártico proteinasa presente en el intestino medio de las larvas de *C. maculatus* es catepsina D porque digiere 100% de hemoglobina y 30% de BSA (Silva y Xavier-Filho 1991). Catepsina D es una de las aspártico proteasas mejor estudiadas en vertebrados y artrópodos; esta enzima es responsable de la digestión intracelular y extracelular de proteínas en el lumen del intestino medio de muchos coleópteros donde las cisteín proteasas son las enzimas digestivas más importantes (Ahn y Zhu-Salzman 2009). En *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) está involucrada en la producción de vitelogenina (Cho y Raickel 1992). En *Ceratitis capitata* (Wiedemann, 1824) su actividad coincide con la hidrólisis del cuerpo graso (Rabossi *et al.* 2004). En *Bombix mori* (Linnaeus, 1758) su acción en la muerte celular programada es clave en la metamorfosis para la transformación de pupa a larva (Lee *et al.* 2009). Esta enzima también participa en la digestión de la sangre en ácaros y garrapatas (Boldbaatar *et al.* 2006).

En *C. maculatus* y *Z. subfasciatus* las aspártico y cisteín proteasas son responsables de la digestión de las proteínas del alimento (Silva y Xavier-Filho 1991). Es probable que en *H. hampei* ambas enzimas son responsables de la proteólisis como ocurre en otros coleópteros, debido a que las cisteín proteasas son activas en un rango de pH entre 5 a 7, cercano al de *H. hampei*. El conocimiento del papel de los diferentes tipos de proteasas en el tracto digestivo del insecto, ayudará a entender los sitios de vulnerabilidad bioquímica, por esto es necesario continuar con la caracterización de las enzimas digestivas de la broca del café.

Las mejores condiciones para la extracción de los inhibidores de las aspártico proteasas de semillas de plantas fueron el empleo de agua y de harina desgrasada. La extracción con agua ha sido empleada para aislar inhibidores de *Cicer arietinum* (Linnaeus, 1753), *Gossypium arboreum* (Linnaeus, 1753), *Arachis hypogaea* (Linnaeus, 1753), *Psophocarpus tetragonolobus* (L., DC. 1825), *Solanum tuberosum* (Linnaeus, 1753), e *H. suaveolens* (Harsulkar *et al.* 1999; Giri *et al.* 2003; Aguirre *et al.* 2004). El procedimiento de desgrase se ha utilizado con éxito para la identificación y purificación de IPs en las semillas de *A. hypochondriacus*, *Inga laurina* (Sw., Willd. 1806), *Cicer echinospermum* (Davis, 1869), *A. hypogaea*, y *P. tetragonolobus* (Valdes *et al.* 1993; Rodríguez *et al.* 2007; Harsulkar *et al.* 1999).

Se identificaron inhibidores de las aspártico proteasas de *H. hampei* en las semillas de *L. bogotensis*, *B. humidicola*, *H. suaveolens* y *A. hypochondriacus*, estos IPs bloquean la digestión de las proteínas del alimento en el intestino medio y podrían utilizarse para el control del insecto. La broca del café es monófaga, sugiriendo que su mecanismo de defensa podría ser menos complejo y más vulnerable a la acción de IPs de plantas no-huésped que los insectos polífagos. Sin embargo, los estudios con IPs han mostrado que cuando se inhiben las proteasas más importantes para la digestión de las proteínas del alimento en el intestino medio, se incrementa la actividad de otras enzimas insensibles al inhibidor y que en su ausencia no están sobre-expresadas. Esto permite la digestión de las proteínas de la dieta en presencia del inhibidor y es fundamental para la supervivencia de los insectos (Zhu-Salzman *et al.* 2003; Amirhusin *et al.* 2007). En consecuencia, para una inhibición efectiva de las enzimas digestivas de los insectos es necesaria la expresión de diversos IPs (Jongsma y Bolter 1997).

Para conseguir resistencia durable contra *H. hampei*, los IPs de las semillas de *L. bogotensis*, *H. suaveolens* y *B. humidicola* pueden transferirse a café mediante ingeniería genética para producir plantas transgénicas con variaciones en la resistencia contra este insecto. Plantas de tabaco que expresan genes del inhibidor de proteinasa de tomate I (fuerte



inhibidor de quimotripsina y débil de tripsina) y II (fuerte inhibidor de tripsina y quimotripsina) mostraron diferencias en la especificidad contra *Manduca sexta* Linnaeus, 1763 (Johnson *et al.* 1989). El crecimiento de las larvas de *M. sexta* que se alimentaron de las hojas de tabaco transformadas con el inhibidor de proteinasa II se redujo significativamente en comparación con el crecimiento de las larvas que se alimentaron de las hojas sin transformar. Mientras, que el inhibidor de proteinasa I tuvo poco efecto en el crecimiento de las larvas de este lepidóptero (Johnson *et al.* 1989). Estos resultados muestran la importancia de identificar nuevos IPs con variaciones en la especificidad contra diferentes enzimas de los insectos (Mendiola *et al.* 2000).

*H. hampei* y *C. arabica* co-evolucionaron favoreciendo la adaptación del insecto a los compuestos tóxicos de la planta. Los IPs de *L. bogotensis*, *H. suaveolens* y *B. humidicola*, plantas no-huésped de la broca del café, inhiben las proteasas del insecto; mientras que los inhibidores de la planta huésped no bloquean las proteasas del insecto. Otros estudios han mostrado que los IPs de *A. hypogaea*, *P. tetragonolobus* y *S. tuberosum*, plantas no-huésped de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) inhiben las isoproteinasas y el crecimiento de las larvas de este lepidóptero, en comparación con los IPs de las plantas huésped (Harsulkar *et al.* 1999; Giri *et al.* 2003). De igual manera, el inhibidor de tripsina de *Momordica charantia* (Linnaeus, 1753) planta no-huésped de *H. armigera* y *Spodoptera litura* (Fabricius, 1775), afectó la fertilidad y fecundidad de las larvas de ambos insectos (Telang *et al.* 2003). También, las vicilinas de leguminosas no-huésped de *C. maculatus* como *P. vulgaris*, *Phaseolus lunatus* (Linnaeus, 1753), *Canavalia ensiformis* (L., DC. 1825), y *Glycine max* (L., Merr. 1917) retardaron el desarrollo de las larvas del insecto (Yunes *et al.* 1998). Mientras que las vicilinas de *Vigna angularis* (Willd, 1969) una especie genéticamente cercana a la planta huésped *Vigna unguiculata* (L., Walp. 1843) no afectaron el desarrollo de las larvas de este insecto (Yunes *et al.* 1998). Estos resultados muestran la importancia de evaluar IPs de plantas no-huésped contra las enzimas de insectos en la búsqueda del control de plagas vía transgénesis.

Los inhibidores presentes en el extracto crudo de *L. bogotensis* produjeron la mayor inhibición de las aspártico proteasas de *H. hampei* usando una concentración de extracto proteínico de 100 µg, menor en comparación con otras investigaciones que usaron 160 µg de extracto crudo de *M. charantia* con una inhibición del 84% de la actividad de las proteinasas del intestino de *H. armigera* (Telang *et al.* 2003). Del mismo modo, una concentración diez veces mayor de extracto crudo de *P. vulgaris* y *Amaranthus* spp., sólo inhibió la actividad α-amilasa de *H. hampei* en un 80% y 40%, respectivamente (Valencia *et al.* 2000). De forma similar, 1 mg de extracto crudo de *Amaranthus cruentus* (Linnaeus, 1759) sólo inhibió 80% de la actividad amilasa de *H. hampei* (Valencia *et al.* 2000).

Estos resultados sugieren que los IAPLbs podrían ser buenos candidatos para transferir a café mediante ingeniería genética para producir plantas resistentes contra *H. hampei*, debido a que inhiben las enzimas del insecto a bajas concentraciones y al pH encontrado en el intestino medio del insecto. Además, esta leguminosa no ha estado expuesta a *H. hampei*, proporcionando nuevos y más potentes inhibidores de las proteasas de este insecto. Esto coincide con investigaciones previas que muestran que los IPs de plantas no-huésped son mejores para inhibir las proteasas de un insecto particular que

los inhibidores de las plantas huésped (Harsulkar *et al.* 1999; Giri *et al.* 2003).

## Conclusiones

Se identificaron inhibidores de las aspártico proteasas de *H. hampei* en diferentes semillas; los inhibidores de *L. bogotensis* produjeron una mayor inhibición de las aspártico proteasas del insecto en comparación con los IPs de *H. suaveolens*, *B. humidicola* y *A. hypochondriacus*. Los IPs se unen al centro activo de la enzima bloqueando su actividad proteolítica. Esto muestra que los IPs de plantas no-huésped pueden suministrar nuevos y más potentes inhibidores de las proteasas de *H. hampei*. Estos inhibidores de proteasas pueden transferirse a café en la búsqueda de resistencia durable contra *H. hampei*. Este trabajo junto con el de Scarafoni *et al.* (2008) y Molina *et al.* (2010) confirma la existencia de inhibidores de proteasas en las semillas de *Lupinus* spp., contrario a lo que se había publicado de la falta de actividad inhibitoria de las proteasas de *L. albus* y *Lupinus luteus* (Linnaeus, 1753) (Gallardo *et al.* 1974).

## Agradecimientos

Agradecemos al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia por la donación de recursos para llevar a cabo este proyecto, a Colciencias por la beca de doctorado de Diana Molina, y a los revisores del manuscrito.

## Literatura citada

- AGUIRRE, C.; VÁLDES, S.; MENDOZA, G.; ROJO, A.; BLANCO, A. 2004. A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae). Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology 138: 81-89.
- AHN, J. E.; ZHU-SALZMAN, K. 2009. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phyto-cystatin. Journal of Insect Physiology 55: 678-685.
- AMIRHUSIN, B.; SHADE, R. E.; KOIWA, H.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A.; MURDOCK, L.; ZHU-SALZMAN, K. 2007. Protease inhibitors from several classes work synergistically against *Callosobruchus maculatus*. Journal of Insect Physiology 53: 734-740.
- BARBOSA, A. E.; ALBUQUERQUE, E.; SILVA, M.; SOUZA, D.; OLIVEIRA-NETO, O.; VALENCIA, A.; ROCHA, T.; GROSSI-DE-SA, M. F. 2010. α-amylase inhibitor- 1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in *Coffea arabica* plants inhibits α-amylases from coffee berry borer. BMC Biotechnology 10:44.
- BERGAMIN, J. 1943. Contribuição para o conhecimento da biologia da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Col. Ipidae). Arquivos do Instituto Biológico 14: 31-72.
- BLANCO, A.; MARTÍNEZ, N.; SANDOVAL, L.; DELANO, J. 1996. Purification and characterization of a digestive Cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castaneum* larvae (Herbst). Insect Biochemistry and Molecular Biology 26: 95-100.
- BOLDBAATAR, D.; SIKASUNGE, C. S.; BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. 2006. Molecular cloning and functional characterization of an aspartic protease from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 36: 25-36.
- BUSTILLO, A. E. 2008. Aspectos sobre la broca del café, *Hypothenemus hampei*, en Colombia. P. 388-418. En: Alex Enrique Bustillo (ed.). Los insectos y su manejo en la caficultura colombiana. FNC. Chinchiná, Colombia. 466 p.

- CHO, W. L.; RAICKEL, A. S. 1992. Cloning of cDNA for mosquito lysosomal aspartic protease. Sequence analysis of an insect lysosomal enzyme similar to cathepsins D and E. The Journal of Biological Chemistry 267: 21823-21829.
- CHRISTELLER, J. T.; FARLEY, P. C.; RAMSAY, R. J.; SULLIVAN, P. A.; LAING, W. A. 1998. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. European Journal of Biochemistry 254: 160-167.
- DUQUE, H.; BAKER, P. 2003. Case studies in CBB economics. p. 51-63. En: Devouring Profit. The socio economics of coffee berry borer IPM. The Commodities Press-CABI-CENICAFE (ed.). Chinchiná, Colombia. 106 p.
- FRANCO, O. L.; DIAS, S. C.; MAGALHAES C. P.; MONTEIRO, A. C.; BLOCH, Jr. C.; MELO, F. R.; OLIVEIRA-NETO, O. B.; MONNERAT, R. G.; GROSSI-DE-SA, M. F. 2004. Effects of soybean Kunitz trypsin inhibitor on the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). Phytochemistry 65: 81-89.
- GALLARDO, F.; ARAYA, H.; PAK, N.; TAGLE, M. A. 1974. Toxic factors in chilean legumes II. Trypsin inhibitor activity. Archivos Latinoamericanos de Nutrición 24: 183-189.
- GATEHOUSE, J. A. 2002. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. New Phytologist 156: 145-169.
- GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; KU, M. S. B.; GUPTA, V. S.; DESHPANDE, V. V.; RANJEKAR, P. K.; FRANCESCHI, V. R. 2003. Identification of potent inhibitors of *Helicoverpa armigera* gut proteinase from winged bean seeds. Phytochemistry 63: 523-532.
- HARSULKAR, A. M.; GIRI, A. P.; PATANKAR, A. G.; GUPTA, V. S.; SAINANI, M. N.; RANJEKAR, P. K.; DESHPANDE, V. V. 1999. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. Plant Physiology 121: 497-506.
- HOUSEMAN, J. G.; DOWNE, A. E. R. 1983. Cathepsin D-like activity in the posterior midgut of Hemipteran insects. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology 75: 509-512.
- JARAMILLO, J.; BORGEMEISTER, C.; BAKER, P. 2006. Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): Searching for sustainable control strategies. Bulletin of Entomological Research 96: 1-12.
- JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. J. 1997. The adaptation of insects to plant proteinase inhibitors. Journal of Insect Physiology 43: 885-896.
- JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; GYNHEUNG, A.; RYAN, C. 1989. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: Effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86: 9871-9875.
- LASKOWSKI, M. Jr.; QASIM, M. A.; LU, S. M. 2003. Interaction of standard mechanism, canonical protein inhibitors with serine proteinases. In Protein-Protein Recognition (Kleanthous, C., ed.), pp. 228-279, Oxford University Press, Oxford.
- LEE, K. S.; KIM, B. Y.; CHOO, Y. M.; YOON, H. J.; KANG, P. D.; WOO, S. D.; SOHN, H. D.; ROH, J. Y.; GUI, Z. Z.; JE, Y. H.; JIN, B. R. 2009. Expresión profile of cathepsin D in the fat body of *Bombix mori* during metamorphosis. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology 154: 188-194.
- LEMOES, K. J. A.; CAMPOS, F. A. P.; SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. 1990. Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* on cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. Entomologia Experimentalis et Applicata 56: 21.
- LENNÉY, J. F. 1975. Three yeast proteins that specifically inhibit yeast proteases A, B and C. The Journal of Bacteriology 122: 1265-1273.
- LI, X.; SCHULER, M. A.; BERENBAUM, M. R. 2002. Jasmonate and salicylate induce expresión of herbivore cytochrome P450 genes. Nature 419: 712-715.
- LIU, Y. L.; SALZMAN, R. A.; PANKIW, T.; ZHU-SALZMAN, K. 2004. Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. Insect Biochemistry and Molecular Biology 34: 1069-1077.
- MACEDO, M. L.; FREIRE, M. G.; SILVA, M. B.; COELHO, M. B. 2007. Insecticidal action of *Bauhinia monandra* leaf lectin (BmoLL) against *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae); *Zabrotes subfasciatus* and *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology 146: 486-498.
- MADR-HICA-OAC (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Instituto Interamericano de Cooperación en la Agricultura, y Observatorio de Agrocadenas de Colombia). 2008. Información estadística. <<http://www.agrocadenas.gov.co/home.htm>> (Fecha última revisión: 20 junio 2010. Fecha último acceso: [10 julio 2010]).
- MARES, M.; MELOUN, B.; PAVLIK, M.; KOSTKA, V.; BAUDYS, M. 1989. Primary structure of the cathepsin D inhibitor from potatoes and its structural relationship to soybean trypsin inhibitor family. FEBS Letters 251: 94-98.
- MENDIOLA, E.; VALENCIA, A.; VALDÉS, S.; DÉLANO, J.; BLANCO, A. 2000. Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn. Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology 126: 425-433.
- MOLINA, D.; ZAMORA, H.; BLANCO-LABRA, A. 2010. An inhibitor from *Lupinus bogotensis* seeds effective against aspartic proteases from *Hypothenemus hampei*. Phytochemistry 71: 923-929.
- NAVARRO, J.; GÓNGORA, C.; BENAVIDES, P. 2010. Single nucleotide polymorphism detection at the *Hypothenemus hampei* *Rdl* gene by allele-specific PCR amplification with T<sub>m</sub>-shift primers. Pesticide Biochemistry and Physiology 97: 204-208.
- OLIVEIRA, A. S.; PEREIRA, R. A.; LIMA, L. M.; MORAIS, A. H. A.; MELO, F. R.; FRANCO, O. L.; BLOCH, Jr. C.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; SALES, M. P. 2002. Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the algarroba tree (*Prosopis juliflora* D. C.). Pesticide Biochemistry and Physiology 72: 122-132.
- OSSA, G. A.; BUSTILLO, A. E.; VALENCIA, A. 2000. Determinación del pH en el fluido digestivo de larvas y adultos de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Revista Cenicafé 51: 97-101.
- PRASAD, E. R.; DUTTA-GUPTA, A.; PADMASREE, K. 2010. Insecticidal potential of Bowman-Birk proteinase inhibitors from red gram (*Cajanus cajan*) and black gram (*Vigna mungo*) against lepidopteran insect pest. Pesticide Biochemistry and Physiology 98: 80-88.
- PRECIADO, D. P.; BUSTILLO, A. E.; VALENCIA, A. 2000. Caracterización parcial de una proteinasa digestiva proveniente de la broca del café (Coleoptera: Scolytidae). Revista Cenicafé 51: 20-27.
- RABOSSI, A.; STOKA, V.; PUIZDAR, V.; TURK, V.; QUESADA-ALLUE, L. A. 2004. Novel aspartyl proteinase associated to fat body histolysis during *Ceratitis capitata* early metamorphosis. Archives Insect Biochemistry Physiology 57: 51-67.
- RODRÍGUEZ, M. L.; ALVES, V.; GRACAS, M.; RICHARDSON, M. 2007. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (Sw.) Willd. Phytochemistry 68: 1104-1111.
- RYAN, C. A. 1990. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annual Review of Phytopathology 28: 425-449.
- SALES, M. P.; ANDRADE, L. B. S.; ARY, M. B.; MIRANDA, M. R. A.; TEXEIRA, F. M.; OLIVEIRA, A. S.; FERNANDES, K. V. S.; XAVIER-FILHO, J. 2005. Performance of bean bruchids (Coleoptera: Bruchidae) reared on resistant (IT81D-1045) and susceptible (Epace 10) *Vigna unguiculata* seeds: Relationship



- with trypsin inhibitor and vicilin excretion. Comparative Biochemistry and Physiology. Part A: Molecular & Integrative Physiology 142: 422-426.
- SCARAFONI, A.; CONSONNI, A.; GALBUSERA, V.; NEGRI, A.; TEDESCHI, G.; RASMUSSEN, P.; MAGNI, C.; DURANTI, M. 2008. Identification and characterization of a Bowman-Birk inhibitor active towards trypsin but not chymotrypsin in *Lupinus albus* seeds. Phytochemistry 69: 1820-1825.
- SCHÄGGER, H.; VON JAGOW, G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for separation of protein in the range of 1 to 100 kDa. Analytical Biochemistry 166: 368-379.
- SCHWERTZ, G. W.; TAKENAKA, Y.; 1955. A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin activity. Biochimica et Biophysica Acta 16: 571-575.
- SILVA, C. P.; XAVIER-FILHO, J. 1991. Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midguts of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae). Comparative Biochemistry and Physiology. Part B: Biochemistry & Molecular Biology 99: 529-533.
- SUMIKAWA, J. T.; DE BRITO, M. V.; MACEDO M. L.; UCHOA, A. F.; MIRANDA, A.; ARAUJO, A. P.; SILVA-LUCCA, R. A.; SAMPAIO, M. U.; OLIVA, M. L. 2010. The defensive functions of plant inhibitors are not restricted to insect enzyme inhibition. Phytochemistry 71: 214-220.
- TAMHANE, V. A.; GIRI, A. P.; SAINANI, M. N.; GUPTA, V. S. 2007. Diverse forms of Pin-II family proteinase inhibitors from *Capsicum annum* adversely affect the growth and development of *Helicoverpa armigera*. Gene 403: 29-38.
- TELANG, M.; SRINIVASAN, A.; PATANKAR, A.; HARSULKAR, A.; JOSHI, V.; DAMLE, A.; DESHPANDE, V.; SAINANI, M.; RANJEKAR, P. K.; GUPTA, G.; BIRAH, A.; RANI, S.; KACHOLE, M.; GIRI, A. P.; GUPTA, V.; BIRAH, A.; RANI, S.; KACHOLE, M.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. Phytochemistry 63: 643-652.
- VALDES, S.; SEGURA, M.; CHAGOLLA, A.; VERVER, A.; MARTÍNEZ, N.; BLANCO, A. 1993. Purification, Characterization, and complete amino sequence of a trypsin inhibitor from Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. Plant Physiology 103: 1407-1412.
- VALENCIA, A.; BUSTILLO, A.; OSSA, G.; CHRISPPEELS, M. 2000.  $\alpha$ -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. Insect Biochemistry and Molecular Biology 30: 207-213.
- VALENCIA, A.; ARBOLEDA, J. W. 2005. Digestion of the inhibitor  $\alpha$ AI by *Hypothenemus hampei* aspartic proteinases. Revista Colombiana de Entomología 31: 117-121.
- VALENCIA, A.; ARBOLEDA, J. W.; GROSSI-DE-SÁ. 2007. Detection of  $\alpha$ -amylase inhibitors by a zymography method, performed in isoelectric focusing electrophoretic phastGels. Analytical Biochemistry 366: 113-115.
- VÁSQUEZ, M.; SMITH, R. H.; MARTÍNEZ, N. A.; BLANCO, A. 1999. Enzymatic differences in the digestive system of the adult and larva of *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae). Journal of Stored Products Research 35: 167-174.
- VILLALBA, D. A.; BUSTILLO, A. E.; CHÁVES, B. 1995. Evaluación de insecticidas para el control de la broca del café en Colombia. Revista Cenicafe 46: 152-163.
- WILHITE, S. E.; ELDEN, T. C.; BRZIN, J.; SMIGOCKI, A. C. 2000. Inhibition of cysteine and aspartyl proteinases in the alfalfa weevil midgut with biochemical and plant-derived proteinase inhibitors. Insect Biochemistry and Molecular Biology 30: 1181-1188.
- WOLFSON, J. L.; MURDOCK, L. L. 1987. Suppression of larval Colorado beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. Entomologia Experimentalis et Applicata 44: 235-240.
- YUNES, A. N. A.; ANDRADE, M. T.; SALES, M. P.; MORAIS, R. A.; FERNANDES, K. V. S.; GOMES, V. M.; XAVIER-FILHO, J. 1998. Legume seed vicilins (7S storage proteins) interfere with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F)]. Journal of the Science of Food and Agriculture 76: 111-116.
- ZOR, T.; SELINGER, Z. 1996. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. Analytical Biochemistry 236: 302-308.
- ZHU-SALZMAN, K.; KOIWA, H.; SALZMAN, R. A.; SHADE, R. E.; AHN, J. E. 2003. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. Insect Biochemistry and Molecular Biology 12: 135-145.

Recibido: 27-ago-2010 • Aceptado: 2-jun-2011