

Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Biología

Ingeniería en Biotecnología



Grupo Control Biológico y Bioprocesos

Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, Universidad de Costa Rica

“POTENCIACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DE *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* CONTRA LA BROCA DEL CAFÉ (*Hypothenemus hampei* Ferrari) CON UN INHIBIDOR DE SERÍN-PROTEASAS PURIFICADO A PARTIR DE FRIJOL DE SOYA (*Glycine max*)”

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología con el grado académico de Bachillerato

Esteve Mesén Porras

Cartago, Abril, 2013

Potenciación del efecto tóxico de *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* contra la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) con un inhibidor de serín-proteasas purificado a partir de frijol de soya (*Glycine max*)

Esteve Mesén Porras¹

RESUMEN

El café es uno de los productos de mayor relevancia comercial en Costa Rica. La plaga más devastadora del café es la broca (*Hypothenemus hampei*). Dado que el uso de plaguicidas ha sido ineficiente; se ha promovido el uso de formulados a base de δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) para alcanzar un manejo más sostenible de esta plaga. Sin embargo, las proteinasas digestivas del intestino medio del insecto pueden comprometer la efectividad de *Bt*; por lo que han buscado opciones como la incorporación de inhibidores de proteinasas (IPs) vegetales. El objetivo de esta investigación fue determinar si un extracto de soya (*Glycine max*) contenía IPs que potenciaran el efecto tóxico de *Bt* subs. *israelensis* contra *H. hampei*. El perfil proteico del extracto de la broca reveló una banda a 24,1 kDa que se presumió como una tripsín-proteasa, mientras que el extracto de soya mostró una banda a 20,1 kDa que se estimó como el inhibidor Kunitz de tripsín-proteasas. El zimograma copolimerizado con gelatina permitió cuantificar las zonas de actividad del extracto de broca en $(0,218 \pm 0,457) \mu\text{g}$, las cuales fueron suprimidas al incorporar extracto de soya. Los bioensayos mostraron que al añadir una mezcla de cristales de *Bti* a dosis subletal ($1,135 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) junto con dosis incrementales de extracto de soya; la mortalidad sobre *H. hampei* fue mayor que al incorporar *Bti* solo, y se alcanzó una mortalidad máxima de 73% con *Bti* + IPs. Esto implica que la mezcla de los IPs + *Bti* exhibieron una sinergia significativa.

Palabras clave: *Hypothenemus hampei*, *Bacillus thuringiensis*, proteinasas, zimograma, harina de soya, inhibidor Kunitz de tripsina, bioensayos, mortalidad.

¹ Informe de TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2011.

Potentialiation of the toxic effect of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* against coffee berry borer (*Hypothenemus hampei* Ferrari) with a serine proteinase inhibitor purified from soybean (*Glycine max*)

Esteve Mesén Porrás²

ABSTRACT

Coffee is one of the most commercially important products in Costa Rica. The most devastating pest on this crop is the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). Since the use of agrochemicals has been inefficient, alternatives like the use of bioinsecticides based on δ -endotoxins from *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) has been promoted to achieve a more sustainable management of this pest. Nevertheless, the presence of environmental and digestive proteinases in the insect's midgut could impact in the effectiveness of *Bt*. By this reason, researchers have focused to search options like the incorporation of plant proteinases inhibitors (PIs). The objective of this research was determine if a soybean (*Glycine max*) meal extract had PIs to potentiate the toxic effect of *Bt* subs. *israelensis* against *H. hampei* adult females. The protein profile of the midgut extract revealed an only band at 24,1 kDa that was presumed as a trypsin-proteinase; while the soybean extract showed a band at 20,1 kDa that was estimated as the soybean Kunitz trypsin inhibitor. Clear areas in the zymogram co-polymerized with gelatin were quantified in $(0,218 \pm 0,457)$ μg , which bands were suppressed by incorporating soybean extract. Bioassays showed that a mixture of *Bti* crystals to a sublethal dose ($1,135 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) added with increased doses of soybean meal extract produced a higher mortality than the use of *Bti* alone, and the mixture of *Bti* + soybean extract reached a maximum mortality of 73%. Therefore, PIs exhibited an important degree of synergy with *Bti*.

Key words *Hypothenemus hampei*, *Bacillus thuringiensis*, proteinases, zymogram, soybean meal, Kunitz trypsin inhibitor, bioassays, mortality.

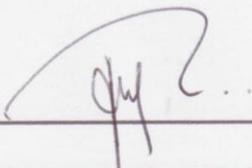
² GRADUATION FINAL PROJECT report, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica, 2011.

ACREDITACIÓN

POTENCIACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DE *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* CONTRA LA BROCA DEL CAFÉ (*Hypothenemus hampei* Ferrari) CON UN INHIBIDOR DE SERÍN-PROTEASAS PURIFICADO A PARTIR DE FRIJOL DE SOYA (*Glycine max*)

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar por el título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología

Miembros del tribunal



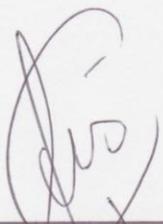
Lic. Fabiola Jiménez Rodríguez

Profesor asesor-ITCR



Ph.D. Adrián Pinto Tomás

Asesor externo-UCR



Ing. Catherine Jiménez Quirós

Lectora

DEDICATORIA

A Dios por acompañarme e iluminar mi camino en todo momento.

A mis abuelos Bernardo y Elia, y a mi padre Amancio porque aunque físicamente ya no están conmigo, siguen siendo mi fuente de motivación y ejemplo a seguir.

A mi madre, quien siempre me impulsó a seguir adelante aún en circunstancias difíciles.

AGRADECIMIENTOS

En primer término, quisiera agradecerle a Dios por darme salud y fortaleza para alcanzar todas las metas que me he propuesto. Un sentido agradecimiento a mi madre Elia, quien fue mi apoyo incondicional en mi etapa de estudiante; a mis hermanos Ronny y Susana, familiares y amigos cercanos, que influyeron en mi formación personal y profesional y me incentivaron a salir adelante.

Al Ph.D. Adrián Pinto Tomás y a la Ing. Catherine Jiménez Rodríguez por permitirme desarrollar este proyecto en el CIBCM, y por brindarme su confianza, guía, cooperación y conocimientos en el desarrollo de esta investigación.

Al Ph.D. César Rodríguez Sánchez y a la M.Sc. Rebeca Mora Castro por darme su amistad, paciencia, colaboración y valiosos aportes para el planteamiento de algunos de los objetivos del proyecto, su realización y en la redacción del documento final.

A la Lic. Fabiola Jiménez Rodríguez por su valiosa ayuda académica, atención, sugerencias y apoyo durante la realización del proyecto. A Laura Campos Esquivel y a Sergio Dahdouh Cabia, por su apoyo y paciencia en el mantenimiento de la cría de broca y la realización de bioensayos; y al grupo de Ingeniería Genética de Cultivos por ofrecerme su amistad durante mi estancia en el laboratorio.

A FUNDEVI por ofrecer el apoyo financiero y logístico para la realización del proyecto en cuestión, y a Ingrid Fallas, quien colaboró con la búsqueda de recursos y realización del pago de los mismos para la adquisición de algunos reactivos.

A mis compañeros de carrera, con quienes compartí en mi periodo universitario; aprendí a tener compromiso, trabajar en equipo y a ser mejor estudiante.

A los profesores de la carrera de Ingeniería en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica, por regalarme su conocimiento en beneficio de mi formación profesional, y por inculcar en mí el deseo de buscar herramientas biotecnológicas aplicables y rentables.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
ACREDITACIÓN	iii
<i>DEDICATORIA</i>	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
CAPÍTULO 1 Introducción.....	1
CAPÍTULO 2 Revisión de literatura	5
2.1 El café (<i>Coffea</i> spp.)	5
2.1.1 Origen y parámetros para la producción del cultivo de café.....	5
2.1.2 Introducción y desarrollo de la caficultura en Costa Rica	6
2.1.3 Sistema de producción del café en Costa Rica.....	7
2.1.4 Época de siembra y regiones donde se cultiva café en Costa Rica	8
2.1.5 Importancia agronómica del café en Costa Rica	10
2.2 La broca del café (<i>Hypothenemus hampei</i>).....	11
2.2.1 Descripción y biología de la especie	11
2.2.2 Origen y distribución geográfica de la broca alrededor del mundo	13
2.2.3 Problemas agronómicos que produce <i>H. hampei</i>	15
2.2.4 Manejo integrado de la broca del café	15
2.3 <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner)	19
2.3.1 Origen y aspectos generales	19
2.3.2 Ecología de <i>Bacillus thuringiensis</i>	20

2.3.3	Biología de la especie y factores tóxicos de <i>Bt</i>	20
2.3.4	Propiedades de los bioinsecticidas derivados de proteínas Cry	21
2.3.5	Mecanismo general de acción tóxica de las proteínas Cry	22
2.3.6	Otros factores de virulencia	24
2.3.7	Aplicaciones biotecnológicas e implicaciones de utilizar formulados de <i>Bt</i> para el control biológico de insectos del orden Coleoptera.....	25
2.4	Métodos de defensa de los insectos ante las δ -endotoxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> mediante la acción de las proteasas digestivas	26
2.4.1	Fisiología del tracto digestivo de <i>H. hampei</i>	27
2.4.2	Proceso digestivo de los herbívoros y distribución de proteinasas	29
2.5	Enzimas proteolíticas	30
2.5.1	Clasificación de las endopeptidasas.....	31
2.5.2	Serín-proteinasas	32
2.5.3	Procesamiento de las toxinas <i>Bti</i> mediado por tripsín-proteasas	32
2.5.4	Resistencia adquirida por <i>H. hampei</i> hacia las sustancias tóxicas sintetizadas y secretadas por <i>Coffea</i> spp.....	33
2.6	Inhibidores de proteinasas (IPs) contra proteasas endógenas y ambientales	34
2.6.1	Distribución y localización de los IPs en plantas	35
2.6.2	Propiedades y funciones de los IPs en leguminosas.....	36
2.6.3	La soya (<i>Glycine max</i> L. Merrill) como fuente de IPs.....	37
2.6.4	Actividad anti-trípica de los IPs en <i>G. max</i>	38
2.6.5	Familia de inhibidores de serín-proteasas (Serpinas)	38
2.6.6	Clasificación y características de los IPs presentes en la soya.....	39
2.6.7	Modo de acción de los IPs contra las tripsín-proteasas ambientales y las tripsín-proteasas del intestino medio de coleópteros	40

2.6.8	Perspectivas biotecnológicas e implicaciones en la implementación de IPs dentro de un programa de control biológico de plagas insectiles	42
CAPÍTULO 3 Objetivos		44
3.1	Objetivo General.....	44
3.2	Objetivos específicos	44
3.2.1	Purificación de las serín-proteasas digestivas a partir de intestinos medios de <i>Hypothenemus hampei</i>	44
3.2.2	Purificación de IPs a partir de harina de frijoles de <i>Glycine max</i>	44
3.2.3	Purificación de las toxinas de <i>B. thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i>	44
3.2.4	Obtención de perfiles proteicos y enzimáticos para los extractos de intestino medio de broca y de harina de frijol de soya	45
3.2.5	Determinación del efecto <i>in vitro</i> del extracto de soya purificado sobre la actividad de proteolítica del extracto de intestino medio de <i>H. hampei</i>	45
3.2.6	Verificación del efecto protector de los IPs de soya sobre <i>Bti</i>	45
3.2.7	Comprobación <i>in vivo</i> del efecto sinérgico del extracto de soya en combinación con las δ -endotoxinas del extracto purificado de <i>Bti</i>	45
CAPÍTULO 4 Metodología.....		46
4.1	Recolección en campo y estimulación de la emergencia de adultos	46
4.2	Extracción y desinfección de la broca a partir de frutos frescos	47
4.2.1	Extracción de broca del fruto de café	47
4.2.2	Desinfección de los adultos.....	48
4.3	Extracción de las proteasas solubles del intestino medio de <i>H. hampei</i> y obtención del extracto crudo de <i>G. max</i>	48
4.3.1	Extracción del intestino medio	48
4.3.2	Obtención del extracto crudo a partir de harina de soya.....	49

4.4	Purificación de los extractos crudos de intestino medio y de soya	50
4.4.1	Precipitación de extractos crudos con sulfato de amonio ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$)	50
4.4.2	Diálisis de los extractos crudos de proteínas.....	51
4.5	Aislamiento de las protoxinas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	53
4.5.1	Cultivo sincronizado de una cepa <i>Bti</i> en medio HCT.....	53
4.5.2	Cuantificación de esporas viables	53
4.6	Separación y purificación de las δ -endotoxinas de la cepa <i>Bti</i>	54
4.6.1	Separación y tinción de la mezcla con cristales y esporas.....	54
4.6.2	Purificación de los cristales mediante un gradiente de sacarosa.....	55
4.7	Liofilización de las soluciones dializadas	56
4.8	Caracterización del extracto de soya y de los intestinos de <i>H. hampei</i>	57
4.8.1	Identificación del perfil proteico y pureza de los extractos crudos de intestinos y de soya mediante SDS-PAGE.....	58
4.8.2	Zimografía en una dimensión para estimar la actividad proteolítica y cuantificar las proteasas en el intestino medio de <i>H. hampei</i>	59
4.9	Análisis de actividad óptima del extracto de soya y su efecto inhibitorio sobre las proteasas digestivas presentes en el extracto intestinal de la broca.....	60
4.9.1	Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad proteolítica del extracto de soya utilizando el método espectrofotométrico.....	60
4.9.2	Efecto del extracto de soya purificado sobre la actividad proteolítica del extracto intestinal o tripsina porcina, mediante el método espectrofotométrico .	63
4.10	Efecto combinatorio de los cristales purificados de <i>Bti</i> y de los IPs de <i>G. max</i> sobre la actividad enzimática de tripsina porcina mediante SDS-PAGE.....	64
4.11	Determinación de la concentración letal media (LD_{50}) del extracto con cristales de <i>Bti</i> y comprobación del efecto sinérgico de <i>Bti</i> con los IPs derivados del extracto de soya en bioensayos con dieta artificial	65

4.11.1	Determinación de la concentración letal media (LD ₅₀) del extracto conteniendo los cristales purificados de <i>Bti</i>	65
4.11.2	Análisis del efecto sinérgico al mezclar el extracto de las δ -endotoxinas de <i>Bti</i> con los inhibidores de proteasas presentes en el extracto de soya	67
4.12	Tratamiento de los datos mediante análisis estadístico.....	68
CAPÍTULO 5	Resultados	69
5.1	Purificación parcial de los extractos de <i>H. hampei</i> y <i>G. max</i>	69
5.2	Cuantificación de esporas viables, separación y purificación de <i>Bti</i>	70
5.3	Identificación y caracterización funcional de los extractos de soya y broca	72
5.3.1	Estimación del tamaño aparente de las tripsín-proteinasas purificadas a partir de intestinos de adultos de <i>H. hampei</i>	72
5.3.2	Zimografía en una dimensión de las proteasas activas de <i>H. hampei</i> ..	73
5.3.3	Cuantificación de la actividad proteolítica del extracto de broca y estimación del grado de inhibición producido por el extracto de <i>G. max</i>	73
5.4	Evaluación del efecto de los parámetros de pH y temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto de soya parcialmente purificado	75
5.5	Actividad proteolítica/ inhibitoria de los IPs de <i>G. max</i> y de las proteinasas del intestino medio de <i>H. hampei</i>	77
5.6	Efecto combinatorio de los toxinas purificadas de <i>Bti</i> y del extracto de <i>G.</i> <i>max</i> sobre el comportamiento del extracto intestinal de <i>H. hampei</i>	80
5.7	Toxicidad del extracto de soya y <i>Bti</i> frente a adultos de <i>H. hampei</i>	81
CAPÍTULO 6	Discusión	85
CAPÍTULO 7	Conclusiones.....	106
CAPÍTULO 8	Recomendaciones	107
BIBLIOGRAFÍA	108

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Producción de café fruta por cantón en los periodos de cosecha de 2009-2010 y 2010-2011.....	9
Cuadro 2. Actividad inhibitoria de la tripsina en algunas leguminosas.....	38
Cuadro 3. Resumen de purificación del intestino medio de broca (<i>H. hampei</i>) y del extracto de soya (<i>G. max</i>).....	69
Cuadro 4. Toxicidad de los cristales purificados de <i>Bti</i> y de los cristales purificados de <i>Bti</i> mezclados con el extracto purificado de <i>G. max</i> sobre adultos de <i>H. hampei</i>	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vista macroscópica de brocas hembras en estadio adulto observada a través de estereoscopio.....	12
Figura 2. Daños físicos causados por la broca del café	13
Figura 3. Distribución de los países alrededor del mundo con presencia de broca del café (<i>H. hampei</i>).	14
Figura 4. Posiciones de penetración de la broca sobre el fruto de café.	17
Figura 5. Vista microscópica de las estructuras morfológicas producidas por la bacteria <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>israelensis</i>	19
Figura 6. Microscopía de transmisión electrónica del esporangio maduro de una cepa recombinantes de <i>B. thuringiensis</i> (pSTAB-cry10).....	20
Figura 7. Esquema del procesamiento de las protoxinas Cry1.....	23
Figura 8. Mecanismo de acción tóxico del complejo spora-cristal de <i>Bt</i>	24
Figura 9. Esquema del modo de acción de las proteínas Cry, y mecanismo de resistencia mediado por las proteinasas del tubo digestivo de larvas.	27
Figura 10. Vista macroscópica del tubo digestivo de una hembra adulta de <i>H. hampei</i> embebido en solución Ringer para insectos.	28
Figura 11. Esquema de la distribución de las enzimas proteolíticas presentes dentro del intestino medio de <i>H. hampei</i> y condiciones bioquímicas de actividad óptima.	30
Figura 12. Mecanismo de acción y síntesis de las enzimas proteolíticas.	33
Figura 13. Diagramas del inhibidor Kunitz de tripsina de soya (SKTI).....	40
Figura 14. Modelo del mecanismo de formación un complejo enzimático covalente serpina-proteinasas.....	41
Figura 15. Cámara de estimulación masiva, utilizada para mantener a <i>H. hampei</i> en granos de café infestados.....	46
Figura 16. Frutos de café con síntomas de <i>H. hampei</i> , preparados para extraer el adulto.....	47
Figura 17. Jaula plástica conteniendo confeti que se utilizó para almacenar los adultos, antes de llevar a cabo la desinfección de los insectos.....	48
Figura 18. Sobrenadantes de soya obtenidos durante las diversas etapas de extracción.	50

Figura 19. Montaje de tubos de diálisis con capacidad de 2 mL·cm ⁻¹ , utilizados para la purificación de los extractos crudos de soya.	52
Figura 20. Visualización de esporas en dilución de 10 ⁻⁷ , creciendo en placa Petri con caldo de cultivo Lauria-Bertani (LB).	54
Figura 21. Gradiente de sacarosa utilizado para separar los cristales <i>Bti</i>	56
Figura 22. Extractos liofilizados y utilizados para realizar los análisis posteriores.	57
Figura 23. Esquema de la reacción hidrolítica de las tripsín-proteasas sobre el sustrato BApNA.	61
Figura 24. Esquema de separación de 4 L de extracto con el complejo spora-cristal de <i>Bti</i> mediante embudo de separación.	70
Figura 25. Vista microscópica del frotis realizado al aislado de <i>B. thuringiensis</i> subs. <i>israelensis</i> , mostrando las diferentes estructuras morfológicas observadas en las diversas capas del gradiente de sacarosa.	71
Figura 26. SDS-PAGE al 12,5% (m/v) de las fracciones de extractos de intestino medio de <i>H. hampei</i> y de <i>G. max</i>	72
Figura 27. Zimograma co-polimerizado con gelatina al 0,1% (m/v), comparando la actividad proteolítica del polvo intestinal de <i>H. hampei</i> con la actividad observada en el control positivo de tripsina porcina; y efecto del extracto de soya sobre la actividad proteolítica del extracto de intestino medio.	73
Figura 28. Zimograma co-polimerizado con gelatina al 0,1% (m/v), utilizando diluciones decimales de tripsina de páncreas porcino y partiendo de 1 mg de la muestra.	74
Figura 29. Curva de actividad trípica obtenida para la cuantificación de la proteína bio-activa en el extracto de intestino de <i>H. hampei</i> , al comparar el área estimada respecto al logaritmo en base 10 de la masa de la muestra utilizada de extracto.	75
Figura 30. Efecto del pH sobre el extracto parcialmente purificado de <i>G. max</i>	76
Figura 31. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica en la fracción purificada de extracto de soya, utilizando reactivo cromogénico BApNA.	77

Figura 32. Actividades proteolíticas individuales obtenidas por los diferentes extractos y controles utilizados para comparar con cada extracto; y actividad inhibitoria obtenida con una mezcla de PMSF ó SKTI y tripsina porcina (1:1).	78
Figura 33. Actividad proteolítica individual de los extractos purificados de intestino medio de <i>H. hampei</i> y <i>G. max</i> , y efecto de mezclar extracto de soya junto con extracto de intestino medio de adultos de <i>H. hampei</i> sobre la actividad proteolítica neta en sustrato BApNA.....	79
Figura 34. Efecto obtenido después de mezclar diluciones decimales seriadas del extracto de soya ($2,857 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) junto con el extracto de intestino medio de adultos de broca ($0,5 \text{ mg/mL}$), cuya mezcla de reacción se incubó por un periodo de 10 min a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ sobre el sustrato DL-BApNA (2 mg/mL) a pH 9.0.	79
Figura 35. Efecto de mezclar diluciones decimales seriadas del extracto de soya ($2,857 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) sobre tripsina de páncreas porcino comercial ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), cuya reacción se desarrolló por un periodo de 10 min a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ sobre el sustrato DL-BApNA (2 mg/mL) y buffer glicina-NaOH (pH 9.0)	80
Figura 36. Gel electroforético SDS-PAGE para determinar el efecto de tripsina porcina y del extracto de soya sobre los cristales purificados de <i>Bti</i> , luego poner las muestras en contacto por 30 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$	81
Figura 37. Mortalidad obtenida mediante el análisis de regresión de Probit para la determinación de la dosis letal media sobre insectos adultos de <i>H. hampei</i> , incorporando concentraciones incrementales de <i>Bti</i> en la dieta Cenibroca II.....	82
Figura 38. Mortalidad obtenida del análisis de regresión de Probit para definir la dosis letal media sobre hembras adultas de broca, incorporando una dosis fija de cristales de <i>Bti</i> y concentraciones crecientes del extracto de soya en dieta Cenibroca II	83
Figura 39. Evaluación de los porcentajes de mortalidad de adultos de <i>H. hampei</i> , luego exponer los insectos por 7 días en dieta artificial Cenibroca II, suplementada con el extracto de cristales de <i>Bti</i> a $1,135 \text{ }\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, junto con dosis crecientes del extracto de soya	84

CAPÍTULO 1

Introducción

El café (*Coffea* spp.) es uno de los productos agrícolas más importantes dentro la región tropical, y constituye uno de los granos más valiosos por su distribución alrededor del mundo (Cárdenas, 2007; Molina, Blanco-Labra y Zamora, 2011). Centroamérica es la tercera región cafetalera del mundo y el café es en uno de los productos de mayor exportación por las formas de preparación de la bebida y por los derivados (chocolates, galletas, licores, entre otros); por lo que su producción se ha ligado con el desarrollo socioeconómico del istmo (Lara, 2005).

En las últimas décadas se ha incrementado la tendencia al consumo de café de calidad *gourmet*. No obstante, el desarrollo de plagas y enfermedades sobre el cultivo de café han llegado a limitar su producción en Latinoamérica. Una de ellas es la broca o taladrador del fruto del café (*Hypothenemus hampei*), que se ha considerado como plaga más devastadora y reincidente en los cafetales (Cárdenas, 2007; Chacón, 2008).

La broca es un insecto que pertenece al orden Coleoptera, familia Curculionidae y la subfamilia Scolytinae (Aguilera, 2012). Este herbívoro se desarrolla haciendo galerías y consumiendo el endospermo del grano durante su ciclo de vida, que utiliza como hospedero para reproducirse; situación que ha conllevado a un problema de índole comercial y social que ha repercutido en la calidad de la taza, reducción en el peso del fruto, caída de frutos vanos, entre otros (Hernández-Soto, 2002).

A pesar de que la aplicación de plaguicidas sintéticos ha sido uno de los métodos más efectivos para controlar la broca; se ha demostrado que estos químicos causan graves daños ambientales, favorecen el incremento proporcional de la resistencia y no en todos los casos eliminan las poblaciones de *H. hampei* debido a sus hábitos crípticos. Por este motivo, ha surgido una inherente necesidad de implementar alternativas biológicas para su control (Molina, 2010; Ochoa, 2011).

Una de las estrategias propuestas que se ajusta mejor a un programa de control integral y sostenible que proteja los ecosistemas agrícolas ha sido a través de la formulación de bio-insecticidas a base de las inclusiones cristalinas que secreta la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), cuyas proteínas tóxicas tienen la ventaja de ser biodegradables, inocuas hacia los vertebrados y específicas para atacar a un orden de insectos (Hernández-Soto *et al*, 2009; López, 2011). Esta estrategia de control se basa en que cuando la plaga ingiere los cristales proteínicos, se origina la lisis en la pared del epitelio del intestino hasta que ocurre su muerte por inanición o septicemia; mermando las poblaciones del insecto (Aguilera, 2012; Ochoa, 2011).

Aunque se ha comprobado experimentalmente la letalidad de las tales toxinas, se ha identificado un grupo de enzimas hidrolíticas compartimentalizadas dentro del lumen del epitelio del intestino medio, que podrían vincularse con la degradación de estas proteínas, y que se considera el posible mecanismo evolutivo mediante el cual las plagas se han defendido del efecto tóxico de *Bt* (López-Pazos y Cerón, 2010).

Las proteinasas de los insectos son enzimas proteolíticas que catalizan la ruptura de enlaces peptídicos en complejos proteicos para asimilar los aminoácidos de la dieta. Estas proteasas se clasifican según su función en serín, cisteín, aspártico y metalo-proteasas (Macedo & Machado, 2011). Valencia & Arboleda (2005) presumen que las proteasas que se encuentran en mayor proporción en *H. hampei* y que participan en procesos de digestión inicial son las enzimas serín- y aspártico-proteinasas.

Debido a la modulación y al procesamiento proteolítico que las proteasas ejercen en las cascadas de señalización, se ha propuesto que los insectos tienen mecanismos para secretar y sobreexpresan una mayor cantidad de proteinasas insensibles a *Bt* que sean capaces de cambiar la conformación de los sitios de unión de las toxinas o disolver las protoxinas hasta inactivarlas (López-Pazos *et al*, 2009; Oppert *et al*, 2006)

Dada la co-evolución entre la broca y el género *Coffea* como único hospedero y tomando en consideración los aspectos señalados anteriormente, se ha planteado la necesidad de buscar soluciones biotecnológicas que puedan mejorar la letalidad de *Bt*

frente a *H. hampei* (Molina *et al*, 2011). Algunas de estas estrategias han incluido la adición de factores de potenciación con proteínas vegetales como lectinas, inhibidores de α -amilasas e IPs (Blanco-Labra y Zamora, 2011; López, 2011; D'Mello, 2000).

Los inhibidores de proteasas (IPs) son proteínas de bajo peso molecular, que se encuentran ubicuamente en plantas, animales y ciertos microorganismos. Estas proteínas se originaron en respuesta a la herbivoría que sufrían las plantas para regular la actividad proteolítica (Jaber *et al*, 2010). Su mecanismo de acción propuesto consiste en una reacción específica en el centro activo las serín-proteasas, donde las proteasas reconocen al IP como un pseudo-sustrato, y cuyas reacciones conllevan a la formación de un complejo inactivo estable proteasa-IP que se ve reflejado en una insuficiencia metabólica y se traduce en efectos perjudiciales en la digestión de aminoácidos (Molina, 2010; Roberts *et al*, 2008).

Se ha mostrado evidencia de que los IPs podrían actuar sinérgicamente para potenciar el efecto subletal de las proteínas de *Bt* sobre las poblaciones de insectos, previniendo la degradación de las proteasas en el entorno de la broca, tanto las proteasas ambientales como las enzimas digestivas del escarabajo (Sanahuja *et al*, 2011). Basados en estos postulados, es de vital interés analizar si los inhibidores de proteasas pueden complementar el efecto tóxico de los cristales sin afectarlos.

Para alcanzar este cometido, se deben desarrollar metodologías de fraccionamiento y remoción de compuestos interferentes para extraer solo los IPs y las enzimas proteolíticas mediante técnicas como la precipitación con soluciones saturadas de sulfato de amonio y diálisis en membrana semipermeable; como primeros pasos en para dilucidar un IP o una proteasa blanco (Berg, 2002; Cutler, 2004). Por su parte, las δ -endotoxinas de *Bti* se deben aislar asépticamente en un medio con nutrientes limitado que facilite la esporulación y producción de las δ -endotoxinas, para purificarlo mediante gradientes de sacarosa (Bravo *et al*, 2012; Delafield *et al* 1968).

Posteriormente, se desarrollan pruebas moleculares para identificar, determinar el grado de pureza y estimar la actividad proteolítica/ inhibitoria de las enzimas. Las

técnicas que se han empleado tradicionalmente son la electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) para separar mezclas de proteínas por su tamaño molecular (Madriz-Ordeñaña *et al*, 2011); y la zimografía en gel sin añadir agentes desnaturalizantes e incorporando un sustrato para comprobar actividad proteolítica e inhibitoria de las proteasas y los IPs (García-Carreño, 1993).

Paralelamente se realizan pruebas en espectrofotometría con un sustrato cromogénico específico, que sea digerido por la proteasa de interés y que permita cuantificar la actividad proteolítica o inhibitoria sobre los extractos enzimáticos aislados (Correia *et al*, 2001). Con el método espectrofotométrico, también es posible estimar las condiciones operaciones (temperatura, pH) mediante las cuales opera el IP.

Antes de comprobar si el inhibidor posee un efecto potenciador sobre *Bt*, se puede hacer un SDS-PAGE haciendo una mezcla de cristales, proteasas e IPs para tener una idea global que indique si los IPs pueden prevenir la degradación de las toxinas, producto de la acción hidrolítica de las peptidasas. Finalmente, se llevan a cabo bioensayos en dieta artificial junto con un tratamiento estadístico, como paso final para probar si el extracto con los IPs complementa el efecto letal de los cristales de *Bt* y conduce a un mayor grado de mortalidad, dentro de un marco de regulación del metabolismo del escarabajo por alteración del perfil proteolítico (Oviedo, 2006).

Bajo estos fundamentos, el objetivo del presente proyecto se centró en extraer las endopeptidasas del intestino medio de *Hypothenemus hampei* y los inhibidores de serín-proteinasas (IPs) presentes en harina de frijol de soya (*Glycine max*), la cual posee un contenido proteico superior al 6% en los cultivos (Rashed *et al*, 2008), para llevar a cabo todos los ensayos bioquímicos, moleculares citados anteriormente; que permitan estimar el peso molecular relativo y el comportamiento enzimática de estas enzimas. Además, se propone desarrollar bioensayos que verifiquen si estas proteínas con actividad antimetabólica son capaces de sinergizar la actividad de un liofilizado purificado con las toxinas de *Bt* subs. *israelensis*, sobre hembras de *H. hampei*.

CAPÍTULO 2

Revisión de literatura

2.1 El café (*Coffea* spp.)

El café (*Coffea* spp., Rubiaceae) es el producto agrícola de mayor relevancia en 70 países de la región húmeda tropical. El género *Coffea* comprende 103 especies, pero en el mundo sólo se comercializan dos especies que son el café arábigo (*C. arabica* L.) y el café robusta (*C. canephora* L.). De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés FAO: *Food and Agriculture Organization*), este cultivo de café se produce en más de 10 millones de hectáreas (ha) en cerca de 80 países y aproximadamente 20 millones de familias subsisten de este cultivo (Jiménez, 2009; Vega *et al*, 2009). Centroamérica es la tercera región cafetalera del mundo y *Coffea* spp., se ha convertido en uno de los principales productos de exportación por las diferentes formas de preparación de la bebida y sus derivados; por lo que su producción se ha vinculado con el desarrollo socioeconómico de los países aledaños (Lara; 2005; Molina *et al*, 2011).

El cafeto es una especie leñosa perteneciente a la familia Rubiaceae, y está constituida por 600 géneros y 7.000 especies. El género *Coffea* ha sido domesticado por el ser humano, que comprende cerca de 10 especies domesticadas y 50 especies silvestres (Lagos-Giraldo, 2009). Los países que destacan en comercio internacional son Brasil (42,6%), Colombia (16,6%), Guatemala (5,6%), Perú (5,3%), Honduras (4,8%), México (4,3%) y Costa Rica (2%). El café arábigo es el producto más comercializado (60%) debido a su calidad superior y acreditación por los mercados consumidores; mientras que el café robusta se comercializa en un 40% debido a su elevada resistencia a plagas y menor costo de producción (Jiménez, 2009).

2.1.1 Origen y parámetros para la producción del cultivo de café

La producción de *C. arabica* inició su desarrollo en las tierras altas de más de 1.000 msnm de Etiopía y Sudán del continente africano, como parte del estrato arbustivo de la floresta. Luego, se difundió a diferentes partes del mundo durante los siglos XVI y

XVII, con un complejo intercambio de material genético. El café se propagó a Arabia Saudita, Amsterdam y París, y se cultivó en sitios que contaban con las condiciones ambientales idóneas, especialmente en algunas colonias de Europa (Damon, 2000).

Las condiciones climatológicas y edafológicas ideales para el cultivo de café requieren de un microclima fresco, con altitudes entre 1.200 y 1.800 msnm, con suelos de textura franca³ que posean un adecuado nivel de drenaje y que sea ricos en nutrientes (potasio y materia orgánica). Además, suelos donde se cultiva *Coffea* spp., deben ser profundos y pueden ser planos o ligeramente ondulados. Otros requerimientos a considerar para el cultivo del cafeto incluyen temperaturas medias anuales de 18,3 °C y 21,1 °C, precipitaciones anuales de 1.600-1.800 mm⁴ y niveles de humedad relativa de 70-95% (Mora, 2008).

2.1.2 Introducción y desarrollo de la caficultura en Costa Rica

Según Kutschbach y Gutiérrez (2006), *Coffea arabica* se introdujo en Costa Rica a principios del siglo XIX aunque su auge inició en 1850, donde una serie de investigaciones en campo permitieron determinar que el Valle Central contaba con condiciones óptimas para cultivar café, dadas las elevaciones de más de 1.200 msnm, suelos bien drenados y ricos en materia orgánica, suaves pendientes convexas y precipitaciones anuales moderadas de 1.500 a 2.000 mm. A finales de este siglo y principios de siglo XX, diversos caficultores empezaron a hacer ensayos de forma experimental para introducir otras especies de porte bajo como *C. liberica* y *C. canephora*, para ser comercializados (Granados 2004).

Durante el periodo de 1968 a 1988 en Costa Rica, la densidad de siembra anual del café se mantuvo en constante aumento, lo que incrementó el ingreso de divisas de \$55 millones a \$317 millones. Por ello, la actividad acefetalera sigue cobrando una gran valía económica y ha permitido que hasta el 2003, Costa Rica incursione en el mercado internacional con el 48% del cultivo nacional. Esta trascendencia alcanzada

³ De acuerdo con Brenes-Madriz *et al* (2009), los suelos con textura franca tienen una proporción de arena, arcilla y limo de 4:2:4, que se relaciona con el grado de fertilidad y retención de agua.

⁴ Según Mora (2008), el café no se debe cultivar en sitios con precipitaciones anuales superiores a los 3.000 mm.

se debió a la implementación de técnicas de calidad en el procesamiento de la cereza; lo que facilitó la selección de cultivos de elevada productividad y aquellos resistentes a plagas y enfermedades, estimularon la eficacia de la mano de obra y el uso intensivo de fertilizantes y agroquímicos (Mora, 2008; Renjifo, 1992; Rojas, 2012).

Entre la época de 1968 a 1987, el país sustituyó el 80% del área sembrada de los cultivares de porte alto, cosecha temprana y bajos rendimientos de *C. arabica* que corresponden a las variedades Typica, Bourbon y Mundo Novo⁵; por variedades de porte bajo que tuvieran densas ramificaciones y produjeran altos rendimientos en las primeras cosechas como Caturra, Catuai, Villa Sarchí y Catimor⁶. Lamentablemente; como estas últimas variedades poseen una base genética más estrecha, actualmente han mostrado una tendencia a perder su resistencia, producto de la rápida adaptación que la broca ha adquirido hacia las sustancias que producen las plantas de café (Gutiérrez *et al*, 1968; Phillips, 2001; Renjifo, 1992).

2.1.3 Sistema de producción del café en Costa Rica

El sistema de producción en eras que se ha implantado en parcelas de café en Costa Rica, sea con almácigos o semilleros; requiere una limpieza exhaustiva del terreno por deshierba; y se deben preparar curvas a nivel y cajones en el suelo para el riego. Para un adecuado desarrollo vegetativo, se deben llevar a cabo prácticas de podas a las raíces, deshije y remoción de brotes, aplicación de abonos orgánicos y fertilizantes cuando la planta alcanza la emergencia. Se debe considerar que el periodo de desarrollo tarda entre 145-245 días (Kutschbach y Gutiérrez, 2006; Mora, 2008).

Se debe destacar que el 70% del café costarricense se produce bajo semisombra por razones de calidad de los frutos, que suelen ser muy superiores a las cerezas obtenidas cuando las plantas se siembran bajo sol. Con el transcurso del tiempo, esta condición se ha estimulado por la siembra de plantas como guaba (*Inga spp.*), banano (*Musa cuoudeshi*), guineo (*Musa sapientum*), plátano (*Musa paradisiaca*) o árboles de poró

⁵ Mundo Novo es un cultivar que se originó por el cruce entre plantas de las variedades Typica y Bourbon.

⁶ La variedad Catimor es altamente productiva y también es resistente a la roya, *Hemilea vastratix*.

(*Eritrina* spp.) alrededor del sitio de siembra; que además de regular el microclima y la infiltración de humedad, favorecen el reciclaje de nutrientes, disminuyen las labores de fertilización, previenen el desgaste físico y adicionan materia orgánica en el suelo (Granados, 2004). En las regiones tropicales no es conveniente sembrar a pleno sol porque se genera una marcada producción bienal, en especial en aquellos sitios con mayores altitudes, donde el desarrollo de frutos declina por las bajas temperaturas y los daños ocasionados por el viento (López-Bravo, 2010).

Según Porras-Venegas (2006), las dos principales prácticas de manejo agronómico que se llevan a cabo en los cafetales del país son (1) el manejo semi-tecnificado, que aplica al 50% de los cultivares e incluyen un estricto control sanitario de las malas hierbas, el uso de fertilizantes N-P-K y la utilización ocasional de plaguicidas; y (2) el manejo tecnificado que se ha efectuado en el 40% de las plantaciones con densidades de siembra de 5.700 ha, y donde se realiza un control sanitario con maquinaria agrícola y un uso intensivo de fertilizantes (500 a 1.000 kg·ha) y agroquímicos.

2.1.4 Época de siembra y regiones donde se cultiva café en Costa Rica

La preparación del terreno y resiembra para cultivar café en el país se realiza rutinariamente entre finales de diciembre y febrero ó marzo, respectivamente. Dado que durante el mes de mayo suelen aparecer las primeras precipitaciones y ocurre una floración sincrónica de todas las plantas, la frecuente recolección de las cerezas se efectúa entre principios de julio y de diciembre; aunque en las regiones más altas del país, dicho periodo se puede extender a finales de diciembre. En esta época, se realizan aplicaciones de fungicidas y de insecticidas para evitar la propagación de plagas y algunos hongos fitopatógenos (López-Bravo, 2010).

En la época de 1850-1935, la caficultura que se había desarrollado especialmente alrededor de San José, se expandió a regiones aledañas del Valle Central y después se trasladó a cantones más alejados como Acosta, Puriscal, Tarrazú y Tilarán. Hacia 1962, la producción cafetalera se incorporó en Coto Brus, San Carlos, Sarapiquí y la Península de Nicoya (Granados, 2004). Para el 2006, se estimó que la caficultura se

halló en los cantones de Pérez Zeledón, Buenos Aires, Liberia, Garabito, Cartago, Paraíso, La Unión, Turrialba, Jiménez, Sabanilla de Montes de Oca, Escazú, San Ramón, Grecia, Barva, San Rafael, San Isidro y San Pablo de Heredia (Mora, 2008).

A pesar de la incursión cafetalera en otras zonas del país durante el siglo XX, el Valle Central se mantiene como el punto de propagación del café por excelencia, el centro de experimentación de los sistemas agrícolas y el sitio de impacto ambiental referente en el país; no sólo por superficie cultivada, sino también por su volumen y calidad de la cosecha; (Granados, 2004). En el cuadro 1, se distinguen algunos cantones productores de café y el comportamiento a nivel productivo nacional, durante la cosecha comprendida entre los periodos de los años 2009 al 2010 y del 2010 al 2011.

Cuadro 1. Producción de café fruta por cantón en los periodos de cosecha de 2009-2010 y 2010-2011.

Periodo	2009-2010		2010-2011	
Región cafetalera*	Fanegas⁷	Índice de producción (%)	Fanegas	Índice de producción (%)
Pérez Zeledón	264.935	13,7	211.803	10,1
Tarrazú	168.361	8,68	166.638	7,92
Coto Brus	153.688	7,93	119.453	5,68
Naranjo	104.830	5,41	156.430	7,44
León Cortés	124.973	6,44	136.603	6,49
Alajuela	111.670	5,76	127.059	6,04
Desamparados	127.192	6,56	125.376	5,96
San Ramón	103.560	5,34	113.960	5,41
Cartago	72.242	3,72	98.821	4,69

⁷ Una fanega de café es una medida de capacidad que equivale a un volumen de 400 L o a un peso aproximado de 253 kg de frutos.

Grecia	49.889	2,56	89.892	4,27
Otros	657.634	33,9	757.253	36,0
Prod. Nacional	1.938.974	100	2.103.287	100

*/ Con base en las regiones cafetaleras definidas por el Reglamento a la Ley No. 2.762. Fuente: ICAFE, 2011.

De acuerdo con la información suministrada por el ICAFE en el 2011, durante la cosecha del periodo 2010-2011, la región Brunca experimentó una disminución considerable en la producción de café con respecto a la cosecha anterior; en especial en Pérez Zeledón y Coto Brus donde el índice de producción pasó de 13,7% a 10,1% y de 7,93% a 5,68%, respectivamente. En el resto de cantones, la producción de café se mantuvo casi invariable, disminuyó en ~1% ó sufrió un ligero repunte; que se observó notablemente en Naranjo (de 5,41% a 7,44%) y Grecia (de 2,56% a 4,27%).

2.1.5 Importancia agronómica del café en Costa Rica

Las plantaciones de café constituyen una de las formas más relevantes de uso de la tierra en las regiones tropicales húmedas, dado el impacto económico que ha generado en diversos países. El café ha representado uno de los productos de mayor importancia socioeconómica para los pequeños y medianos agricultores en Centroamérica (Merlo-Caballero, 2007). En el año 2006, el ICAFE estimó que el área cultivada con café en Costa Rica fue de 98.681 ha. Por su parte, la producción nacional de cosecha en el periodo 2010-2011 llegó a 2.103.287 fanegas (1 fanega ≈ 400 L de café cereza), que generó más de \$383 millones de divisas. Por su parte, en el 2010, los ingresos por las exportaciones de café correspondieron al 11,77% de las divisas generadas por el sector agropecuario nacional (Rojas, 2012).

En las últimas décadas, se ha incrementado la tendencia al consumo de café fino y con elevados estándares de calidad, que ha permitido la apertura de nuevos mercados y un mejor posicionamiento de la actividad cafetalera. A pesar de ello, el desarrollo de plagas y enfermedades sobre el cultivo de café han disminuido y limitado su desarrollo en América Latina (Cárdenas, 2007; Chacón, 2008; Molina, 2010).

Según Lagos-Giraldo (2009), se han descubierto más de 100 especies de insectos que conviven en armonía con las plantaciones de café. No obstante, hay tres de estos herbívoros que ocasionan un severo impacto negativo sobre el café y son la broca (*Hypothenemus hampei*), el minador de la hoja (*Leucoptera coffeellum*) y la palomilla de las raíces (*Dysmicoccus* spp). Dado que la broca es el insecto más persistente y de mayor incidencia en Costa Rica, esta investigación hará hincapié en su análisis.

2.2 La broca del café (*Hypothenemus hampei*)

Hypothenemus hampei (Ferrari), comúnmente denominado la broca o perforador del fruto de café, es la plaga más devastadora del fruto comercial alrededor del mundo. Éste es un insecto monófago que se alimenta únicamente del endospermo del fruto, provocando un deterioro generalizado del grano y por ende, de la calidad de la taza. Todo su ciclo de vida se desarrolla en la cereza, y utiliza el interior del grano como sitio de desarrollo, reproducción y refugio (Bustillo-Pradey, 2005; Casco-Gómez, 2012; Constantino *et al*, 2011; Fernández y Cordero, 2007; Pereira *et al*, 2007).

2.2.1 Descripción y biología de la especie

En un principio, este insecto se nombró como *Stephanoderes hampei*, *Xyleborus coffeicola* y *Xyloborus coffeivorus*; hasta 1960 cuando Le Pelley le acuñó el nombre científico actual, *Hypothenemus hampei*. Este coleóptero pertenece al Phylum Arthropoda, clase Insecta, orden Coleoptera, familia Curculionidae, subfamilia Scolytinae, género *Hypothenemus* y especie *hampei*. La broca vive a través de asociaciones simbióticas con levaduras y hongos, que les permiten atraer a otros individuos, por ello; las galerías que elabora este coleóptero en la cereza, adquieren coloración azul-verdosa (Cárdenas *et al*, 2007; Vega *et al*, 2009).

El escarabajo en estadio juvenil (Carmelita) es de color pardo y cambia a pardo oscuro, transcurridos cuatro a cinco días de edad (Figura 1). El macho nace primero, es incapaz de perforar el fruto, no puede volar porque los músculos de sus alas están atrofiados y tiene una longevidad entre 50 y 75 días; mientras que la hembra es más grande y vive entre 100 y 150 días. Cuando ésta ingresa al grano, oviposita entre dos

a tres huevos diarios por 20 días; aunque el ritmo de postura varía según la estación y edad de la hembra (Benavides *et al*, 2012; Molina, 2010; Rubio *et al*, 2008).



Figura 1. Vista macroscópica de brocas hembras observadas a través de estereoscopio: a) hembra en etapa juvenil (Carmelita), b) hembra en fase adulta.

Este coleóptero puede infestar cerca de 800.000 ha de café cuando se encuentra a un rango de altitud óptima entre 800 y 1.000 msnm, mientras que en alturas superiores, esta plaga no representa un problema económico (Constantino *et al*, 2011). Las fluctuaciones de broca varían con base en la estación climática; ya que en la estación seca las hembras permanecen semi-inactivas en granos maduros, esperando las primeras lluvias y a que las temperaturas lleguen a 27 °C, que estimulen a las hembras a salir del grano para buscar nuevos frutos y reiniciar el ciclo de vida. Si existen las condiciones ambientales adecuadas y la producción de café es constante durante el año, el insecto puede alcanzar hasta ocho generaciones, pero usualmente llega a dos o tres por año (Cárdenas *et al*, 2007; Fernández y Cordero, 2007).

Fernández y Cordero (2007) estudiaron el ciclo de vida de la broca *in vitro* en Colombia y determinaron que las etapas de desarrollo tienen una duración promedio de 5 días la etapa de huevo, 11 días el periodo de larva, 3,5 días la condición de prepupa y 5 días la fase de pupa, a 27 °C; y presumieron que el ciclo completo tardó entre 18 y 31 días hasta alcanzar la fase adulta. La cópula dentro de la cereza ocurre por unas horas y puede ser consanguínea porque los machos no transmiten sus genes debido al fenómeno de “haploidía funcional” (Silva *et al*, 2012). Considerando que los machos no abandonan el grano, pueden fertilizar hasta 30 hembras cuando la hembra alcanza la suficiente madurez sexual que suele ser de 5 a 6 días después de la post-emergencia del adulto (Damon, 2000). Dado que el apareamiento ocurre en

cualquier momento del día, es común hallar individuos en diferentes etapas de desarrollo dentro del grano de café infestado (Hernández-Soto, 2002).

Ochos días después de la copulación, las hembras salen del fruto y vuelan en busca de un grano nuevo para ovipositar y continuar el ciclo. Dicho vuelo es estimulado en virtud de una serie de factores como las corrientes de aire, el grado de humedad y radiación solar, y cuando se produce agotamiento, sobrepoblación, anegamiento o pudrición de la cereza. En algunas ocasiones, la hembra penetra la corona del fruto y otras ingresa en el borde, a los lados o en la base de la cereza (Jiménez, 2009).

Cuando la hembra halla un hospedero adecuado, ayudada mediante estímulos semiquímicos que libera el fruto de café; ingresa al endospermo, excavando el exocarpo, mesocarpo y el endocarpo y construyendo galerías (Figura 2), etapa que puede demorar cerca de 8 h. Posteriormente, el insecto ovoposita entre 31 y 119 huevos, proceso que varía dependiendo de la madurez del fruto. Cuando los huevos eclosionan a larvas, se empiezan a alimentar del fruto durante 19 días para desarrollarse y crecer hasta alcanzar la etapa de adulto, para que las nuevas hembras que eclosionen se puedan mantener infestando otros granos (Pereira *et al*, 2007; Rubio *et al*, 2008; Silva *et al*, 2012; Vega *et al*, 2009).

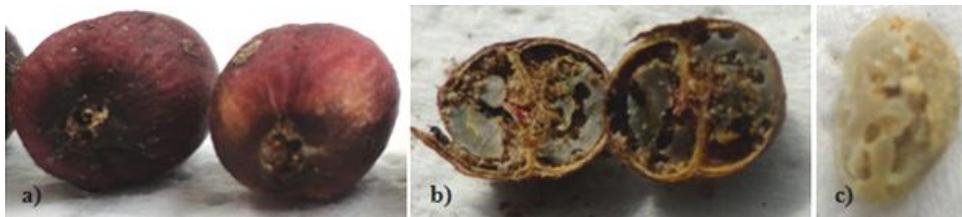


Figura 2. Daños físicos causados por la broca del café: a) daños superficiales hechos sobre las corona del fruto de café, b) lesiones físicas causadas por adultos, alimentándose dentro del fruto c) galerías producidas por insectos adultos de *H. hampei*.

2.2.2 Origen y distribución geográfica de la broca en Costa Rica y el mundo

H. hampei es originaria del centro de África Ecuatorial (Guinea, El Congo, Uganda, Kenia) y fue Ferrari quien la descubrió y la clasificó en Francia en 1867, a partir de granos importados. El primer registro de este escarabajo como plaga en campo se

Los ataques producidos por la broca se pueden dividir con base en la edad del tejido de la planta y la época de formación de frutos, que está influenciada por el método de poda que se practique (Damon, 2000; Rojas, 2012).

2.2.3 Problemas agronómicos que produce *H. hampei*

La hembra penetra el endospermo del grano; sin afectar hojas, ramas o tallos, y ocasiona pérdidas económicas, que ascienden los \$40 millones por año (Pereira *et al*, 2007). Tales prejuicios son (1) producción del al menos un 21% de frutos vanos de bajo peso que reducen los rendimientos y la calidad organoléptica de la taza, cuyas pérdidas se estiman en 15,9 kg por fanega; (2) desarrollo de granos donde puede ingresar humedad y son vulnerables a la infección por hongos y bacterias (como el agente causante de la pudrición húmeda, *Erwinia* sp.) y oxidación de la cereza; que ha provocado pérdidas de hasta 9%; y (3) perforación de frutos inmaduros donde la broca no se reproduce pero induce caída prematura, senescencia y aborto del fruto; lo cual sucede al inicio de la temporada o cuando hay una frecuente cosecha (Fernández y Cordero, 2007; Hernández-Soto, 2002; Rubio *et al*, 2008; Vega *et al*, 2009).

2.2.4 Manejo integrado de la broca del café

El manejo integrado de este escarabajo se debe establecer con prácticas de control cultural como la regulación de sombra, poda, deshija y remoción de malezas; para reducir la multiplicación del insecto y facilitar las labores de cosecha. Estas labores se deben complementar con un eficiente control etiológico, monitoreo de ataque y un control biológico con depredadores (p.e *Karnyothrips flavipes*), parasitoides (p.e. *Phymastichus coffea*, *Cephalonomia hyalinipennis* y *Heterospilus coffeicola*), hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, o bacterias entomopatógenas como *Bacillus thuringiensis* como nuevas alternativas biotecnológicas (Bustillo-Pradey, 2005; Pereira *et al*, 2007; Silva *et al*, 2012).

2.2.4.1 Medidas culturales

El control cultural de los focos de contaminación y reproducción de la broca es la principal línea de defensa para disminuir las poblaciones de esta plaga en las regiones

donde se manejen grandes extensiones de café. Algunas las prácticas de sanitización que se han implantado han sido la remoción manual o mecanizada de los frutos infestados después de la cosecha, el tratamiento químico de los vertederos donde se dispensan los frutos dañados y el trapeo en masa con atrayentes químicos (Vidal-Quist, 2010). Sin embargo, la definición del éxito de estos métodos es sumamente complicada porque su utilización se debe llevar a cabo a gran escala y varía de acuerdo con el sistema de producción agrícola desarrollado (Messing, 2012).

2.2.4.2 Control químico

La mayoría de caficultores controlan *H. hampei* administrando insecticidas como fenitron, endosulfán, clorpirifos y pirimifos; que han logrado obtener un mediano o alto éxito. Pese a ello, estas sustancias no son sustentables y su uso se ha restringido por la Agencia de Protección Ambiental (EPA, del inglés *Environmental Protection Agency*) (Blanco-Labra y Zamora, 2011; Casco-Gómez, 2012; Molina *et al*, 2011). Poveda *et al* (2006), analizaron que formulaciones con clorpirifos, metil-pirimifos, fenitrothion y fenthion; que se ubican en la categoría toxicológica III; presentaron una actividad biológica inferior a 15 días sobre *H. hampei*, por lo que mencionaron que la eficiencia de los químicos ha tendido a decaer en los últimos años.

Se estima que el en ~70% de los cafetales en América Latina, las plagas se controlan mediante agroquímicos. Esta situación ha ocasionado una problemática económica, social y ambiental debido a una serie de factores, dentro de los cuales destaca la adaptación de los insectos hacia los químicos (Poveda *et al*, 2006). Económicamente, desarrollar insecticidas mejorados contra plagas ha generado un incremento en costos que ascienden los \$400 billones y aún así, su eficiencia continúa siendo menor (39%) comparada con el control de malezas (75%) en la actividad cafetalera (López-Pazos y Cerón, 2010). A nivel social y ecológico, el elevado uso de plaguicidas ha causado la muerte y enfermedades en humanos y prejuicios en el ambiente; cuando se estima que sólo se requiere una fracción del insecticida para erradicar la población de insectos, el resto del producto aplicado que suele ser el 99,9% ingresa en el suelo, agua y cadena trófica (Ramírez-Lepe & Ramírez-Suero, 2012).

Además, el uso de insecticidas para controlar *H. hampei* no siempre exhibe resultados efectivos, debido a los hábitos crípticos de este herbívoro y considerando que las aspersiones de químicos sólo son eficientes cuando se aplican en el momento en que el insecto va a penetrar la corona (Figura 4), ya que una vez que el escarabajo ingresa a la cereza, el químico no ofrece una solución satisfactoria (Lagos-Giraldo, 2009).

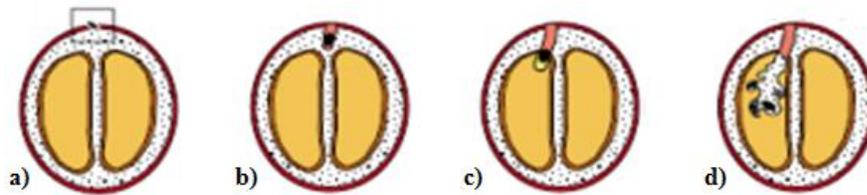


Figura 4. Posiciones de penetración de la broca. a) La hembra comienza a penetrar la corona del fruto, b) el adulto alcanza el canal de penetración, c) *H. hampei* penetra el fruto y oviposita, d) la broca y su descendencia (huevos, larvas y pupas) se alimentan del endospermo. Fuente: Lagos-Giraldo, 2009.

Tomando en cuenta las condiciones climáticas de Costa Rica, la floración del cultivo del café suele ser sincrónica, y los frutos emergidos son susceptibles al ataque de la broca. Esta problemática haría necesario un uso extensivo de insecticidas y puede causar daños a la salud de los trabajadores y a la flora y fauna en regiones aledañas, problemas de contaminación ambiental por daños indirectos sobre fuentes de agua y alimento, desequilibrios biológicos y la posible aparición de nuevas plagas. En Costa Rica, aunque se deberían hacer las aplicaciones de químicos sólo cuando la infestación alcanza el 5% de los frutos formados, diversos grupos de caficultores no cumplen con tal disposición (Bale *et al*, 2008; Molina, 2010).

2.2.4.3 Métodos de control biológico

El rápido agotamiento de recursos naturales y la demanda de una productividad agrícola sostenible; particularmente en las regiones tropicales, donde el clima brinda un ambiente propicio para el desarrollo de insectos, han promovido la creación de alternativas biológicas para establecer y/o fortalecer programas de combate de plagas eco-amigables (Blanco-Labra y Zamora, 2011). Estos métodos, aunque no han mostrado resultados satisfactorios en todos los casos, no erradican completamente las densidades de insectos, son más costosos y requieren un mayor tiempo de respuesta

en relación con los agroquímicos para eliminar plagas; son posibilidades más acordes con una realidad más sostenible y podrían asegurar la bioseguridad de los alimentos que llegan al consumidor (Bale *et al*, 2008; Prabhakar, 2001; Vásquez-Pineda, 2012).

La alternativa clásica de control biológico ha sido mediante depredadores y parasitoides. No obstante, esta opción es poco rentable en cuanto a producción; tiene inconvenientes cuarentenarios, considerando los requerimientos para introducir parasitoides exóticos⁸; y sólo se produce un impacto significativo en poblaciones cuando los insectos se liberan de masivamente (Hernández-Soto, 2002). Otra posibilidad sería usar hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* ó *Metarhizium anisopliae*, cuyas cepas liberadas han producido en varios casos respuesta limitada a la dosis administrada, ya que su acción se da cuando el fruto no se taladra profundamente y no tiene humedad excesiva, de lo contrario estos factores repercuten sobre la viabilidad del hongo (Messing, 2012).

Una de las estrategias más eficientes para proteger los agroecosistemas ha sido mediante la formulación de insecticidas a partir de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Las protoxinas de *Bt* tienen la cualidad de que se pueden formular solas o en combinación con productos químicos, son inocuas y seguras para el usuario, el agroecosistema, la entomofauna y el resto de organismos no diana (Bale *et al*, 2008; Subramaniam *et al*, 2012). López-Pazos *et al* (2009) publicaron que la comercialización de bioproductos de *Bt* ha permitido sustituir el uso de ~21.000 ton de agroquímicos sobre cultivos de maíz y algodón en 60-80% por los biocidas de *Bt*.

Se han hecho diversas investigaciones para estimar la dosis sub-letal que produce *Bt* subs. *israelensis* sobre la broca, por ejemplo López-Pazos y Cerón (2010) demostraron que el complejo spora-cristal de *Bti* exhibió una concentración letal media (LC₅₀) de 219,15 ng de cristal·cm⁻² en dieta artificial sobre sus larvas, indicando que la dosis requerida fue baja y los cristales incidieron sobre la supervivencia del insecto. Por su parte, De la Rosa *et al* (2005) comprobaron que de

⁸ La mayor parte de parasitoides son transportados desde África hacia América Latina.

aplicar las toxinas de cepas nativas de *Bt* subs. *israelensis* sobre larvas de *H. hampei*, se obtuvo un tiempo de muerte media (LT₅₀) de 6,1 días en promedio, que es bastante aceptable considerando que cada individuo puede comportarse diferente con el tiempo, aunque se manipulen condiciones controladas de laboratorio.

2.3 *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

2.3.1 Origen y aspectos generales

Bacillus thuringiensis fue aislada por primera ocasión por el bacteriólogo japonés Shigetane Ishiwata (1901), de larvas del gusano de seda (*Bombyx mori*, Lepidoptera) en Japón. Posteriormente, Aoki & Chigasaki (1915) y Mitani & Watarai (1916) purificaron una sustancia tóxica de un medio de cultivo de *Bt* esporulado. Ernst Berliner (1915) redescubrió y nombró la especie a partir aislamientos de larvas de la polilla de la harina del Mediterráneo (*Ephestia kuehniella*, Lepidoptera), las cuales se recolectaron de Thürigen, Alemania. Además, Berliner fue el primero en describir las inclusiones paraesporales, que constituyen una característica fenotípica que diferencia a *Bt* de otras especies de *Bacillus* (Figura 5) (Bravo *et al*, 2012). A finales de 1930, se empezaron a comercializar los primeros preparados a base del complejo espora-cristal y que se denominaron insecticidas *Bt*, dado el éxito en el desarrollo de cultivos resistentes a insectos perforadores que expresaron genes *cry* (Lecadet *et al*, 1980).

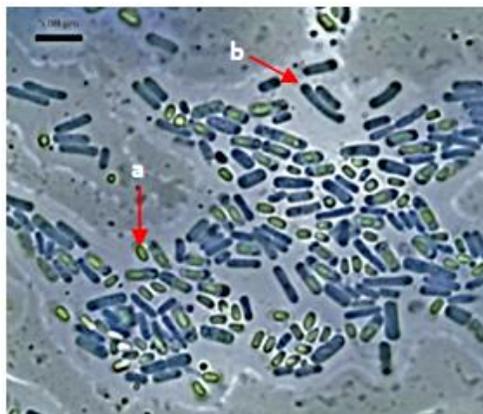


Figura 5. Vista microscópica de las estructuras morfológicas producidas por la bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (A: 100 X); a) morfología de una espora, b) morfología de una célula vegetativa de *Bacillus thuringiensis*. Fuente: Ramírez-Lepe & Ramírez-Suero, 2012.

2.3.2 Ecología de *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis es una bacteria entomopatógena, aerobia facultativa, Gram-positiva, de flagelación peritrica, quimioorganótrofa con actividad catalasa y que mide de 3 a 5 μm de largo por 1,2 μm de ancho. Esta especie pertenece al Phylum Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales, familia Bacillaceae, género *Bacillus*, especie *thuringiensis*. *Bt* es un microorganismo del suelo porque es el medio más frecuente del que se ha aislado, aunque se ha comprobado que *Bt* se puede encontrar en nichos ecológicos como excrementos, agua, hojas deciduas y de coníferas, cadáveres de insectos, granos almacenados y ambientes marinos; por lo que se considera como especie ubicua (Lightwood *et al*, 2000; Vásquez-Pineda *et al*, 2012).

2.3.3 Biología de la especie y factores tóxicos de *Bt*

El ciclo de vida de este microorganismo presenta dos fases características que son la fase de crecimiento vegetativo, donde las bacterias se duplican por bipartición; y la fase de esporulación que se desencadena cuando *Bt* está en un medio con limitación de nutrientes. Durante la segunda fase, en más del 20% de las esporas se sintetiza una serie de inclusiones proteicas adyacentes a la endospora llamadas inclusiones paraesporales proteicas, cristales proteicos Cry/Cyt o δ -endotoxinas; de naturaleza proteica y que poseen propiedades insecticidas (Figura 6) (Díaz-Mendoza, 2006).

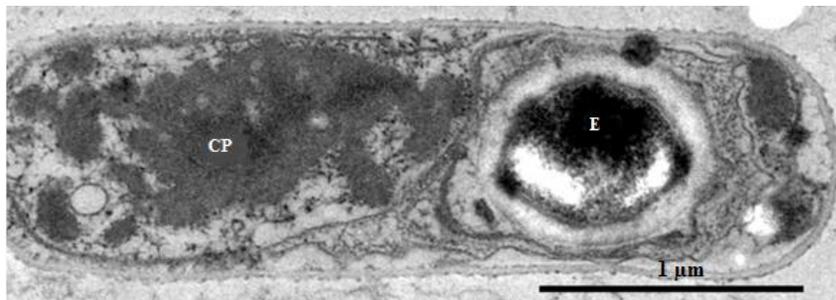


Figura 6. Microscopía de transmisión electrónica del esporangio de una cepa recombinante de *B. thuringiensis* (pSTAB-cry10). CP: cuerpo paraesporal, E: espora. Fuente: Hernández-Soto *et al* (2009).

Los cristales Cry se clasifican según su forma en cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos, bipiramidales y otras formas atípicas. Estos cristales se encuentran dentro del esporangio de los cuerpos paraesporales; donde algunos se liberan después de la

lisis celular y otros permanecen adheridos a la espora luego de la lisis (Brar *et al*, 2007; Sauka y Benintende, 2008). Por su parte, las citolisinas o proteínas Cyt son proteínas más pequeñas, que poseen menor especificidad, tienen mecanismo distinto al de las proteínas Cry y en ciertos casos presentan actividad hemolítica sobre los eritrocitos de vertebrados, por lo que su utilización *in vivo* es poco frecuente (Grandvalet *et al*, 2001; Ramírez-Lepe & Ramírez-Suero, 2012).

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (*Bti*) o serotipo H-14 es una de las subespecies de *Bt* que fue descubierta por Goldberg y Margalit en 1977, y que exhibe toxicidad específica hacia los dípteros, aunque recientemente se ha comprobado su espectro de toxicidad a coleópteros como *H. hampei* (Hernández-Soto *et al*, 2009).

2.3.4 Propiedades de los bioinsecticidas derivados de proteínas Cry

Debido a su inocuidad y seguridad al agroecosistema, y a que no se ha comprobado efecto negativo alguno sobre mamíferos o invertebrados que no sean el insecto diana; las proteínas Cry son ecológicamente aceptadas y se podrían comercializar como biopesticidas (Mora *et al*, 2007). Además, considerando su especificidad, se pueden preparar formulados de las toxinas de una cepa de *Bt* para atacar un tipo específico de insectos en los órdenes Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera, Homoptera, Phthiraptera, Orthoptera, Acari ó Mallophaga a concentraciones subletales tan bajas como 10^{-3} y 10^{-4} $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cao *et al*, 2008; Subramaniam *et al*, 2012).

El efecto residual de las proteínas Cry depende de la formulación y de las condiciones climáticas de aplicación. No obstante, se ha estimado que los niveles de persistencia de los cristales en la superficie de las hojas son mínimos porque luego de pocos días de que se aplica el formulado factores como la luz UV, la calidad del agua empleada en el riego, las elevadas temperaturas y presencia de proteasas ambientales contribuyen a su degradación, suele aumentar la densidad de larvas que atacan al cultivo y el comportamiento de ingesta de las protoxinas *Bt* por parte del insecto diana (Ben-Dov *et al*, 2003; Ghodke *et al*, 2012).

Glare & O'Callaghan (1998) probaron que luego de que un grupo de ratones ingiriera 2×10^{12} esporas de *Bti*·kg⁻¹ de dieta y que un grupo de humanos voluntarios consumieran 3×10^9 esporas·kg⁻¹ por 5 días consecutivos, los individuos no sufrieron efectos negativos ni se enfermaron. Tampoco se han comprobado repercusiones negativas sobre aves, cerdos o conejos y estos autores destacan que ni siquiera ingestiones superiores a 10^{12} UFC·animal⁻¹ afectan el peso de ratas ni ratones *in vitro*. Asimismo, reportes de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) determinaron que a dosis de ingesta superiores a dosis superiores a 10^6 o 10^7 del complejo espora-cristal no se afectó la supervivencia de ratones; debido a que los mamíferos carecen de pH alcalino (entre 8 y 11) y no cuentan con receptores específicos; que son dos requerimientos para que las δ -endotoxinas se activen y se puedan formar los poros líticos dentro del intestino medio (Ochoa y Arrivillaga, 2009; Sanahuja *et al*, 2011).

2.3.5 Mecanismo general de acción tóxica de las proteínas Cry

Brar *et al* (2007), Bravo *et al* (2012), Lomate & Hivrale (2011), Macgregor (2001) y Sanahuja *et al* (2011) describen el mecanismo de acción general de *Bt* sobre los herbívoros en varias etapas principales, en el caso de observar un escenario exitoso: solubilización del cristal, procesamiento y activación de la protoxina, unión al receptor, inserción en la membrana, formación de poros y lisis celular (Figura 8).

- 1) Solubilización del cristal en el intestino medio: las condiciones reductoras y el pH del tubo digestivo del insecto en el momento en que ingiere proteínas Cry, son condiciones óptimas para disolver la estructura monomérica de los cristales, por lo que se hacen susceptibles a la acción de las proteasas digestivas, que a la vez son responsables de la activación de los cristales. En algunos casos, se ha demostrado que la solubilidad determina la especificidad de las proteínas tóxicas de *Bt*.
- 2) Procesamiento proteolítico y activación de las toxinas Cry: cuando las protoxinas Cry se solubilizan, son procesadas por proteasas digestivas del insecto, dando lugar a una toxina en cierta medida resistente a la acción de las proteasas, que tiene un peso molecular de 60-70 kDa. El procesamiento de las

toxinas está determinado por un corte en el extremo N-terminal y por otro en el extremo C-terminal (Figura 7).

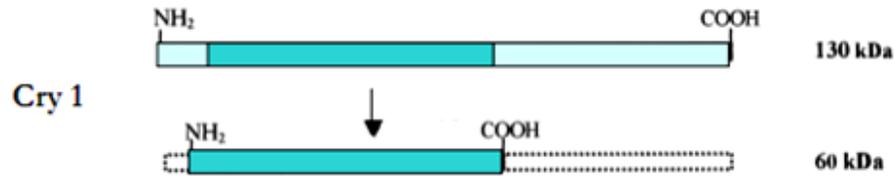


Figura 7. Esquema del procesamiento de las protoxinas Cry1. Protoxina (130 kDa) y toxina activa (60 kDa). Fuente: Díaz-Mendoza, 2006.

- 3) Unión al receptor: cuando el cristal se activa, puede atravesar la membrana peritrófica y se une a los receptores específicos, situados en vesículas de membrana de borde en cepillo (BBMV, del inglés *Brush Border Membrane Vesicles*) de las células de epitelio del intestino medio. Se ha demostrado que estos receptores corresponden a la familia de las cadherinas. Cuando los receptores se unen a las proteínas Cry, se produce el procesamiento de la α -hélice de la toxina, que genera un cambio de conformación y deja regiones hidrofóbicas expuestas, se induce la formación de oligómeros y la posterior disrupción de los cilios.
- 4) Inserción en la membrana, formación del poro y lisis celular: cuando los oligómeros se insertan en la membrana del epitelio intestinal, se forma una estructura de pre-poro oligomérico, donde la cadherina desplaza las balsas lipídicas (*lipid rafts*), la toxina se inserta y se forma el poro; cuya estructura suele ser similar a un paraguas.
- 5) Lisis celular: el poro facilita el aumento de la permeabilidad de la membrana en células epiteliales, donde se inicia la cascada de señalización dependiente del ión K^+ , que estimula la exocitosis de la cadherina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical de la célula. La formación del poro y la exocitosis inducen la generación de una diferencia de potencial que provoca una disrupción en el flujo osmótico de agua, cationes, aniones y algunas moléculas de mayor tamaño y que se ubican entre el lumen y el citoplasma.

- 6) Septicemia: luego de la lisis, se desequilibra el sistema que mantiene el gradiente de pH que impide la asimilación y retención de componentes vitales del insecto, que conduce a la muerte de las células epiteliales del tracto digestivo por liberación del contenido intestinal en la cavidad del poro, por el fenómeno de citólisis osmótica.

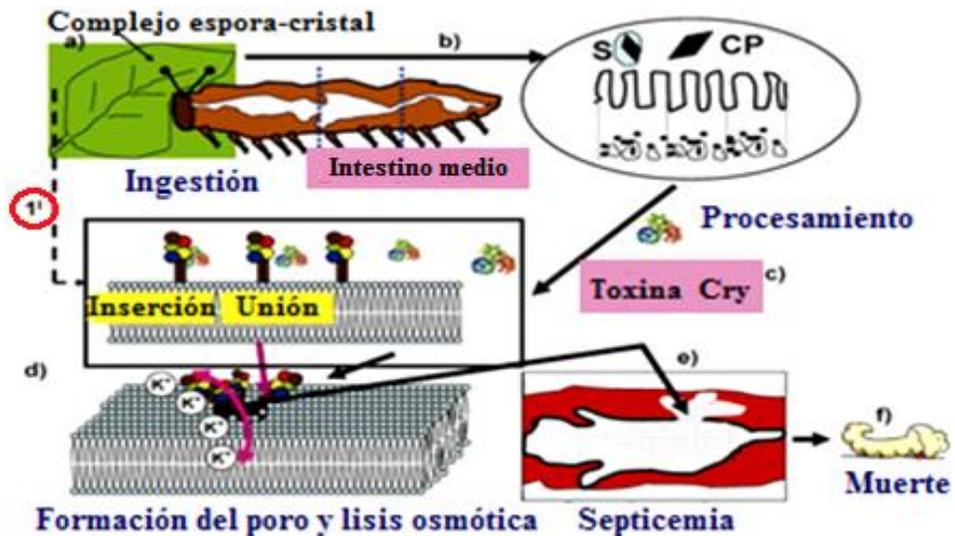


Figura 8. Mecanismo de acción tóxica del complejo espora-cristal de *Bt*, a) ingestión de esporas y cristales, b) solubilización del cristal, c) procesamiento de proteínas Cry en toxinas activas, unión a receptores en el epitelio e inserción en la membrana celular, d) interrupción de la bomba de iones, formación de poros y lisis osmótica, e) afección del intestino, septicemia y muerte. 1' representa la toxina pre-hidrolizada, por lo que al ser ingeridas, actúa con las proteasas para entrar en el sitio de unión al receptor. S: espora, CP: cristal proteico. Fuente: Brar *et al*, 2007.

2.3.6 Otros factores de virulencia

Además de las δ -endotoxinas, existen otras proteínas y metabolitos extracelulares tóxicos que algunas cepas de *Bt* pueden secretar previa la etapa de esporulación como componentes menores y son (1) β -exotoxinas, producidas en la fase vegetativa y son agentes causantes de gastroenteritis en el ser humano (Ginsburg, 2006); (2) proteínas vegetativas insecticidas (Vips) que son secretadas en la fase vegetativa y que tienen actividad sobre coleópteros y lepidópteros; (3) enterotoxinas; (4) hemolisinas; (5) fosfolipasas, (6) proteasas y (7) quitinasas. Cabe resaltar que la mayoría de estos factores de virulencia no son exclusivos de *Bt*, sino que también se han encontrado en

la especie *B. cereus*, incluso en mayor proporción que en *Bt* (Brar *et al*, 2007; Ochoa y Arrivillaga, 2009; Vidal-Quist, 2007).

2.3.7 Aplicaciones biotecnológicas e implicaciones de utilizar formulados de *Bt* para el control biológico de insectos del orden Coleoptera

El éxito logrado en la administración de biocidas formulados a base de las δ -endotoxinas en regiones tropicales como estrategia de control se relaciona con sus propiedades únicas, es amigable con el ambiente y posee un elevado espectro de actividad comparable con el de otros agroquímicos. Por este motivo es que estos biocidas abarcan el ~90% del mercado mundial, y sus ganancias ascienden a \$600 millones (Ghodke *et al*, 2012; López, 2011).

La posibilidad de escalar la producción de sus toxinas mediante sistemas de fermentación para crear formulados en forma de polvo, mojables, concentrados líquidos, emulsiones, granulados, *pellets*, *briquettes*, concentrados en aerosol, cebos y anillos de liberación lenta; responden a las exigencias de un mercado cada vez más competitivo. En Costa Rica, se ha verificado toxicidad de cepas *Bt israelensis*, *Bt morrisoni*, *Bt thompsoni* y *Bt malaysiensis* sobre las larvas de *H. hampei* (López, 2011; Vidal-Quist, 2010). Otro avance importante que se ha creado en la última década ha sido la introducción comercial de cultivos transgénicos a base de *Bt*. Empero, dada la preocupación social y falta aceptación pública de este tipo de cultivos en el país, se ha hecho necesario estudiar nuevos compuestos de origen vegetal y fúngico como opciones integrales en el control de insectos (Lovric, 2012).

Se debe considerar que la preparación de tales formulados de *Bt* presenta algunos inconvenientes como: (1) requiere un apropiado periodo de aplicación, dado la pobre persistencia en comparación con los plaguicidas químicos; (2) actividad dependiente de la ingestión del herbívoro; (3) mayor costo relativo de comercialización y producción, comparado con los insecticidas químicos; y (4) posibilidad de que la plaga adquiera resistencia a la protoxina. Además, se debe considerar que la

flotabilidad del formulado⁹, las elevadas temperaturas, la exposición a luz UV, los hábitos alimentarios del insecto y la acción microbiana son algunos de los factores más influyentes en la inactivación de las δ -endotoxinas (Ochoa y Arrivillaga, 2009; Ramírez-Lepe & Ramírez-Suero, 2012).

2.4 Métodos de defensa de los insectos ante las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* mediante la acción de las proteasas digestivas

La acción defensiva de las proteasas intestinales de insectos como método de resistencia para inactivar las δ -endotoxinas hidrolíticas, es uno de los mayores retos que enfrentan los formulados comerciales de *Bt*. El primer caso reportado fue el de resistencia en campo de larvas de la polilla de la col, *Plutella xylostella*, tratada intensivamente con las toxinas de *Bt* (Díaz-Mendoza, 2006), donde se demostró que en una muestra de individuos expuestos continuamente a dieta artificial incorporando el complejo espora-cristal; la respuesta sobre los insectos fue poco efectiva y se presumió que en los insectos se indujo a la resistencia tras varias generaciones de selección (Rajguru & Sharma, 2012; Rodríguez *et al*, 2011).

Se ha propuesto un posible mecanismo de resistencia o evasión de los insectos hacia la actividad tóxica de las toxinas *Bt*, el cual postula que cuando las toxinas alcanzan al intestino medio del herbívoro y han recibido un procesamiento insuficiente o una elevada digestión de las proteasas intestinales hacia *Bt*, tales enzimas podrían suscitar a la inactivación del centro reactivo de la proteína del cristal (Figura 9). Este proceso induciría eventualmente a que la toxina no reconozca al receptor y no se formen los poros líticos. Finalmente, los restos del cristal son excretados por el insecto sin afectar llegar a afectar sus células epiteliales (Lightwood *et al*, 2000; Parde, 2010).

Por otra parte, el posible efecto sinérgico entre estas hidrolasas del intestino medio y las δ -endotoxinas ha generado interés científico debido a que las protoxinas Cry son degradadas proteolíticamente, lo que interfiere directamente con la actividad entomopatogénica de *Bt* (Brar *et al*, 2007). Incluso, Ben-Dov *et al* (2003) han pensado que

⁹ Flotabilidad se refiere a la capacidad que tiene el formulado biológico a mantenerse en suspensión.

los insectos poseen mecanismos para reemplazar el tejido epitelial dañado por una nueva capa mucosa en el epitelio que protegería al insecto de la formación del poro.

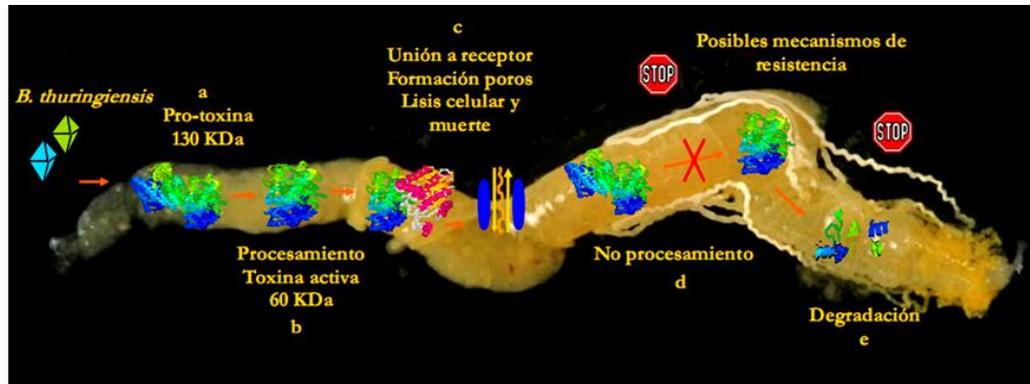


Figura 9. Esquema del modo de acción de las proteínas Cry, y mecanismo de resistencia mediado por las proteinasas del tubo digestivo de larvas. Disolución de la toxina a pH alcalino del tubo digestivo, a) procesamiento de la protoxina; b) unión al receptor; c) lisis celular y septicemia; d) mecanismo de resistencia mediado por proteasas digestivas, donde la protoxina es degradada y el insecto logra excretar el cristal, sin causar daños en las células epiteliales del tracto digestivo. Fuente: Díaz-Mendoza. 2006.

2.4.1 Fisiología del tracto digestivo de *H. hampei*

El hábitat y los hábitos alimenticios de plagas insectiles como *H. hampei* se han convertido en los motivos más relevantes para comprender la fisiología y funcionamiento del sistema digestivo de estos escarabajos, ya que su canal alimentario es la principal interfase entre el insecto y su ambiente. Por otra parte, considerando que el sistema digestivo de la broca es la primera línea de defensa para degradar aquellas proteínas que afectan su dieta, el estudio de su fisiología y propiedades bioquímicas del canal alimentario permitiría la exploración de nuevas opciones de control (Prabhakar, 2001; Tabatabaei *et al*, 2011).

El canal alimentario de los coleópteros se divide en tres secciones: el intestino anterior, el intestino medio y el intestino posterior (Figura 10). El intestino anterior comprende la boca, el buche y el proventrículo. La boca se encarga de la ingesta y el transporte de alimento al buche, que tiene la función de ser un reservorio temporal el alimento ingerido. Asimismo, las estructuras superficiales del buche están involucradas en la absorción de agua o pueden ayudar en la contracción y expansión

del buche. El proventrículo es el órgano que controla el almacenamiento y traslado del alimento al intestino medio. El intestino posterior se alinea con la cutícula y es la sección intestinal donde se regula la entrada y salida de agua e iones antes de la excreción de la dieta sin digerir (Chapman, 1998; Vidal-Quist, 2010).

La estructura intermediaria entre el intestino anterior y el medio es la válvula cardíaca. El intestino medio es un órgano tubular que conecta el intestino anterior y posterior mediante una capa de células epiteliales; las cuales regulan las condiciones fisicoquímicas dentro del intestino (incluyendo el balance de agua), la absorción de nutrientes y la secreción de enzimas digestivas. La válvula gástrica es una herramienta taxonómica que enlaza los túbulos de Malpighi y *H. hampei* cuenta con dos en la porción media del intestino medio posterior (Rubio *et al*, 2008). El intestino medio se organiza con la membrana peritrófica; que es una matriz compuesta de quitina, proteínas y proteoglicanos; y separa las células epiteliales del alimento ingerido para protegerlas de los contenidos de la dieta, compartimentalizando la digestión en espacios endo- y ectoperitróficos (Macgregor, 2001).

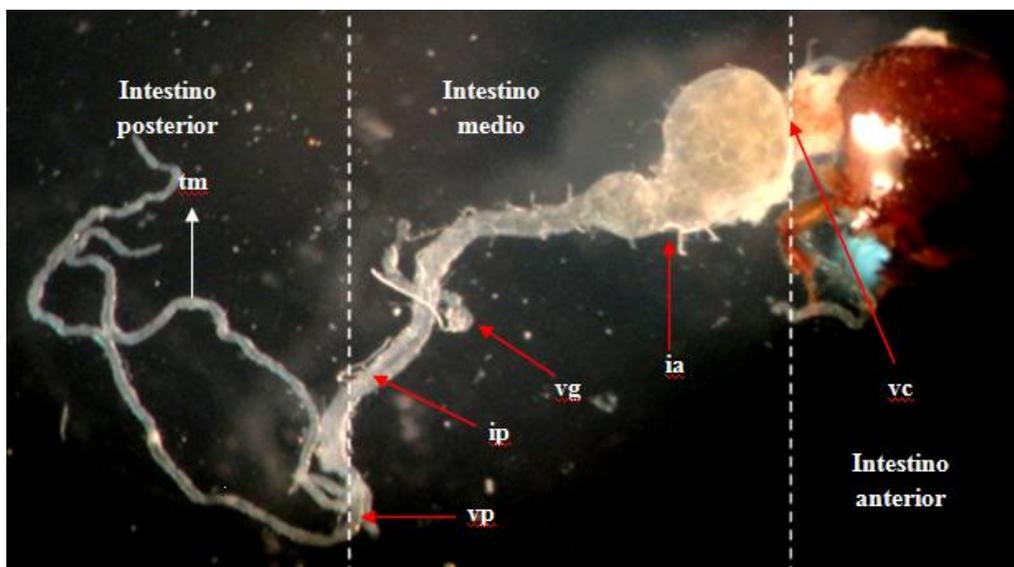


Figura 10. Vista macroscópica del tubo digestivo de una hembra adulta de *H. hampei* embebido en solución Ringer; (vc) válvula cardíaca, (ia) intestino medio anterior, (cg) válvula gástrica, (ip) intestino medio posterior (ip) intestino medio posterior, (vp) válvula pilórica, (tm) túbulo de Malpighi. Las flechas color rojo indican la posición donde se ubica cada uno de las estructuras morfológicas citadas.

2.4.2 Proceso digestivo de los herbívoros y distribución de enzimas digestivas

La mayoría del alimento ingerido y digerido por la broca es macromolecular, es decir; que el alimento ingresa en forma de carbohidratos, proteínas y lípidos. Estas macromoléculas deben ser hidrolizadas por procesos de digestión que ocurren a lo largo del tracto digestivo de la broca; las cuales desencadenan una serie de eventos bioquímicos y fisiológicos que resultan en la conversión de cadenas polipeptídicas, polisacáridos, fosfolípidos, glicéridos y glicolípidos en monómeros u oligómeros utilizables; proceso complejo que es mediado por las α -amilasas de la saliva, las hidrolasas digestivas que se secretan en el intestino medio, y por microorganismos ubicados en el canal alimentario (Chapman, 1998).

En el caso de las proteínas, los enlaces polipeptídicos se hidrolizan secuencialmente por las proteinasas a través un proceso de tres pasos que incluye la dispersión (digestión inicial) en la membrana peritrófica; reducción de polímeros en oligómeros que acontece en el espacio ectoperitrófico por la escisión de enlaces internos; y reducción de oligómeros en dímeros en las células epiteliales (Prabhakar, 2001).

Terra & Ferreira (1994) describieron que la distribución espacial de las proteasas digestivas de *H. hampei* y del resto de coleópteros se encuentran compartimentalizadas dentro del intestino medio (Figura 11). Estas endopeptidasas son secretadas en el espacio ectoperitrófico ubicado cerca del epitelio; donde las enzimas se desplazan de manera transversal en el lumen (Oppert *et al*, 2005). En esta región del tracto digestivo están las condiciones bioquímicas donde la enzima presenta mayor estabilidad y máxima actividad proteolítica, dado que se ubican a pH alcalino (8.0-11.0). Se estima que cerca del 20% de los genes en herbívoros codifican a proteasas (Castro-Guillén *et al*, 2012; Parde, 2009).

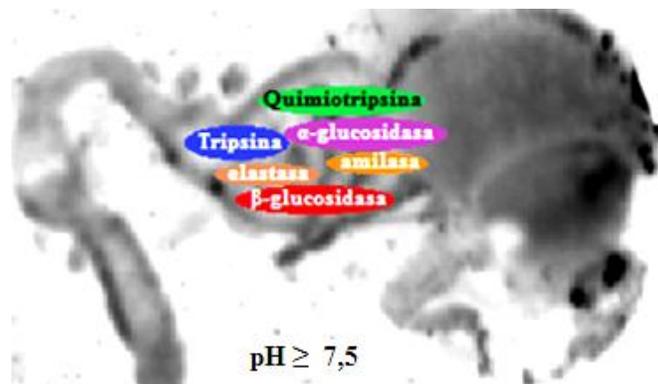


Figura 11. Esquema de la distribución de las enzimas proteolíticas presentes dentro del intestino medio de *H. hampei* y condiciones bioquímicas de actividad óptima. Fuente: Tabatabaei *et al*, 2011.

2.5 Enzimas proteolíticas

Las proteinasas o endopeptidasas son enzimas indispensables que catalizan la ruptura hidrolítica de los enlaces peptídicos y la absorción de aminoácidos; y están implicadas en una serie de procesos fisiológicos y bioquímicos dentro del ciclo celular de un organismo a nivel celular como crecimiento, diferenciación, ruptura celular, transcripción, coagulación, inflamación, apoptosis, entre otros; por lo que deben funcionar de manera óptima durante el crecimiento y desarrollo de un organismo. Estas enzimas son indispensables en el mantenimiento y supervivencia del organismo hospedero y participan como mediadores de señales de iniciación, transmisión y terminación de diversos eventos dentro del ciclo celular (El-Beltagy *et al*, 2005; Habib & Fazili, 2007; Shilpa-Satheesh & Murugan, 2012).

La acción de estas proteasas intracelulares se divide en dos categorías: proteólisis limitada y proteólisis ilimitada. En la primera, la proteasa puede romper uno o un número limitado de enlaces peptídicos sobre la proteína diana, que induce la activación de zimógenos; tal como el caso de la tripsina, que deriva del tripsinógeno para ser activada. Por su parte, en la proteólisis ilimitada, las proteínas se degradan continuamente en sus constituyentes aminoácidos, que induce a una rápida hidrólisis del proteosoma en presencia de ATP. En cualquiera de los casos, la disponibilidad de aminoácidos libres es necesaria para la síntesis de nuevas proteínas o su sustitución (Fan & Wu, 2005; Molina, 2010; Parde, 2009).

Las proteasas del intestino medio de los insectos se dividen en exo- y endopeptidasas. Las exopeptidasas se encargan de remover aminoácidos de los extremos N-terminal o C-terminal de las aminopeptidasas y carboxipeptidasas; mientras que las endopeptidasas hidrolizan enlaces peptídicos y se clasifican según la naturaleza del sitio catalítico y las relaciones evolutivas de la estructura físico-química de la proteasa (Ajamhassani *et al*, 2012; García-Carreño, 1992; Jongsma & Bolter, 1997).

2.5.1 Clasificación de las endopeptidasas

Las endopeptidasas derivan de fuentes vegetales, animales y microorganismos; y se han dividido en familias según sus mecanismos catalíticos sobre el enlace peptídico. De acuerdo con la Unión Internacional de Bioquímica (IUB; del inglés *International Union of Biochemistry*) y la Comisión Enzimática (EC; del inglés *Enzyme Commission*), se han reconocido cuatro clases de enzimas proteolíticas, basadas en la reacción sobre el centro activo de los aminoácidos activos: las serín-proteasas, cisteín-proteasas, aspártico-proteasas y metalo-proteasas. Sin embargo, se ha sugerido que dicha clasificación por tipos catalíticos sea sustituida a una clasificación por familias, con base en relaciones evolutivas de las proteasas digestivas (El-Beltagy *et al*, 2005; Lawrence & Koundal, 2002).

Blanco-Labra *et al* (1996) y García-Carreño (1992) describen a las diferentes clases de endopeptidasas como se menciona a continuación:

1. Las serín-proteasas han sido estudiadas en procesos de digestión e incluyen a las enzimas extracelulares tripsín- y quimiotripsín-proteasas, las cuales poseen un residuo de serina, ácido aspártico o histidina en su sitio activo.
2. Las aspártico-proteasas se distinguen por reconocer un residuo de ácido aspártico en el sitio activo. Tales proteasas incluyen a la pepsina y a la catepsina D; las cuales son activas fundamentalmente a pH ácido (~3-5).
3. Las metalo-proteasas poseen un residuo de ácido glutámico en el sitio activo y requieren cationes metálicos como Zn^{2+} , Ca^{2+} y Mg^{2+} para hidrolizar el enlace. Dos de estas enzimas son la termolisina y la carboxipeptidasa A.

4. Las cisteín-proteasas contienen un residuo de cisteína (-SH) que está implicado en el centro catalítico y algunos ejemplo son la papaína y la ficina.

2.5.2 Serín-proteinasas

Las serín-proteasas se han agrupado en dos superfamilias que son la familia quimiotripsina que incluye las enzimas quimiotripsina, tripsina, elastasa o calicreína; y la familia subtilisina que incluye a la subtilisina. Las serín-proteasas exhiben especificidad por el sustrato a un pH óptimo de 8 a 11, que es consistente con las condiciones alcalinas en el intestino medio de las plagas insectiles. Algunas enzimas muestran interacción extendida hacia el sustrato y otras muestran especificidad restringida a residuos de sustrato, en el caso de inhibidores de proteasas. Considerando que estas enzimas se ubican en el intestino de los insectos son responsables de la digestión inicial de las proteínas, la actividad antibacteriana y la respuesta inmune (Ajamhassani *et al*, 2012; Fan & Wu, 2005; Parde, 2009).

2.5.3 Procesamiento proteolítico de las toxinas *Bti* mediado por tripsín-proteasas

Las tripsín-proteasas son endopeptidasas dentro del grupo de glicosil-hidrolasas; que tienen la función de hidrolizar enlaces peptídicos en los extremos carboxilo de los residuos de los aminoácidos arginina (R) y lisina (K). Estas enzimas son secretadas en el páncreas y se cree que juegan un crucial dentro del proceso de digestión, y en la activación de zimógenos. Su función es irreversible, a menos que una enzima pueda interferir o detener su actividad trípica (Klomklao *et al*, 2011; Muñoz, 2011).

El modelo actual de síntesis de tripsinas endógenas (Figura 12) sugiere que las tripsín-proteinasas (18-20 kDa) derivan del zimógeno tripsinógeno (24 kDa), por lo que deben ser procesadas proteolíticamente para activar esta pre-proteína y actuar sobre los enlaces peptídicos de un sustrato específico. Este es el punto crítico bajo el cual, se deben diseñar herramientas que controlen la síntesis de estas proteasas, a partir de enzimas que formen un complejo inactivo con endoproteasas (Odei, 2009).

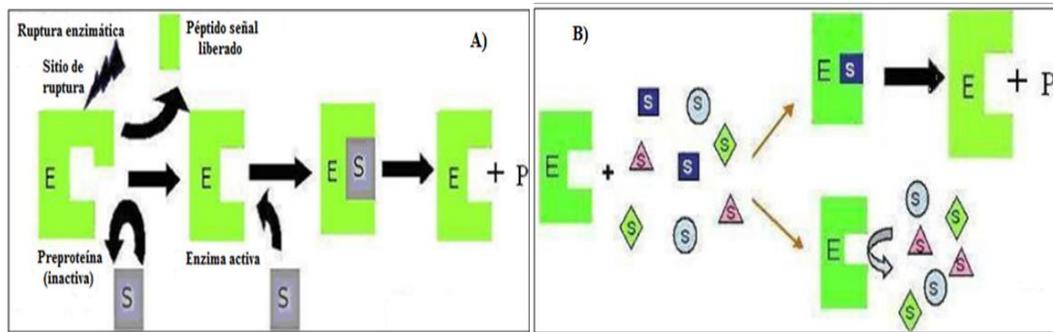


Figura 12. Mecanismo de acción y síntesis de las enzimas proteolíticas, A) las enzimas se sintetizan como pre-proteínas inactivas y se procesan para inducir su activación, B) mecanismo de acción hidrolítica, a partir de la especificidad hacia el sustrato, E: enzima; S: sustrato y P: producto. Fuente: Habib & Fazili, 2007.

Considerando que la función hidrolítica de las tripsín-proteinasas es indispensable para que *H. hampei* se desarrolle y sobreviva dentro de la cereza de café, si el insecto se expusiera repetidamente a dosis de preparados biológicos a base de *Bt*, podría ser capaz de modificar su perfil proteolítico y sobreexpresar proteasas insensibles que conlleven al completo procesamiento de las proteínas Cry y originen que este herbívoro desarrolle resistencia hacia las mismas; y cuya pre-hidrólisis se podría potenciar por las proteasas ambientales que conviven en el entorno de la broca. Esta problemática conduciría inevitablemente a que la plaga pueda agravar los daños que ocasiona sobre el cultivo de café porque no tiene barreras que le impidan su desarrollo. Dentro de este contexto y tomando en cuenta que en los insectos se desconoce si éstos poseen mecanismos para regular por sí mismos su actividad proteolítica endógena; se hace necesario implementar estrategias biológicas capaces de controlar estrictamente la actividad trípica (Habib & Fazili, 2007).

2.5.4 Resistencia adquirida por *H. hampei* hacia las sustancias tóxicas sintetizadas y secretadas por *Coffea* spp.

Se ha evidenciado que el endospermo de cultivos del género *Coffea* cuentan con dos grupos de globulinas antigénicas que sirven de almacenamiento en el grano: la vicilina (7S) y la leguminina (11S). Estas proteínas son susceptibles a la degradación por las proteasas digestivas de la broca, como publicaron Batista-Coelho *et al* (2010),

quienes determinaron que globulinas de *C. arabica* y *C. racemosa* fueron digeridas por las proteasas de este escarabajo y causaron mortalidades de 37,7% y 10,4%, respectivamente, por lo que consideraron que los componentes en la semilla de café no afectan a esta plaga y podrían jugar un rol esencial en la resistencia de *H. hampei*.

Por otra parte, las proteínas totales en *C. canephora* y *C. arabica* comprenden sólo el 10% del total de los componentes del café tostado (Molina, 2010). Los estudios realizados por Guerreiro-Filho & Mazzafera (2003) permitieron obtener una baja dosis/respuesta por la administración acuosa del alcaloide tóxico cafeína¹⁰ hacia adultos de *H. hampei*. Tales resultados suponen que probablemente la broca se ha logrado adaptar rápidamente a estar expuesto a estas sustancias y es posible que superara la barrera de toxicidad en la cereza. Finalmente, Ludwig *et al* (2000) publicaron que en el endospermo de frutos maduros e inmaduros de café, la actividad proteolítica endógena se mantuvo invariable sin importar el estado de madurez y parece no perjudicar de manera significativa el desarrollo de la broca.

Contemplando estas pruebas y datos anteriores, es urgente el surgimiento de opciones biológicas efectivas que respondan a esta problemáticas, con que se ha venido valorando la posibilidad de emplear extractos proteínicos de familias de plantas como Anacardiaceae, Fabaceae, Myrtaceae, Euphorbiaceae y Passifloraceae. Tales extractos poseen inhibidores de proteinasas y serían candidatos para incorporarse junto con los biopesticidas de *Bt* porque se ha comprobado su compatibilidad, con el fin de interrumpir la reacción tripsina-sustrato de forma específica causando alteraciones anti-metabólicas en el insecto diana y demorando el riesgo y la probabilidad de que el perforador insecto desarrolle una pronta resistencia hacia las proteínas tóxicas de *Bt* (Messsing, 2012; Rajguru & Sharma, 2012).

2.6 Inhibidores de proteinasas (IPs) contra proteasas endógenas y ambientales

Debido a que las proteasas secretadas por las plagas han sido clave para invadir un hospedero vegetal; las plantas han debido adaptarse, seleccionar y producir aquellos

¹⁰ Según García (2004), los alcaloides son compuestos ecológicamente eficaces que son sintetizados por el metabolismo secundario de *Coffea* spp, producto del proceso de diferenciación del café.

compuestos con los cuales, pudieran responder al ataque de estos patógenos. De esta forma, se originaron los inhibidores de proteinasas vegetales (Christeller, 2005).

Los inhibidores de proteasas (IPs) son un grupo de proteínas solubles distribuidas ampliamente en la naturaleza, cuyos pesos moleculares varían de 5 a 25 kDa. Estos IPs emergieron como herramientas promisorias para la regulación de las endoproteasas, ubicadas en el intestino medio de herbívoros, por lo que se ha propuesto la opción de usar estas proteasas como agentes para suprimir la actividad proteolítica de plagas como las de *H. hampei*, que son los primordiales factores para ingresar en el hospedero; y también se están estudiando para enfrentar enzimas ambientales que conviven con las plagas (Aguirre *et al*, 2004; Shilpa-Satheesh & Murugan, 2012).

2.6.1 Distribución y localización de los IPs en plantas

Dada la función de los IPs sobre la resistencia a la invasión de herbívoros, se ha estudiado que la acumulación masiva de estas proteínas se encuentra en ciertos tejidos y órganos que suelen ser los sitios más propensos a herbivoría; especialmente los órganos de almacenamiento como semillas y tubérculos, dado que estas plagas devoran los tejidos que cuentan con mayor valor nutricional. El segundo sitio de ataque en plantas son los fluidos, que permiten el transporte del patógeno a través del hospedero como el floema de las hojas (Jongsma & Bolter, 1997; Rashed *et al*, 2008).

Estos IPs se expresan bajo condiciones de estrés como heridas, daños por insectos, ataque de patógenos, sequías o exposición a la luz UV. Los IPs son subproductos de cascadas de defensa inducidas por elicitores vegetales, oligómeros de la pared celular de hongos, secreciones orales de insectos y señales eléctricas o hidráulicas; que resultan en la acumulación de los IPs en los tejidos (Lomate & Hivrale, 2011). Cuando estas moléculas reciben la señal para activarse, son translocadas desde el sitio de la herida hacia el xilema o el floema por dispersión hidráulica. No obstante, la inducción de heridas y las rutas metabólicas dirigidas a la defensa de patógenos se superponen, sea por sustancias químicas o sintéticas (Prabhakar, 2001).

La mayor parte de inhibidores de proteinasas estudiados en el reino vegetal derivan de tres familias principales: leguminosas, solanáceas y gramíneas, correspondiendo a más del 6% de proteínas totales. En legumbres, los IPs se han extraído de extractos de frijol de soya (*Glycine max*), quinchoncho (*Cajanus* spp.), frijol común o judía (*Phaseolus vulgaris*), haba (*Vicia faba*), frijol mungo Thai (*Vigna radiata*) y maní bambara (*Voandzeia subterranea*) (Christeller *et al*, 2005; Lingaraju *et al*, 2008).

2.6.2 Propiedades y funciones de los IPs en leguminosas

Los IPs poseen un amplio espectro de actividad sobre insectos dentro de los órdenes Coleoptera, Orthoptera, Lepidoptera e Hymenoptera; y sobre nematodos patogénicos como *Globodera tabaccum* y *Meloidogyne incognita*, cuyo efecto se comprobó con el inhibidor de tripsín-proteasas del caupí (CpTi); y sobre el crecimiento del micelio de hongos patogénicos como *Alternaria alternata* y *Trichoderma reesei*. Una de las propiedades más importantes de estas proteínas es que no se ha hallado evidencia sobre efectos deletéreos graves de IPs sobre mamíferos (Lomate & Hivrale, 2011).

Estudios realizados por Kennedy (1998) sobre ratas y perros, demostraron que al evaluar dosis de hasta 1.000 mg·kg de peso corporal/wt·día¹¹ del inhibidor de soya Bowman-Birk de tripsín-proteasas no mostraron efectos adversos sobre la supervivencia, el peso y la alimentación después de analizar los resultados de los electrocardiogramas, exámenes oftálmicos, hematológicos, análisis de úrea, peso de los órganos, así como microscopía patológica; por lo que las repercusiones en el páncreas fueron nulas y se descartaron los probables efectos secundarios de los IPs a nivel gastrointestinal en seres humanos. Por otra parte, Soetan & Oyewole (2009) aclaran que en el caso de otros mamíferos como los rumiantes, su sistema digestivo les permite degradar estas proteínas. Estas razones permiten utilizar los inhibidores de proteinasas como una excelente opción para ser aplicados en formulados biológicos solos o en conjunto con otros compuestos tóxicos singergistas

¹¹ Las dosis evaluadas en esta investigación son dos veces superiores a las que se utilizarían con una persona.

La función de estas sustancias anti-nutricionales y anti-fisiológicas fue investigada a principios de 1947, cuando Mickel & Standish observaron que las larvas del coleóptero *Tribolium confusum* fueron incapaces de desarrollarse normalmente en dietas con soya. En consecuencia, estimaron que los IPs podían interferir en la regulación de la respuesta biológica (Lawrence & Koundal, 2002; Li *et al*, 2012).

La actividad inhibitoria en extractos de estas leguminosas es inducida por lesiones físicas y suele alterar el crecimiento o la salud de invertebrados, debido a que la inhibición de la actividad de una enzima como la tripsina afecta de forma directa la disponibilidad y asimilación de aminoácidos y la frecuencia de ingesta de alimento (Amorim *et al*, 2008; D'Mello, 2000; Fan & Wu, 2005; Kusuma *et al*, 2009).

2.6.3 La soya (*Glycine max* L. Merrill) como fuente de inhibidores de proteasas

El cultivo de soya se ha desarrollado ampliamente en América del Norte y Centroamérica, y se estima que la superficie de siembra es del 50%, lo que significa que la soya está disponible en Costa Rica y sus países vecinos (Meza-Gutiérrez, 2005). Las semillas de soya están constituidas con alrededor de un 20% de aceite, un 9% de fibra curda, un 36% de proteínas, un 30% de carbohidratos y un 5% de cenizas, por lo que se deduce que esta leguminosa posee un alto contenido de proteínas que se han empleado para el consumo animal, con una menor competencia por el consumo humano donde la soya se ha empleado principalmente en suplementos alimenticios (Shekhar-Bhol, 2012; Vaca, 2007).

Becker-Ritt *et al* (2004), D'Mello (2000), Guillamón *et al* (2008) y Kusuma *et al* (2009) destacan que el 6% de los compuestos bio-activos en las proteínas totales de la soya están divididos en dos categorías primarias: un grupo termolábil que comprende a las lectinas y a los IPs que le restan calidad nutricional a la semilla; y un grupo termoestable que incluye a las proteínas antigénicas. Otros componentes menores que ejercen actividad anti-fisiológica son los fitoestrógenos y las saponinas, que son ubicuos y están dispersos tanto en granos como en otras partes foliares. Los factores antigénicos causan efectos adversos en la función inmune y son reconocidos como

glicininas, y subunidades α -, β - y γ -conglucininas. Los estragos que los factores antigénicos y las lectinas podrían provocar sobre un individuo son lesiones intestinales y limitada absorción de nutrientes (Bennet, 2005).

2.6.4 Actividad anti-tríptica de los IPs en *G. max*

Se ha evaluado que estas enzimas son capaces de proteger a las semillas de soya contra el ataque de depredadores, debido a su poder de aplacar el grado de digestión de aminoácidos esenciales (Shekhar-Bhol, 2012). Estudios realizados por Muñoz (2011) cuyos resultados se aprecian en el cuadro 2, comprobaron que los cotiledones de las semillas de leguminosas tuvieron actividad inhibitoria contra la tripsina. Esta investigadora confirmó que la soya tuvo mayor actividad inhibitoria respecto a otras legumbres, por lo que consideró que esta leguminosa conteía más IPs bioactivos.

Cuadro 2. Actividad inhibitoria de la tripsina en algunas leguminosas.

Leguminosas	Actividad inhibitoria sobre tripsín-proteasas (UI/mg)
Haba (<i>Vicia faba</i>)	0,50 – 6,20
Garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>)	1,68 – 11,90
Soya (<i>Glycine max</i>)	21,10 – 74,50
Chocho (<i>Lupinus</i> sp.)	0,16-0,29
Frijol común (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	10,90 – 25,90
Arveja (<i>Pisum sativum</i> var. de primavera)	2,30 – 4,90
Arveja (<i>Pisum sativum</i> var. de invierno)	7,90 – 15,90

Fuente: Muñoz, 2011.

2.6.5 Familia de inhibidores de serín-proteasas (Serpinas)

La familia de inhibidores de serín-proteasas es la superfamilia más amplia de IPs competitivos. Estos inhibidores se constituyen por 8 o 9 α -hélices, 3 láminas β y un centro reactivo en horquilla (*reactive site loop*, RCL), que se enlaza al sitio activo de la proteasa. Los genes que codifican a serpinas están distribuidos ubicuamente en

diversos tejidos y células, en virus, bacterias, plantas y animales y exhiben diferentes especificidades según el tipo de proteasa digestiva (Roberts *et al*, 2008). Estas serpinas se consideran “inhibidores suicidas” y actúan de manera irreversible sobre las peptidasas tripsina y quimiotripsina. La función fisiológica de estos IPs se relaciona con la protección de plagas y patógenos; y la regulación de la actividad proteolítica (Álvarez-Alfageme *et al*, 2011; Habib & Fazili, 2007; Lioi *et al*, 2010).

2.6.6 Clasificación y características de los inhibidores de serín-proteasas presentes en la soya

Los IPs de *G. max* se clasifican en las familias Kunitz (KSTI) y Bowman-Birk (BBI). Se ha propuesto que estas familias de inhibidores producen hipertrofia e hiperplasia, así como hipersecreción y expresión de las enzimas pancreáticas en invertebrados, lo cual conduce a la progresiva pérdida de endoproteasas ricas en sulfuro, tripsina y quimiotripsina; por el agotamiento de aminoácidos esenciales (Ajamhassani *et al*, 2012; Brandon, 2004; Guillamón *et al*, 2008; Muñoz, 2011; Shekhar-Bhol, 2012).

2.6.6.1 Inhibidores de Bowman-Birk (SBBI)

Su nombre se debe a que fue descubierto por dos investigadores de apellidos Bowman y Birk. Se caracterizan por estar compuestos de dos largas cadenas polipeptídicas que tienen 74 residuos de aminoácidos y siete puentes disulfuro. Estas enzimas poseen un peso molecular de 8 kDa y se denominan inhibidores de “doble cabeza” porque cuentan con dos sitios de unión independientes para actuar sobre la tripsina o la quimiotripsina. Los BBI son desnaturalizados a temperaturas de 20, 30, 60 ó 100 °C y a pH extremos de 2 o 10. Se han estudiado en semillas y en menor medida, en hojas (Lioi *et al*, 2010; Muñoz, 2011).

2.6.6.2 Inhibidores de Kunitz (SKTI)

Los miembros de esta familia, cristalizados por Kunitz en 1947 a partir de láminas β de *G. max*, conforman una sola cadena polipeptídica que consta de 181 residuos de aminoácidos que conforma un trébol- β con 10 a 12 láminas β conectadas por largas horquillas, un sitio reactivo para hidrolizar a las tripsinas y dos puentes disulfuro

entre residuos conservados de cisteína (Figura 13). Estos inhibidores suelen tener masas moleculares de entre 18 y 22 kDa cuando la semilla de soya se encuentra bajo condiciones de estrés. SKTI actúan inhibiendo la tripsina y débilmente a la quimiotripsina; y se inactivan por acción del calor y el ácido (Becker-Ritt *et al*, 2004; Odei, 2009; Pérez *et al*, 2003; Ramalho-de-Oliveira *et al*, 2012).

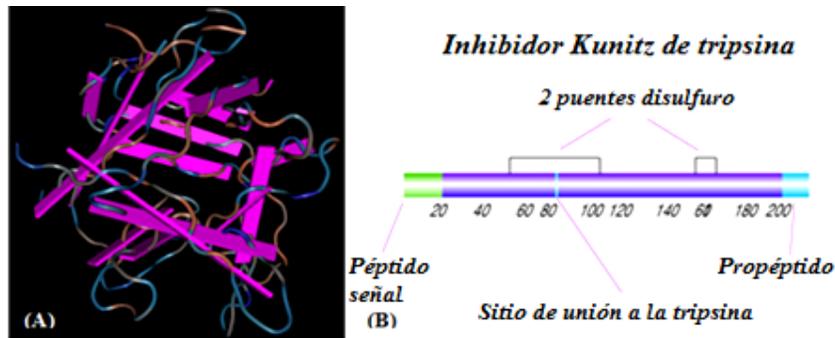


Figura 13. Diagramas del IP Kunitz de tripsina de soya (SKTI), (A) estructura 3D del SKTI (peso molecular de la secuencia: 20,1 kDa). Las plegamientos amorfos color azul muestran la carga negativa y los plegamientos color rojo indican la carga positiva de las α -hélices, y los rectángulos color rosado corresponden a las láminas- β . (B) esquema de la cadena polipeptídica de un IP Kunitz señalando el centro reactivo y puentes disulfuro. Fuente: Sigma-Aldrich, 2008; NCBI, 1992; SIB, 2007.

2.6.7 Modo de acción de los IPs contra las tripsín-proteasas ambientales y las tripsín-proteasas del intestino medio de coleópteros

Valencia y Arboleda (2005), citan que las tripsín-proteinasas son las proteasas digestivas que abundan en mayor proporción en relación con las quimiotripsín-proteinasas, y ambas han favorecido el desarrollo de resistencia de la broca hacia compuestos tóxicos, por lo que es importante entender el mecanismo de acción de los IPs frente a estas enzimas. Dicho modelo expone que la serín-proteasa reconoce al IP como “pseudosustrato” e interacciona con éste mediante enlaces no-covalentes con péptidos específicos (P1) ubicados el extremo N-terminal del centro reactivo en horquilla (RCL, del inglés *Reactive Centre Loop*) del IP, cuyo proceso estimula la formación de un complejo de encuentro de Michaelis-Menten (P1-P1') que determina la especificidad (Fluhr *et al*, 2012; Roberts *et al*, 2008) (Figura 14). Esta reacción que desencadena la formación de un intermediario acilo-enzima entre el sitio activo de la

proteasa y el grupo carbonilo del residuo P1 del IP, que produce la ruptura del centro activo. Finalmente, el RCL se inserta como una cadena antiparalela en una de las láminas β de la serín-proteasa, que genera un cambio conformacional de la estructura cuaternaria, se inactiva el sitio activo de la enzima, estableciendo así el complejo inactivo (Macedo *et al*, 2011; Muñoz, 2011; Shilpa-Satheesh & Murugan, 2012).

Una característica de estas proteinasas es que pueden poseer distintos sitios activos homólogos. A pesar de estos, los inhibidores son muy específicos y pueden retener su actividad inhibitoria, reemplazando un residuo de un sitio activo de la proteasa por otro. Por otra parte, este complejo proteasa-inhibidor tiene alta estabilidad térmica y posee una baja constante de disociación (10^{-7} - 10^{-11} a pH neutral) (Hosseininaveh *et al*, 2007; Lawrence & Koundal, 2002; Macedo *et al*, 2011; Odei, 2009).

Este complejo enzimático bloquea la actividad proteolítica en el canal alimentario; proceso que ocasiona una reducción en la digestibilidad debido a la incapacidad que sufren los insectos para utilizar las proteínas ingeridas en la dieta. Al final, se produce una señal química en el intestino para hipersecretar proteinasas, producto de una deficiencia crítica de aminoácidos; que afecta el crecimiento, el desarrollo y la supervivencia del insecto (Ajamhassani *et al*, 2012; Rodríguez *et al*, 2011).

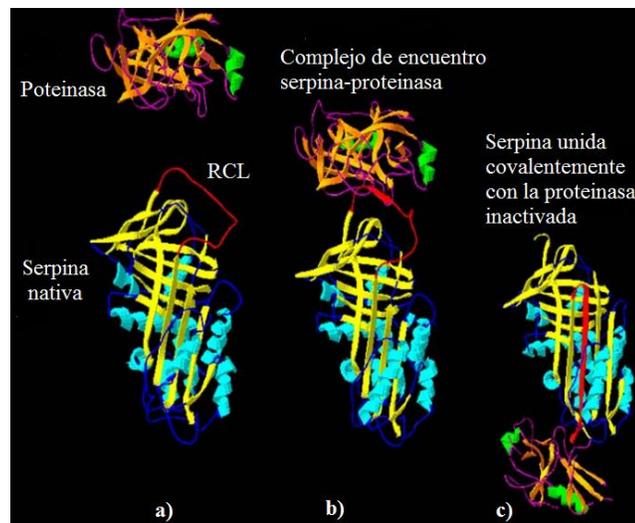


Figura 14. Modelo del mecanismo de formación un complejo enzimático covalente serpina-proteinasas. (a) Estructuras cristalizadas por rayos X de una serín proteínasa y de un inhibidor en

condiciones nativas, mostrando el único sitio reactivo en horquilla (RCL) del IP, afín a la proteasa; (b) mecanismo de formación del complejo de encuentro (reversible) entre la serpina y la serín proteasa; (c) estructura del complejo irreversible entre el IP y la proteinasa, luego de la ruptura en el centro reactivo, el RCL se inserta como una cadena dentro de una de las láminas β de la serpina mediante un enlace covalente. Fuente: Roberts *et al*, 2008.

2.6.8 Perspectivas biotecnológicas e implicaciones en la implementación de IPs dentro de un programa de control biológico de plagas insectiles

Dada la complejidad de las interacciones proteasa/ IP en un sistema plaga-hospedero y el diverso grupo de enzimas proteolíticas utilizadas contra plagas y patógenos para hidrolizar las proteínas de la dieta; es necesario seleccionar un IP con una efectividad adecuada basada en el sistema biológico estudiado, ya que éste es un factor determinante en el éxito o fracaso para la selección y optimización de un mecanismo de control (Lawrence & Koundal, 2002; Meza-Gutiérrez, 2005; Roberts *et al*, 2008).

También se debe contemplar la posibilidad de que los biotipos de plagas puedan sufrir una presión evolutiva después de una prolongada exposición al inhibidor, que le permita al insecto responder a través de la inactivación o evasión de los efectos de los IPs con ayuda de las proteinasas (Macedo *et al*, 2011; Rodrigues-Macedo, 2011). Tales mecanismos de resistencia son esencialmente: (1) que el insecto exprese genes que induzcan la síntesis de proteasas insensibles al ataque de los inhibidores y (2) que la plaga induzca la producción de proteasas que degraden al IP, que resulte en una deficiente inhibición en el intestino medio y un fracaso en la estrategia escogida (Jonsgma & Bolter, 1997; Yang *et al*, 2009).

Otras circunstancias que podrían determinar el fracaso o éxito de los IPs como alternativas en el control biológico es que los principales obstáculos que enfrentan tales proteínas dependen de aspectos como concentración e interacción del IP sobre proteasas ambientales y digestivas, estabilidad real del IP en el intestino medio del insecto, su complementariedad sobre el centro activo de la proteasa y la habilidad que posea el herbívoro para adaptarse progresivamente al IP (Rodrigues-Macedo, 2011). Bajo esta perspectiva y reconociendo la co-evolución de *H. hampei* con el género

Coffea; se ha creado un nuevo paradigma y se proponen estrategias para desarrollar nuevas investigaciones a nivel fisiológico, ecológico y bioquímico; dirigidas a la evaluación del efecto de plantas no-huésped como *G. max* sobre las proteasas del intestino medio de *H. hampei* (Ajamhassani *et al*, 2012; Prabhakar, 2001).

Adicionalmente, se ha estudiado que la combinación de las serín-proteasas con IPs junto con las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*, podría producir un efecto potenciador para evitar tanto la degradación ambiental de las toxinas de *Bt*, como prevenir la respuesta adaptativa de los insectos hacia la actividad tóxica de *Bt* (Oppert *et al*, 2005). Sanahuja *et al* (2011) averiguaron que los IPs de soya actuaron de forma sinérgica para aumentar el efecto letal por las proteínas Cry y protegieron los cristales de la degradación de las proteasas del intestino medio en coleópteros y lepidópteros.

Tomando en cuenta que los IPs podrían ser una herramienta promisoriosa para atacar plagas como la broca, con este trabajo se pretende hacer un aporte complementario a las investigaciones preliminares sobre los factores intrínsecos y extrínsecos asociados con los hábitos de alimentación de *H. hampei in vitro*, y responder si las proteínas insecticidas de una cepa *Bt subs. israelensis* se podrían administrar como coadyuvante junto con los IPs extraídos y purificados a partir de harina de frijol de soya, y contemplar la alternativa de incorporarlos en un futuro dentro de un programa de control integrado, con el propósito de prevenir la adaptación de esta plaga hacia las toxinas y proponer una solución efectiva hacia el problema agronómico que produce la broca actualmente y que aqueja a diversos productores de café en Costa Rica.

CAPÍTULO 3

Objetivos

3.1 Objetivo General

Determinar si un extracto de harina de frijol de soya (*Glycine max* L.) incluye inhibidores de serín-proteasas que potencien la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* contra insectos adultos de las broca del café (*Hypothenemus hampei*).

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Purificación de las serín-proteasas digestivas a partir de intestinos medios de *Hypothenemus hampei*

1. Separar el intestino medio del resto de canal alimentario de 310 insectos adultos.
2. Aislar las proteínas solubles utilizando buffer Trizma-HCl 50 mM (pH 7.5).
3. Purificar el extracto de proteínas solubles con base en su tamaño.

3.2.2 Purificación de inhibidores de serín-proteinasas a partir de harina de frijoles de *Glycine max*

1. Obtener un extracto crudo a partir de harina de soya comercial.
2. Purificar el extracto de harina de soya con base en su tamaño.

3.2.3 Purificación de las toxinas de *B. thuringiensis* subs. *israelensis*

1. Sincronizar un cultivo de *Bti* en medio HCT.
2. Cuantificar las esporas viables de alícuotas del medio HCT para verificar la pureza de la suspensión bacteriana aislada.
3. Separar la mezcla de esporas y cristales.
4. Purificar el los cristales utilizando un gradiente discontinuo de densidad.

3.2.4 Obtención de perfiles proteicos y enzimáticos para los extractos de intestino medio de broca y de harina de frijol de soya

1. Estimar el peso molecular aparente, el grado de pureza, y cuantificar la actividad proteolítica de las proteasas digestivas de *H. hampei*.
2. Establecer el peso molecular aparente, el nivel de pureza y definir la actividad inhibitoria de los inhibidores de proteasas de *G. max* sobre el extracto intestinal.

3.2.5 Determinación del efecto *in vitro* del extracto de soya purificado sobre la actividad de proteolítica del extracto de intestino medio de *H. hampei*

1. Determinar condiciones ópticas de reacción del extracto de intestinos de *H. hampei* y del extracto de *G. max*.
2. Cuantificar el efecto que sufren las proteasas digestivas del extracto de *H. hampei* al exponerlo a concentraciones crecientes del extracto de soya.

3.2.6 Verificación del efecto protector de los IPs de soya sobre las toxinas de *Bti*

1. Identificar los pesos moleculares relativos del extracto liofilizado de *Bti*.
2. Reconocer el grado de degradación y/o protección que adquiere el extracto de toxinas de *Bti* al ponerlo en contacto con los extractos de soya y tripsina de páncreas porcino.

3.2.7 Comprobación *in vivo* del efecto sinérgico del extracto de soya en combinación con las δ -endotoxinas del extracto purificado de *Bti*

1. Establecer la dosis letal media (LD₅₀) del extracto de cristales purificados de *Bti* sobre hembras adultas de *H. hampei*.
2. Realizar bioensayos sobre adultos, adicionando la LD₅₀ de los cristales de *Bti* con dosis incrementales del extracto de soya purificado, para verificar el efecto potenciador de los IPs sobre las proteasas del intestino medio de adultos de *H. hampei*.

CAPÍTULO 4

Metodología

4.1 Recolección en campo, almacenamiento y estimulación de la emergencia de adultos

Se obtuvieron frutos frescos en estados maduros e inmaduros que estuvieron infestados con *H. hampei* de la finca del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en el Cantón de Turrialba, Cartago; que se encuentra a 602 msnm, 9° 53' latitud norte y 83° 39' latitud oeste; durante los meses de Julio y Agosto del 2012, con el propósito de extraer los escarabajos en estadio adulto. Los frutos fueron colocados en una cámara de estimulación hecha de metal, con dimensiones de un armario y con varias bandejas de cedazo metálico recubiertas de plástico transparente (Figura 15).

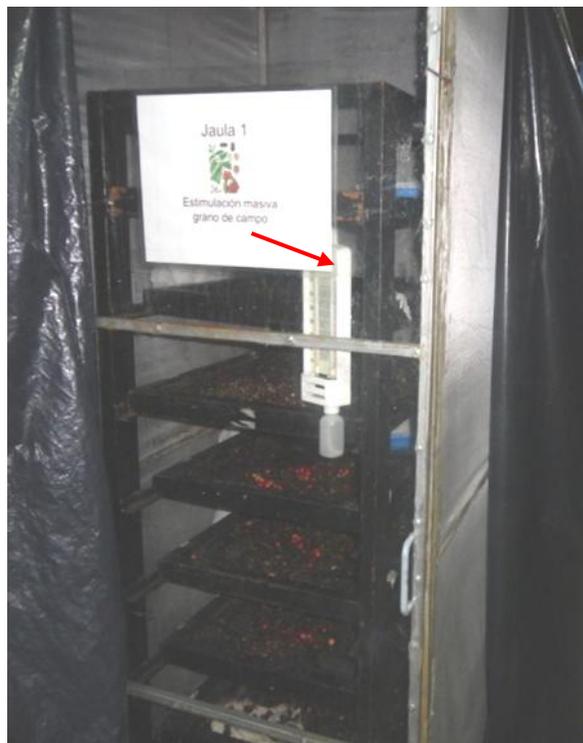


Figura 15. Cámara de estimulación masiva, utilizada para mantener a *H. hampei* en granos de café infestados. La flecha de color rojo indica el controlador de humedad y temperatura que se utilizó para mantener los parámetros adecuados para la reproducción de la broca.

El material biológico fue rociado con acaricidas Benomil y Omite al 0,1% (v/v) para prevenir la reproducción de hongos y ácaros dentro de la jaula. Además, se roció con agua destilada al menos tres veces por semana para mantener niveles de humedad relativa de 80-90% y un ámbito de temperatura de 27 a 28 °C para simular las condiciones ambientales óptimas en que la broca se desarrolla y se reproduce *in vivo*. Cada dos meses, se agregaron frutos nuevos en estados maduro e inmaduro para mantener la cría del herbívoro.

4.2 Extracción y desinfección de la broca a partir de frutos frescos

4.2.1 Extracción de broca del fruto de café

Las bayas con signos de daños ocasionados por *H. hampei* (Figura 16) se colocaron sobre papel toalla y se procedió a abrir los frutos; perforando con pinzas en el extremo opuesto donde se encuentra la hendidura de la cereza. Luego, se hizo un corte alrededor de la hendidura, evitando hacer daños sobre el grano. Los túneles en el interior del fruto se inspeccionaron hasta hallar un adulto o cría de coleópteros en estadios adulto y juvenil.

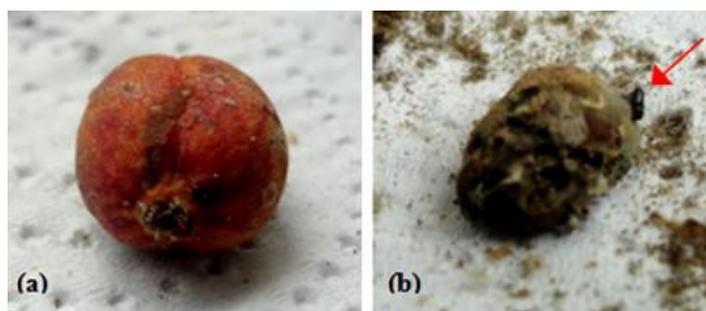


Figura 16. Frutos de café con síntomas de *H. hampei*, preparados para extraer el adulto (a) baya madura con la broca recién ingresando en la hendidura del fruto, (b) broca caminando en un grano dañado con túneles. La flecha roja indica la posición donde se encuentra la broca.

Los adultos se extrajeron de la semilla y se recuperaron utilizando un pincel fino que no produce daño aquellas brocas vivas. Después, se colocaron en una jaula plástica cuyo fondo contenía confeti para procurar prevenir que los insectos se lastimaran entre sí (Figura 17). Luego, se procedió a desinfectarlos o se almacenaron por un

periodo no mayor a 48 h en refrigeración a 4 °C dentro de la jaula plástica, para disminuir su índice metabólico.

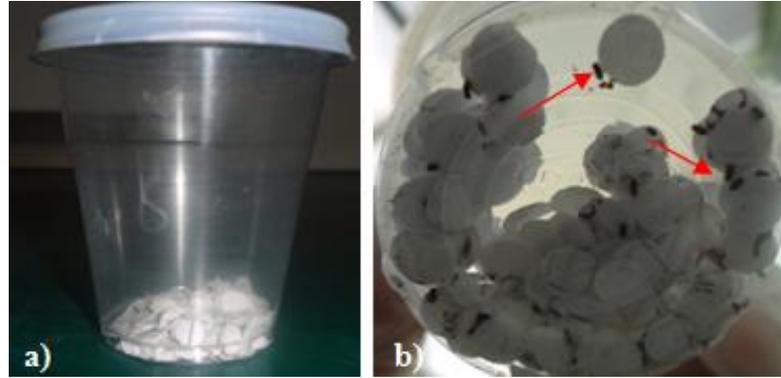


Figura 17. Jaula plástica conteniendo confeti que se utilizó para almacenar los adultos, antes de llevar a cabo la desinfección de los insectos: a) jaula plástica con confeti, b) adultos de broca colocados caminando sobre el confeti, dentro de la jaula. Las flechas rojas indican la posición de algunos adultos.

4.2.2 Desinfección de los adultos

Los escarabajos se colocaron dentro de una malla de tergal y se sumergieron por 1 min en solución de cloruro de benzalconio al 2% (v/v), agua destilada y solución de Benomil al 1% (m/v), respectivamente dos veces. Transcurrido este periodo, la malla húmeda se colocó en un ventilador por 10 min para secar el líquido remanente y se colocaron nuevamente en jaulas plásticas para proceder a la disección o en placas plásticas multipozo con un trozo de dieta Cenibroca II para mantener a la broca viva por un periodo más largo de tiempo.

4.3 Extracción de las proteasas solubles del intestino medio de *H. hampei* y obtención del extracto crudo de *G. max*

4.3.1 Extracción del intestino medio

El protocolo de disección de los adultos se desarrolló con base en los protocolos propuestos por Ajamhassani *et al* (2012), Álvarez-Alfageme *et al* (2011) Nokkala & Nokkala (2004), Oppert *et al* (2006), Pereira *et al* (2007), y Rubio *et al* (2008). Para llevar a cabo el procedimiento de disección, en un *beaker* se vertieron ~25 mL de la solución Ringer para insectos (NaCl 130 mM, KCl 2 mM, CaCl₂·2H₂O 0.8 mM,

NaHCO₃ 0.2 mM, pH 7.2), mantenida en refrigeración a 4 °C, y se colocó sobre un recipiente con hielo. Según Miller (2004), esta solución isotónica permite mantener la función normal de los fluidos en las células y tejidos de los insectos, mientras éstos se manipulan bajo condiciones *in vitro*. Los escarabajos se colocaron sobre un portaobjetos de vidrio, se procedió a observarlo en estereoscopio, y se inmovilizaron agregando unas gotas de la solución Ringer.

Cada insecto se diseccionó sujetando el abdomen del escarabajo con pinzas de disección, haciendo una incisión a nivel de protórax y mesotórax, y halando la cabeza del mismo hasta extraer el canal alimentario. En los casos en que el canal alimentario no se removió por completo, se eliminaron las alas anteriores y posteriores del insecto y el aparato reproductivo, y se recuperó la sección del protórax donde se ubica el tubo digestivo. El tubo digestivo en solución se seccionó para recuperar el intestino medio.

4.3.1.1 Obtención de extractos solubles crudos

Cada intestino medio obtenido se depositó en tubos de microcentrífuga tipo *Eppendorfs* (previamente enfriados a 4 °C) con capacidad de 1,5 mL, los cuales contenían 100 µL de solución buffer Trizma-HCl 50 mM (pH 8.0). Cada intestino medio se maceró y se homogenizó con un micropistilo esterilizado previamente, y cada uno se almacenó en congelador a -20 °C. Después, la solución en los tubos se descongeló con el calor de la mano y se agitó levemente en vortex durante un periodo de 2 min. Enseguida, el líquido de los tubos se trasvasó a un tubo de centrífuga con capacidad de 150 mL y se procedió a centrifugarlo a 10.000× *g* por 30 min a 4 °C en centrífuga Sorvall WX Ultra Centrifuge Series (Thermo Scientific, Waltham, MA), se decantó cada sobrenadante en un recipiente con dimensiones apropiadas y se descartó el botón o *pellet* con la mayor parte de restos celulares y proteasas insolubles. El homogenizado completo se almacenó nuevamente a -20 °C hasta su uso.

4.3.2 Obtención del extracto crudo a partir de harina de soya

Para extraer inhibidores de proteinasas, se partió de harina de frijol de soya comercial y se siguió el protocolo de Roosta *et al* (2011). La harina se homogenizó en agua

destilada durante 30 min. Luego, se centrifugó el homogenizado a $3.000 \times g$ por de 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ en centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B Automatic Refrigerated (Thermo Scientific) y se reservó el sobrenadante. El botón (*pellet*) también se recuperó y se sometió a re-extracción en agua destilada, y la solución se centrifugó nuevamente bajo las condiciones iniciales. Ambos sobrenadantes se combinaron, se ajustaron a $\text{pH} = 3$ y se conservaron a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h (Figura 18). Subsecuentemente, el líquido se reajustó a $\text{pH} = 3$, se centrifugó a $13.000 \times g$ por 20 min y el sobrenadante se guardó como extracto crudo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la precipitación.

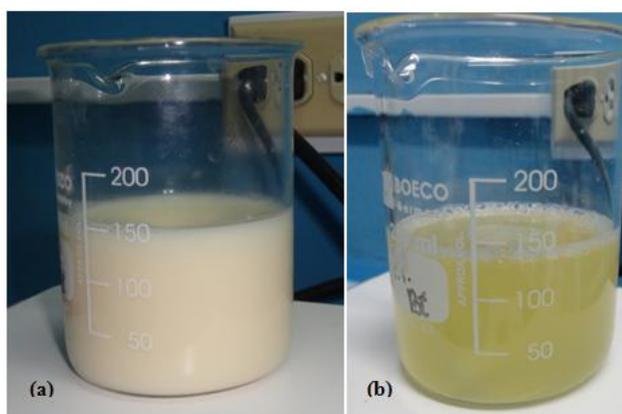


Figura 18. Sobrenadantes de soja obtenidos durante las diversas etapas de extracción, (a) sobrenadantes obtenidos antes de almacenar a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h, (b) extracto de soja recuperado luego de reajustar el pH a 3 y centrifugar a $13.000 \times g$ y almacenado como extracto crudo a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4 Purificación de los extractos crudos de intestino medio y de soja

Los extractos crudos con las proteasas solubles se precipitaron con soluciones saturadas de sulfato de amonio y se dializaron con los métodos desarrollados por Kumar *et al* (2003); adaptado por Aguirre *et al* (2004), Benjakul *et al* (1999), Bijina (2006), Castillo-Yáñez *et al* (2005), Castro-Guillén *et al* (2012), El-Beltagy *et al* (2005), Ghodke *et al* (2012), Klomklao *et al* (2011a y 2011b), Lingaraju & Gowda (2008), Molina (2010), Pereira *et al* (2007) y Van-Hau & Benjakul (2006).

4.4.1 Precipitación de extractos crudos con sulfato de amonio ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$)

Las enzimas son complejos proteicos que poseen grupos ionizables e hidrofóbicos, por lo que al interactuar con elevadas concentraciones de sales, sufren una

modificación en las fuerzas electrostáticas, que son responsables de su solubilidad. El agente comúnmente empleado para aglomerar y concentrar proteínas es el sulfato de amonio, cuyo nivel de saturación óptimo varía entre 20 y 80% (m/v) (Ahele; 2008; Cutler, 2004). Para el procedimiento realizado, se añadió lentamente solución de sulfato de amonio al 60% (m/v) de saturación a un volumen de extracto crudo de *G. max* ó sulfato de amonio saturado al 70% (m/v) al extracto crudo de intestino medio de *H. hampei*, de acuerdo con el factor de corrección establecido con el nivel de saturación¹². Los extractos en solución con el $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ se mantuvieron en baño de hielo y en agitación magnética (75 rpm) durante 2 h.

Después de que el sulfato de amonio se disolvió por completo en el volumen de extracto, la solución saturada se centrifugó a $10.000 \times g$ durante 15 min en refrigeración a 4 °C, en centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B Automatic Refrigerated (Thermo Scientific) y se recuperaron los *pellets*. El botón del extracto de intestinos se resuspendió en la mínima cantidad de volumen de solución buffer Trizma-HCl 20 mM (pH 7.5), mientras que el *pellet* del extracto de soya se resuspendió en agua destilada; para proceder a la diálisis.

4.4.2 Diálisis de los extractos crudos de proteínas

Según Berg (2002), la diálisis es un método de purificación por tamaño que permite separar mezclas proteicas a través de una membrana semipermeable; la cual retiene moléculas con dimensiones mayores al diámetro del poro, mientras que las pequeñas moléculas pueden atravesar los poros y quedar disueltas en el medio líquido (dializado). El índice de penetración de las moléculas desde la membrana al dializado es proporcional a la concentración de la muestra que se añade a la membrana y es inversamente proporcional a los pesos moleculares de los compuestos en la muestra.

Para dializar los extractos, se utilizaron membranas de celulosa regenerables Spectra/Por® de 12-14 kDa (Spectrum Labs, Irving, TX). Para el extracto crudo de

¹² Para más detalles sobre el cuadro del factor de corrección, consultar el boletín técnico de Sigma-Aldrich:
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/a5479bul.Par.0001.File.tmp/a5479bul.pdf>

intestinos se utilizó un tubo de diálisis con una capacidad de $0,32 \text{ mL}\cdot\text{cm}^{-1}$; mientras que para el extracto de harina de soya se empleó un tubo con capacidad de $2 \text{ mL}\cdot\text{cm}^{-1}$. Cada membrana semipermeable recibió un pre-tratamiento con agua destilada durante 30 min a temperatura ambiente para remover perseverantes (glicerina o azida de sodio), según las especificaciones del fabricante.

Transcurrido este tiempo, se añadió buffer Trizma-HCl 20 mM (pH 7.5) o agua destilada en matraces con las dimensiones apropiadas para dispensar un volumen determinado a los tubos. Se colocó un cierre en un extremo de cada tubo, se agregó el botón resuspendido de cada extracto dentro de la membrana y se colocó el otro cierre en el otro extremo. Los tubos sellados con la solución dentro, se sumergieron en el matraz con buffer o agua destilada, se mantuvieron en baño de hielo y bajo agitación orbital durante 24 h, realizando recambios cada ~ 12 h (Figura 19). Después de este tiempo, se removió uno de los cierres y el contenido de cada extracto dializado se vertió en tubos Falcon con capacidad de 30 mL y se almacenó a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ para realizar el procedimiento de liofilización (Sección 3.7).



Figura 19. Montaje de tubos de diálisis con capacidad de $2 \text{ mL}\cdot\text{cm}^{-1}$, utilizados para la purificación de los extractos crudos de soya¹³.

¹³ Los tubos con extractos de intestino medio recibieron un montaje similar, sólo que con tubos más pequeños.

4.5 Aislamiento de las protoxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*

4.5.1 Cultivo sincronizado de cepa *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* en medio HCT para inducción de esporulación

La cepa de *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* utilizada para recuperar toxinas se cultivó en medio HCT estándar esterilizado (adicionando KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 1N, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, peptona y sacarosa, pH 7.5), que rutinariamente se usa para inducir la esporulación de *Bt* (Grandvalet *et al*, 2001; Lecadet *et al*, 1980). Para ello y empleando técnica aséptica, 250 mL de medio preparado se añadieron a un matraz tipo *erlenmeyer* con capacidad de 1 L. Enseguida; se tomó una alícuota de la cepa de *Bti* (almacenada a -20°C) con asa bacteriológica, se inoculó en el *erlenmeyer* y se mantuvo en crecimiento durante 3 a 5 días, corroborando a diario que no hubiese contaminación y manteniendo parámetros estables de 200 rpm a $28-30^\circ\text{C}$.

4.5.2 Cuantificación de esporas viables

Además de verificar la pureza del medio HCT, la cuantificación de esporas viables es un procedimiento apropiado para dar un indicio de la producción de δ -endotoxinas, ya que en algunas cepas, la síntesis de esporas se relaciona directamente con la producción de los componentes tóxicos o toxinas Cry en *Bt* (Rajoka *et al*, 2012).

En un tubo tipo *Eppendorf* con capacidad de 1,5 mL, se tomó 1 mL de muestra de caldo de cultivo de bacterias *Bti* crecidas en matraz en el medio HCT. Seguidamente, dicha muestra con la suspensión de esporas y cristales se calentó a 80°C por 10 min para destruir células vegetativas. Después, se realizaron diluciones seriadas hasta una razón de 10^{-7} , adicionando solución salina NaCl al 0,85% (m/v) en cada fase de dilución y se homogenizó en vortex. De las últimas dos diluciones realizadas, se tomó una alícuota de 100 μL de cada una y se extendió a lo largo de la superficie de un plato con agar Lauria-Bertani (LB), incubado previamente a $28,8^\circ\text{C}$ para remover la humedad. Transcurridas 24 h, las placas se sacaron de la incubadora y se

contabilizaron las colonias entre 20 y 300 UFC (Figura 20). Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC·mL⁻¹).



Figura 20. Visualización de esporas en dilución de 10^{-7} , creciendo en placa Petri con caldo de cultivo Lauria-Bertani (LB), utilizadas para la cuantificación de esporas viables.

4.6 Separación y purificación de las δ -endotoxinas de la cepa *Bti*

Los procedimientos para asilar y purificar la mezcla de cristales y esporas dentro del medio de cultivo se llevaron a cabo con base en los protocolos propuestos de Bravo y Silva-Filha (2002), Delafield *et al* (1968), Fuchs *et al* (1993), Liu *et al* (1998) y Yamamoto & Iizuka (1983).

4.6.1 Separación y tinción de la mezcla con cristales y esporas

Luego de comprobar la pureza del cultivo, éste se ajustó a un pH de 4.0 para el mantenimiento de la suspensión bacteriana. El medio con el complejo espора- cristal se centrifugó a $10.000 \times g$ a $4^\circ C$ durante 10 min en centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B Automatic Refrigerated (Thermo Scientific), se recuperó el *pellet* y seguidamente se lavó en solución NaCl 1 M dos veces para eliminar las proteasas endógenas de *Bt*. Dicho *pellet* con la suspensión se disolvió en agua destilada en proporción 1:18. Subsecuentemente, el medio se agitó en vortex y se sonicó en baño ultrasónico, modelo FS6 (Fisher Scientific, Illkirch, France), ajustado una frecuencia de 40 kHz durante 1 min. Según Joyce *et al* (2003), las bacterias que esporulan no sufren efectos dramáticos en su viabilidad bajo frecuencias de 20 a ~40 kHz, a menos

de que el proceso de sonicación supere los 15 min. Dicho proceso más bien facilita la disrupción y disgregación celular.

La solución sonicada se trasvasó a un embudo de separación con capacidad de 125 mL y se agitó vigorosamente hasta visualizar la formación de dos capas claramente distintas: una acuosa y otra espumosa que apareció por encima del líquido. Las δ -endotoxinas embebidas en la fase acuosa se separaron por densidad de la fase espumosa que tenía las esporas, agitando el embudo y dispensando ambas fases en recipientes diferentes por al menos 10 veces, hasta remover completamente la espuma de las paredes del embudo. La espuma se removió del embudo de separación agregando suficiente agua destilada entre cada etapa de separación y las fases se conservaron a 4 °C. Subsecuentemente, cada fase se analizó mediante microscopía de luz, tomando una alícuota con el asa bacteriológica de manera aséptica y distribuyéndola en toda la superficie del portaobjetos. Seguidamente, la muestra se fijó a la llama, se tiñó con una solución de azul de Coomasie al 2,5% (m/v) por un periodo de 1 min y se procedió a observar las diferentes estructuras morfológicas.

4.6.2 Purificación de los cristales mediante un gradiente discontinuos de densidad de sacarosa

Después de analizar el frotis y comprobar que la mayor parte de los cristales se acumularon en la fase acuosa del embudo de separación, el líquido se centrifugó a 10.000 rpm por un periodo de 45 min a 4 °C en centrífuga Sorvall Superspeed RC2-B Automatic Refrigerated (Thermo Scientific), se recuperó el *pellet* y se resuspendió en la mínima cantidad de agua destilada. El *pellet* resuspendido se colocó sobre un tubo de centrífuga con un gradiente discontinuo de densidad de sacarosa, saturado al 67%, 72%, 79% y 84% (p/v) (con Triton X-100, Trizma-HCl a pH 8.0 y NaCl 5 M) (Figura 21) y se procedió a realizar una centrifugación isopícnica en centrífuga Sorvall WX Ultra Series (Thermo Scientific) a 23.000 rpm por 30 min a 15 °C utilizando un rotor de columpio sin freno.

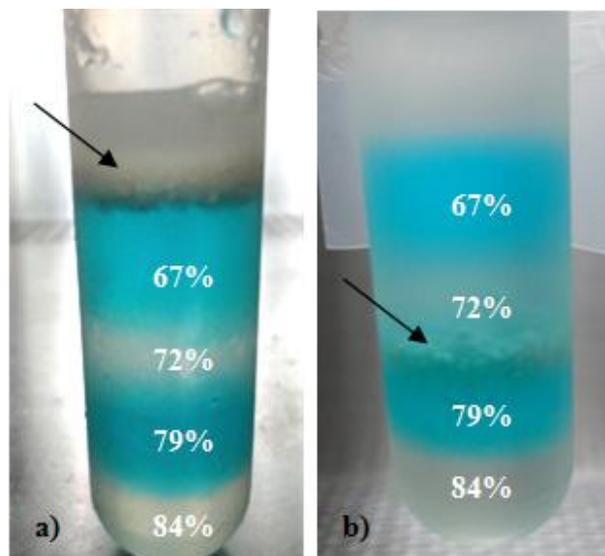


Figura 21. Gradiente de sacarosa utilizado para separar los cristales *Bti*. Los gradientes saturados al 67% y 79% de sacarosa fueron teñidos con colorante azul vegetal para distinguir todas capas. (a) Gradiente antes de centrifugar la muestra, (b) gradiente luego de centrifugar la muestra a 23.000 rpm. Las flechas corresponden a la ubicación del extracto con δ -endotoxinas.

Enseguida, se tomaron alícuotas de cada capa del gradiente y se procedió a observar las estructuras microscópicas. Usualmente, éstos se ubican en la interfase entre los gradientes de sacarosa con 67 y 72% de saturación, aunque ese resultado depende de la forma y el tamaño de los cristales recuperados durante las etapas anteriores. Al final, la mayor parte de la sacarosa se removió de las proteínas haciendo tres lavados con agua destilada, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min, se recuperó el *pellet* y se almacenó en refrigeración a -20 °C hasta llevar a cabo la liofilización.

4.7 Liofilización de las soluciones dializadas

El proceso de secado por congelación o liofilización es un proceso en el que las muestras se secan por sublimación, y es útil para preservar materiales biológicos sensibles al calor, como las enzimas. La liofilización se basa en la presión de vapor ejercida sobre sólidos y permite remover los solventes de materiales congelados previamente; convirtiendo las soluciones en estado sólido a vapor directamente. Las limitaciones de emplear este método es que la concentración de los componentes presentes en la muestra pueden causar que el proceso demore más de la cuenta y

produce un gasto de energía relativamente elevado por el control de la presión y la temperatura en el equipo (Blaine & Thomas, 2012).

Las muestras con los extractos de intestino medio, de soya y de δ -endotoxinas *Bti* se conservaron en congelación a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ toda la noche antes de liofilizarlas. Consecutivamente, se colocaron en los frascos para liofilizar junto con el adaptador y se conectaron en el colector del liofilizador FreeZone® (Labconco, Kansas City, MO)¹⁴. Se procedió a encender la bomba de vacío que está acoplada al equipo, luego se encendió el aparato para liofilizar y se ajustaron las condiciones para refrigerar y generar vacío. El proceso de liofilización se estuvo monitoreando cada 3 h aproximadamente, verificando que la bomba de vacío absorbiera el calor y transfiriera el vapor de agua de la superficie de la muestra al colector. Transcurridas 8 h, se detuvo el proceso; las muestras se recogieron y se almacenaron en refrigeración a $4\text{-}8\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso en las pruebas posteriores (Figura 22).

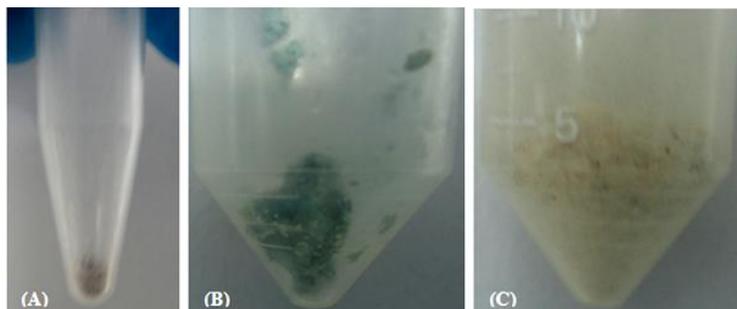


Figura 22. Extractos liofilizados y utilizados para realizar los análisis posteriores: (a) extracto con intestino medio de *H. hampei*, (b) extracto con las toxinas de *Bti*, (c) extracto de harina de *G. max*.

4.8 Caracterización del extracto de soya y de los intestinos de *H. hampei*

La preparación y tinción de los gels SDS-PAGE y PAGE-nativo desarrollado sobre los extractos aislados se realizaron con base en los protocolos estándar propuestos por Laemmli (1970) y Madriz-Ordeñaña *et al* (2009); adaptados por Ajamhassani *et al* (2012), García-Carreño & Haard (1993), García-Carreño *et al* (1993), Klomklao *et al* (2011), Lingaraju & Gowda (2008), Nack-Shick *et al* (2004), Pérez *et al* (2003),

¹⁴ Para más información, consultar el manual de uso del equipo en el siguiente link:
http://toolik.alaska.edu/edc/equipment/equipment_manuals/Freeze_Dryer_Labconco_45L.pdf

Prasad *et al* (2010), Sharifi *et al* (2012), Sriket *et al* (2011) y Van-Hau & Benjakul (2006); con ligeras modificaciones.

4.8.1 Identificación del perfil proteico y pureza de los extractos crudos de intestinos y de soya mediante SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida es una herramienta adecuada para caracterizar la heterogeneidad y visualizar el grado de pureza de mezclas de proteínas con base en los pesos moleculares aparentes, ya que las proteínas son macromoléculas con carga (Madriz-Ordeñaña *et al*, 2011). Esta técnica permite que el complejo proteico migre a través de una matriz o soporte poroso por acción de un campo eléctrico (ánodo/cátodo) (Aehle, 2007).

La fracción de extracto de intestino medio y de soya se disolvieron cada una por aparte con buffer de carga (Trizma-HCl 1 M (pH 6.8), SDS, glicerol al 87% (v/v), EDTA 0,5 M (pH 6.8), azul de bromofenol y β -mercaptoetanol) en proporción 10:1. Cada mezcla se calentó por 10 min y se cargaron 10 μ L de proteínas en el gel, hecho con geles discontinuos de montaje al 6% (m/v) y de separación al 12,5% (m/v) de acrilamida/bisacrilamida (29:1) y utilizando peines con espesor de 0,5 mm. Además, se cargó el marcador de peso molecular *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (10-170 kDa), (número de catálogo 26616, Thermo Scientific) y se agregaron los respectivos controles positivos de tripsina de páncreas porcino, (T7409 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), cuyo peso molecular es de 23,8 kDa; e IP de tripsina de soya Kunitz de *Glycine max*, (T2328, Sigma-Aldrich) que posee una masa de 20,1 kDa. La corrida se hizo en cámara de electroforesis Miniprotean II Cell (Bio-Rad, Hercules, CA) a 100-150 V por 2 h o hasta que las muestras alcanzaran el fondo del gel.

Transcurrida la corrida electroforética, los geles se lavaron tres veces con agua destilada para remover el exceso de solución de corrida y eliminar burbujas. Seguidamente, se colocaron en solución de tinción, con azul de Coomassie R-250 al 2,5% (m/v) metanol al 45% y ácido acético al 9,2% (v/v); y transcurridas 2 h se destiñeron en solución decolorante etanol-metanol-ácido acético (10%-20%-5% v/v)

toda la noche y haciendo al menos dos recambios del decolorante. Los geles se observaron bajo luz blanca y las masas se estimaron comparando las muestras con los controles de las enzimas comerciales y con el marcador de peso molecular.

4.8.2 Zimografía en una dimensión empleando el método *substrate*-SDS-PAGE para estimar la actividad proteolítica y cuantificar las proteasas en el intestino medio de *H. hampei*

Las enzimas pueden recuperar su actividad proteolítica después de sufrir disrupción de enlaces disulfuro dentro del gel electroforético, removiendo el detergente SDS con una solución Triton X-100 (García-Carreño & Haard, 1993). Esta técnica utiliza comúnmente gelatina, fibrina o caseína como sustratos para observar la actividad enzimática; en este caso, se desarrollaron dos geles que se co-polimerizaron con 0,1% (m/v) de gelatina derivada de piel bovina (G9391, Sigma-Aldrich). Para ello, las muestras se mezclaron en proporción 1:10 con buffer de carga, ausente de β -mercaptoetanol y sin calentarlas antes de hacer la corrida. Uno de los geles se cargó con las muestras de intestino medio parcialmente purificadas de *H. hampei*, tripsina porcina (Sigma-Aldrich) y una mezcla 1:1 del extracto intestinal junto con el extracto de soya para corroborar el nivel de inhibición de la actividad enzimática; mientras que el otro gel se cargó con diluciones decimales de la tripsina porcina para desarrollar una curva de actividad trípica y definir la cantidad de tripsín-proteinasas digestivas bio-activas que se aislaron del extracto digestivo de la broca.

Después de la electroforesis, cada el gel se lavó con solución de Triton X-100 al 2,5% (v/v) disuelto en Trizma-HCl 100 mM (pH 8.0); se aseguró de cubrir el gel por completo y se realizaron al menos cinco recambios cada 10 min. Enseguida, los geles se lavaron con agua destilada y se hicieron recambios de 10 min hasta que no se apreciaran burbujas. Se dispuso a enfriar cada gel por 30 min en refrigeración a 4 °C para permitir que el sustrato penetrara el gel y finalizado este tiempo, el gel se calentó a 55 °C con agitación manual constante por un lapso de 2 h para promover que las enzimas activas dentro del gel digirieran el sustrato.

De inmediato, los geles se tiñeron con solución de azul de Coomassie R-250 al 2,5% (m/v), disuelto en metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 9,2% (v/v) por 2 h. Subsecuentemente, se observó el gel en luz blanca para visualizar la presencia de zonas claras o ligeramente teñidas sobre fondo azul oscuro; que indicaron actividad proteolítica debido a la presencia de posibles proteasas que digirieron el sustrato (Pan *et al*, 2011). La imagen de cada zimograma se cuantificó mediante el programa procesador de imágenes Quantity One®, versión de prueba 4.6.6. (Bio-Rad). Cada imagen se trasladó al negativo y se midió el perfil de densidad óptica (mm^2) correspondiente a las regiones de gelatina digeridas en el gel, encerrando en recuadros las bandas de actividad proteolítica originadas tanto por la tripsina porcina como por el extracto de intestino medio. A partir de los valores de áreas arrojadas por el software de la imagen en que se hicieron las diluciones de tripsina porcina, se calculó el \log_{10} de masa de tripsina activa (ng) y se trazó una curva de actividad triptica. Posteriormente se estimó el área de las tres bandas de actividad del extracto de broca y con ayuda del gráfico, se calculó el promedio de proteínas bio-activas.

4.9 Análisis de actividad óptima del extracto de soya y su efecto inhibitorio sobre las proteasas digestivas presentes en el extracto intestinal de adultos de broca

Los protocolos para estimar la actividad de extractos de soya e intestino de la broca se realizaron según Amorim *et al* (2008), Benjakul *et al* (1999), Bijina (2006), Deshimaru *et al* (2002), Díaz (2006), Díaz-Tenorio *et al* (2006), Dorrah *et al* (2008), García-Carreño *et al* (1993), Ghodke *et al* (2012), Gómez *et al* (2005), Hosseininaveh *et al* (2007), Klomklao *et al* (2011), Kumar *et al* (2007), Kusuma *et al* (2009), Macgregor *et al* (2001), Pereira *et al* (2008), Prasad *et al* (2010), Rodríguez-Macedo *et al* (2011), Shamin *et al* (2011), Sharifi *et al* (2012) y Van-Hau & Benjakul (2006).

4.9.1 Efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad proteolítica del extracto de soya utilizando el método espectrofotométrico

El hidrocloreuro de N α -benzoil-DL-arginina-4-nitroanilida (BAPNA) es una mezcla de isómeros que se utiliza como sustrato cromogénico porque tiene las ventajas de ser soluble en solución de DMSO o 2-propanol, es estable en ausencia de la enzima, es

sensible y específico para la enzima en consideración, que en este caso fueron las tripsín-proteinasas. El isómero L- se hidroliza por tripsina, mientras que el isómero D- actúa como un inhibidor competitivo de las tripsín-proteasas (Correia *et al*, 2001).

Cuando una proteasa con actividad amidasa se pone en contacto con una solución del BApNA; dichas proteasas reaccionan hidrolíticamente entre grupos carboxilo (-CO) y amino (-NH) del sustrato, resultando en la liberación una molécula de *p*-nitroanilina, que genera una coloración amarilla en solución (Figura 23). El color producido por la catálisis se puede cuantificar por espectrofotometría UV-visible a una longitud de onda de 405 nm. (Arias, 1993; Guedidi *et al*, 2012; Pichaikannu, 2005).

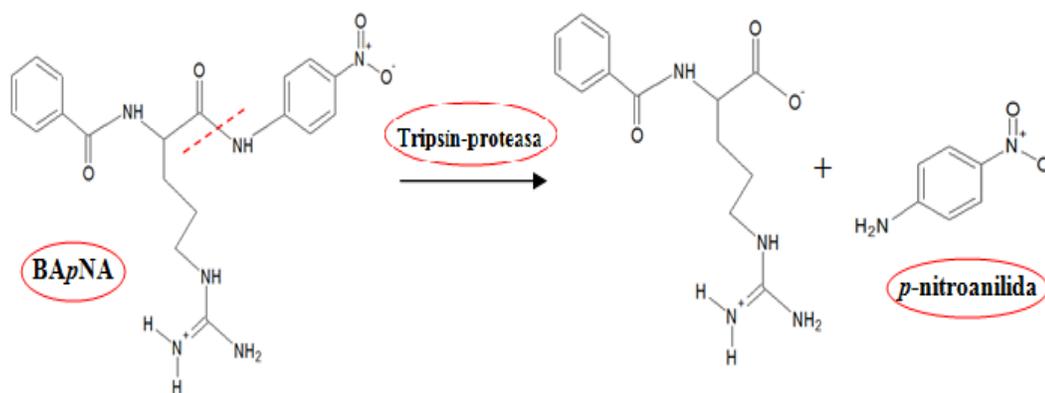


Figura 23. Esquema de la reacción hidrolítica de las tripsín-proteasas sobre el sustrato BApNA. La línea punteada indica el sitio de ruptura del sustrato. La tripsina hidroliza BApNA en dos productos, incluyendo la *p*-nitroanilina que produce el color amarillo. Fuente: Correia *et al* (2001).

La temperatura y pH óptimos bajo los que actúan los inhibidores de proteinasas presentes en el extracto de soya, se determinaron a partir de las proteínas liofilizadas, cuantificando la actividad proteolítica con diferentes soluciones amortiguadoras y a diferentes temperaturas. La temperatura óptima se determinó bajo un ámbito de temperaturas de 35 a 85 °C a intervalos de 5 °C para cada determinación y utilizando el buffer Trizma-HCl (pH 7.5); mientras que el pH óptimo se analizó empleando las siguientes soluciones amortiguadoras al 50 mM: acetato (pH 2.0, 3.0 y 3.5), citrato (pH 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5), fosfato (pH 6.0, 6.5 y 7.0), Trizma-HCl (7.5, 8.0, 8.5, 9.0 y 9.5) y glicina-NaOH (pH 10.0, 10.5 y 11.0).

El buffer acetato se preparó mezclando acetato de sodio anhidro con ácido acético glacial, para el buffer citrato se mezclaron citrato de sodio tribásico dihidratado con ácido cítrico anhidro, el buffer fosfato se preparó adicionando fosfato de sodio anhidro monobásico con fosfato de sodio anhidro dibásico, el buffer Trizma-HCl se preparó añadiendo Trizma-HCl y el buffer glicina-NaOH se elaboró agregando glicina. El pH de cada buffer se ajustó con soluciones de ácido clorhídrico o hidróxido de sodio al 1 N con ayuda de un pHmetro.

La actividad enzimática se cuantificó diluyendo en un matraz 250 μL solución enzimática del extracto de soya ($2.857 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) en 1 mL de cada solución amortiguadora para establecer el pH óptimo ó buffer Trizma-HCl 50 mM (pH 7.5) para estimar la temperatura óptima. Luego, se calentó cada solución a 37°C (ó a un intervalo de $35\text{-}85^\circ\text{C}$) durante 5 min. Seguidamente, se adicionaron 400 μL de solución BApNA ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) disuelta en DMSO y pre-calentada a 37°C por 5 min. La proteólisis a 37°C se mantuvo por 10 min, y se detuvo agregando 350 μL de ácido acético al 30% (v/v) a la mezcla de reacción.

Después de enfriar las muestras en refrigeración a 4°C por 30 min, éstas se centrifugaron a $10.000 \times g$ por 5 min para descartar el sustrato sin digerir (el *pellet*) y poder cuantificar los péptidos solubles que se liberaron (sobrenadante). Finalmente, la absorbancia se registró a 405 nm, utilizando el espectrofotómetro Unico 1.100 Series (Unico Scientific, Dayton, NJ), y la fórmula utilizada para calcular la actividad enzimática resultante fue la siguiente:

$$\text{Actividad enzimática (U/mL)} = \frac{(A_{405} - A_0) \times 1.000 \times \text{volumen final de la mezcla de reacción (mL)}}{\text{Coeficiente de extinción} \times \text{tiempo de reacción (min)} \times \text{volumen de solución enzimática (mL)}}^{15}$$

Donde, A_{405} y A_0 se consideraron como las absorbancias de la muestra y del blanco, respectivamente, leídas a una longitud de onda de 405 nm y el coeficiente de extinción molar de la *p*-nitroanilina correspondió a $8.800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El blanco se

¹⁵ En la prueba de la sección 3.9.2 en que se realizaron diluciones decimales para realizar ensayos de actividad inhibitoria con el extracto soya e intestino medio de broca, la fórmula utilizada para determinar la actividad enzimática se multiplicó por el respectivo factor de dilución (1:10, 1:100, 1:1.000, y así, sucesivamente).

preparó mezclando el sustrato DL-BApNA con buffer respectivo, sin añadir extracto de soya, y el tratamiento fue el mismo que se describió en el procedimiento anterior. Una unidad de enzima se definió como la cantidad de enzima (μmoles) capaz de aumentar la absorbancia en 1 densidad óptica, partiendo de la proteólisis de la *p*-nitroanilina liberada por $\text{min}\cdot\text{mL}^{-1}$ de enzima, bajo las condiciones establecidas.

Todos los procedimientos mencionado se efectuaron por triplicado, con los respectivos blancos reactivos y los resultados se expresaron como un promedio las lecturas de absorbancia obtenidas de cada muestra \pm la desviación estándar (SD). Para determinar si los promedios obtenidos con las diversas temperaturas o niveles de pHs fueron diferentes uno del otro, se desarrolló una prueba ANOVA de una vía ($\alpha = 0,05$); seguido de un análisis Tukey para comparar y estimar cuán significativas fueron las diferencias de la prueba ANOVA (Ver explicación en la sección 3.12).

4.9.2 Efecto del extracto de soya purificado sobre la actividad proteolítica del extracto intestinal o tripsina porcina, mediante el método espectrofotométrico

Luego de estimar las condiciones óptimas de pH y temperatura en las que operan las enzimas presentes en el extracto de soya, se cuantificó el efecto de la actividad enzimática de éste sobre el extracto de intestino medio de *H. hampei* o sobre tripsina porcina para verificar la veracidad de los resultados obtenidos en la sección 4.9.2. Para ello, se llevaron cabo ocho diluciones decimales hasta llegar a un factor de 1:100.000.000. Enseguida, en diferentes frascos *erlenmeyer* se mezclaron 100 μL de cada dilución del extracto de soya ($2.857 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) con 200 μL de extracto intestinal de broca ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y 1 mL del buffer con el que se alcanzó la mejor actividad proteolítica, y esta mezcla se pre-incubó a la temperatura ideal por 10 min. Luego, se vertieron 400 μL de solución de sustrato DL-BApNA ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) disuelta en DMSO (y pre-calentada 10 min a 37 °C). Al final, se adicionaron 300 μL de ácido acético al 30% (v/v) para detener la reacción y las muestras se sometieron a centrifugación a $10.000 \times g$ por 5 min para recuperar el sobrenadante y se enfriaron a 4 °C.

Para calcular los valores de actividad enzimática específica, se utilizó la misma fórmula empleada en la sección 3.10.1, con la diferencia de que cada resultado se multiplicó por el factor de dilución de la muestra diluida (desde 10^{-1} hasta 10^{-8}). Como ensayos paralelos, se establecieron controles negativos mezclando tripsina de páncreas porcino ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) con el inhibidor de soya Kunitz (SKTI) a 0,12 mM (Sigma-Aldrich) o con el inhibidor irreversible fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a 0,16 mM (Sigma-Aldrich) para identificar la actividad inhibitoria; y un control positivo, añadiendo muestra de intestino de la broca ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) y solución DL-BAPNA ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), pero sin agregar inhibidor. Estas pruebas se llevaron a cabo para comparar la actividad enzimática resultante de la reacción entre los extractos soya-broca con SKTI-tripsina ó PMSF-tripsina. Se realizaron tres réplicas de cada ensayo para que el análisis fuera estadísticamente aceptable.

4.10 Efecto combinatorio de los cristales purificados de *Bti* y de los IPs de *G. max* sobre la actividad enzimática de tripsina porcina mediante SDS-PAGE

Para verificar si el extracto de inhibidores de proteasas de soya fue capaz de prevenir la degradación de las toxinas asiladas de *Bti* mediante la inhibición de la actividad proteolítica de una proteasa ambiental, se realizó un SDS-PAGE con tripsina de páncreas porcino (Sigma-Aldrich). Para ello, se tomó una muestra de 1 mg de extracto purificado de *Bti* y se colocó sobre un tubo de centrifuga. Además, se hicieron mezclas de cristales con tripsina porcina (1:1), cristales con extracto de soya (1:1) y cristales, tripsina y extracto de soya (1:1:1), tomando 1 mg de cada extracto y haciendo la mezcla correspondiente. Para corroborar el efecto cristales-tripsina-soya, se hicieron diluciones a razones de 10^{-5} y 10^{-10} .

Seguidamente, se procedió a calentar los tubos con las diferentes muestras a 37 °C durante un periodo de 30 min. Luego, a las diferentes mezclas se les añadió buffer de carga (Trizma-HCl 1 M (pH 6.8), SDS, glicerol al 87% (v/v), EDTA 0,5 M (pH 6.8), azul de bromofenol y β -mercaptoetanol) en proporción 10:1. Los geles se prepararon mediante el método de Laemmli (1970) y el resto del protocolo se continuó de acuerdo con la sección anterior 3.8.1, tiñendo el gel con solución de azul de

Coomasie R-250 al 2,5% (m/v) (con metanol al 45% (v/v) y ácido acético al 9,2% (v/v)) y destiñendo con solución decolorante etanol-metanol-ácido acético (10%-20%-5% v/v). El peso molecular de las toxinas de *Bti* se estimó con el marcador de peso molecular *Prestained Page Ruler* (Thermo-Scientific).

4.11 Determinación de la concentración letal media (LD₅₀) del extracto con cristales de *Bti* y comprobación del efecto sinérgico de *Bti* con los IPs derivados del extracto de soya en bioensayos con dieta artificial

Se realizaron dos bioensayos en dieta Cenibroca II, uno para calcular la dosis letal media (LD₅₀) de los cristales de *Bti* y otro para comprobar si hubo un efecto sinérgico de los IPs del extracto de soya junto con el extracto de *Bti* sobre hembras adultas de *H. hampei*. Los bioensayos se prepararon con las metodologías que describe Oviedo (2006) y con base en los protocolos internos del grupo de control biológico del CIBCM, mezclando café oro pulverizado (previamente esterilizado), agar disuelto en agua, Benlate 50 WP al 50% (p/v) (Benomil), levadura, caseína, sacarosa, ácido benzoico, vitaminas Vanderzant (V 1007), sales Wesson (W 1374), etanol al 95% (v/v), formaldehído (F1268, Sigma-Aldrich), bietrol (Lagos-Giraldo, 2009). Dicha mezcla se homogenizó en licuadora por un periodo de 2 min y luego se dispensó 1 mL de la solución en cada celda de las placas multipozo desechables estériles (Evergreen Scientific®, Los Angeles, CA). Tales placas tienen un 12,7 cm de largo; 8,5 cm de ancho y 2 cm de alto aproximadamente; además cada placa cuenta con 24 pozos con un diámetro de 1,7 cm y 1,8 cm de profundidad para un volumen de 2 mL por pocillo. La dieta se almacenó en refrigeración a 4 °C hasta su uso, y no se utilizó ninguna placa hasta después de cumplir tres días desde la preparación de la dieta.

4.11.1 Determinación de la concentración letal media (LD₅₀) del extracto conteniendo los cristales purificados de *Bti*

Se realizó un bioensayo preliminar para determinar la concentración de cristales purificados de *Bti* que mataba el 50% de la población de broca, para que a partir de esa dosis, se aumentara dicha mortalidad con la incorporación de concentraciones incrementales de inhibidores de proteasas del extracto de soya. De esta forma, se

mezclaron 50 μl de Tween-20 al 0.1% (v/v) con 450 μl de agua destilada estéril, y luego se añadió el polvo liofilizado de *Bt* subs. *israelensis* purificado y conteniendo cristales a las siguientes concentraciones: 0,233 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 0,389 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 0,648 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y 1,08 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Dichas soluciones preparadas de manera independiente, se agitaron en vortex por 3 min y después se sonicaron durante 5 min en baño ultrasónico FS6 (Fisher Scientific) a 40 kHz para homogenizar las muestras, ya que a esta frecuencia se favorece la disrupción del 98% del esporangio sin afectar las células, por un periodo de sonicación inferior a 15-20 min (Lenin *et al*, 2007).

Se procedió a colocar 20 μL del control positivo ó de las cuatro diluciones en cuatro celdas distintas dentro la placa multipozo con dieta Cenibroca, y se dejó secar por 30 min en cámara de flujo laminar. Además, se dejaron cuatro celdas sin adicionar *Bti*, para utilizar la dieta como un control negativo en el ensayo. Transcurrido este lapso, se tomaron cuatro adultos previamente desinfectados y obtenidos de los granos almacenados en la cámara de estimulación masiva; y se dispuso a colocarlos en cada celda. Posteriormente, la placa se selló completamente con plástico autoadhesivo y éste se perforó tres veces en cada pocillo para favorecer el intercambio gaseoso.

Finalmente, la placas se colocaron en cajas plásticas y se recubrieron con papel toalla para imitar condiciones de total oscuridad y se colocaron en incubadora modelo LE 539RHD (Digisystem Laboratories, Taipei Hsien, Taiwan) bajo condiciones de 80% de humedad relativa y a 27 °C. La mortalidad de los adultos se evaluó transcurridos siete días, estimando el número de insectos muertos como aquellos que no presentaron movimiento alguno al ser estimulados con un pincel fino y/o al observar que éstos adquirieron una coloración oscura. Cada bioensayo se estableció por triplicado y el resultado se reportó como el promedio de las tres observaciones $\pm\text{SD}$. Los resultados se sometieron a un análisis Probit con el método de Finney & Stevens (1948), a partir de la mortalidad corregida:

$$\text{Mortalidad corregida (\%)} = \frac{M_{\text{obs}} - M_{\text{control negativo}}}{100 - M_{\text{control negativo}}} \times 100$$

Donde M_{obs} fue el número de insectos muertos en el pocillo en que se incorporaron las diferentes concentraciones del extracto de *Bti*, transcurridos los 7 días en que se realizó el bioensayo; y $M_{control\ negativo}$ se consideraron como el número de hembras adultas de *H. hampei* muertas que se cuantificaron en los pocillos que sólo había dieta artificial, sin adicionar cristales de toxinas *Bti*, transcurrido el periodo de evaluación.

4.11.2 Análisis del efecto sinérgico al mezclar el extracto de las δ -endotoxinas de *Bti* con los inhibidores de proteasas presentes en el extracto de soya

Luego de establecer la dosis letal media de la solución con cristales *Bti*, se desarrolló un bioensayo paralelo empleando las mismas placas de microtitulación para 24 muestras con dieta artificial, pero adicionando concentraciones incrementales del polvo de extracto de soya parcialmente purificado.

Para ello, se mezclaron 50 μ l de Tween-20 al 0.1% (v/v) con 450 μ l de agua destilada estéril, y se incorporó 1,135 μ g $\cdot\mu$ L⁻¹ de polvo de *Bti* junto con el polvo de *G. max* a las siguientes concentraciones: 0,2837 μ g $\cdot\mu$ L⁻¹; 0,5675 μ g $\cdot\mu$ L⁻¹; 1,135 μ g $\cdot\mu$ L⁻¹; 2,27 μ g $\cdot\mu$ L⁻¹ y 4,54 μ g $\cdot\mu$ L⁻¹. El resto del protocolo del bioensayo se desarrolló de la misma manera que en la sección 3.11.1 para añadir las muestras y los adultos en la dieta Cenibroca II. En este procedimiento también se estableció un control negativo sin añadir *Bti* ni extracto de soya. Las placas se incubaron y se evaluaron a los 7 días, como se mencionó anteriormente; y se realizaron por triplicado para reportar el resultado como el promedio de tres observaciones.

El bioensayo dosis-respuesta se analizó para determinar las diferencias significativas entre los promedios de las tres determinaciones, utilizando el paquete estadístico PASW Statistics 18 (SPSS Inc., Endicott, NY) (Ver explicación en la sección 3.12). Los porcentajes de mortalidad corregidos fueron calculados en relación con los controles, utilizando la fórmula Abbott. Luego, se determinó la concentración letal media (LD₅₀, dosis letal para matar el 50% de la muestra de adultos) con el mismo paquete estadístico, considerando los tratamientos significativamente diferentes si el 95% de los límites fiduciaros de la potencia relativa fueron menores a 1.

4.12 Tratamiento de los datos mediante análisis estadístico

Para comparar los promedios de las tres réplicas obtenidas en la comprobación de la actividad proteolítica resultante de las pruebas espectrofotométricas desarrolladas sobre el extracto de soya con base en con las variables pH y temperatura (sección 3.9.1), los datos se sometieron a una ANOVA para estimar si hubo indicios de que algunos de estos parámetros afectó significativamente (con una confianza de $\geq 95\%$) la actividad enzimática del extracto aislado; y luego se hizo la prueba de contrastes de Tukey para reconocer cuán diferentes fueron tales efectos ejercidos entre los diferentes niveles de temperaturas y pHs evaluados (Montgomery & Runger, 2010).

Ambas pruebas estadísticas también fueron aplicadas para comparar si el promedio de las tres determinaciones de dosis subletal (LD_{50}) alcanzada en el bioensayo con las toxinas de *Bti* sobre hembras adultas de *H. hampei* mostró un grado de mortalidad significativamente diferente ($\alpha = 0,05$) respecto a las concentraciones estudiadas con la LD_{50} de *Bti* en combinación con dosis incrementales del extracto de soya purificado (Sección 3.10.2). Todas las pruebas estadísticas fueron comprobadas a través del paquete estadístico PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

Para reconocer el grado de respuesta producido tanto por las diferentes dosis de cristales de *Bti* como por la mezcla de *Bti* y del extracto de soya sobre las hembras de broca expuestas en los bioensayos, a dichas concentraciones se les determinó el \log_{10} y junto con los valores de mortalidad corregidos se desarrolló una prueba de regresión de Probit (Kuehl, 2001). Mediante este método estadístico se pretendió identificar la concentración a la cual se produjo un 50% de mortalidad sobre los individuos analizados (LD_{50}). Dicha prueba dosis-respuesta también se llevó a cabo con el estadístico PASW Statistics 18.0 (SPSS Inc.).

CAPÍTULO 5

Resultados

5.1 Purificación parcial de los extractos de *H. hampei* y *G. max*

La precipitación con sulfato de amonio y la diálisis del extracto de soya incrementó la especificidad enzimática de los 5,959 g de polvo liofilizado recuperado, que pasó de una actividad específica de $0,250 \pm 0,001 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ a otra de $0,444 \pm 0,005 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, y resultó en un factor de purificación de 1,776. Por su parte, los extractos de broca pasaron de tener una actividad específica del extracto crudo de $0,328 \pm 0,002 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ a $0,699 \pm 0,003 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ en los 30 mg del liofilizado de intestino medio que se aislaron, cuyo factor de purificación fue de 2,13 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resumen de purificación del intestino medio de broca (*H. hampei*) y del extracto de soya (*G. max*)

Muestra	Volumen de muestra (mL)	Actividad total (U) ^a	Actividad específica (U/mL) ^b	Factor de purificación	Rendimiento por etapa (%) ^d
Extracto crudo de harina de frijol de soya (<i>G. max</i>)	1.800	1.170	$0,250 \pm 0,001$	1,000	100
Extracto de harina de soya precipitado con $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ al 60% (m/v) y dializado	1.620	720	$0,444 \pm 0,005$	1,776	62
Extracto crudo de intestino medio de <i>H. hampei</i>	150	130,3	$0,328 \pm 0,002$	1,00	100
Extracto de intestino medio precipitado con $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ al 70% (p/v) (v/v) y dializado	116	81,1	$0,699 \pm 0,003$	2,13	62

^a La actividad proteolítica se ensayó durante 10 min a 37 °C (pH 9.0), utilizando DL-BAPNA como sustrato. Las unidades enzimáticas se expresaron como μmoles de *p*-nitroanilina liberados por min. La actividad proteolítica de ambos extractos se evaluó bajo las condiciones de pH y temperatura óptimos para el extracto de harina de *G. max*. Se presentan los promedios y desviaciones estándar para los experimentos que se realizaron por triplicado.

^b Actividad específica = Actividad total / Volumen de muestra utilizado. Los valores de actividad específica corresponden al promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar (SD).

^c Factor de purificación = Actividad específica / Actividad específica del extracto crudo

^d Rendimiento por etapa = Actividad total / Actividad total del extracto crudo \times 100.

5.2 Cuantificación de esporas viables, separación y purificación de cristales *Bti*

Mediante el método de conteo en placa con medio LB se contabilizaron 81×10^6 UFC $\cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ y 90×10^7 UFC $\cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ esporas en el medio HCT esporulado con *Bti*, a partir de las alícuotas extraídas y cosechadas en la placa. Al separar la suspensión bacteriana de esporas y cristales en el embudo de separación (Figura 24a), se observó una elevada proporción de células vegetativas y esporas en la fase superior (Figura 24b), mientras que en el frotis de la fase inferior acuosa predominaron aquellas estructuras esféricas/amorfas de $\sim 0,5 \mu\text{m}$, que presumiblemente se identificaron como los cristales o δ -endotoxinas (Figura 24c).

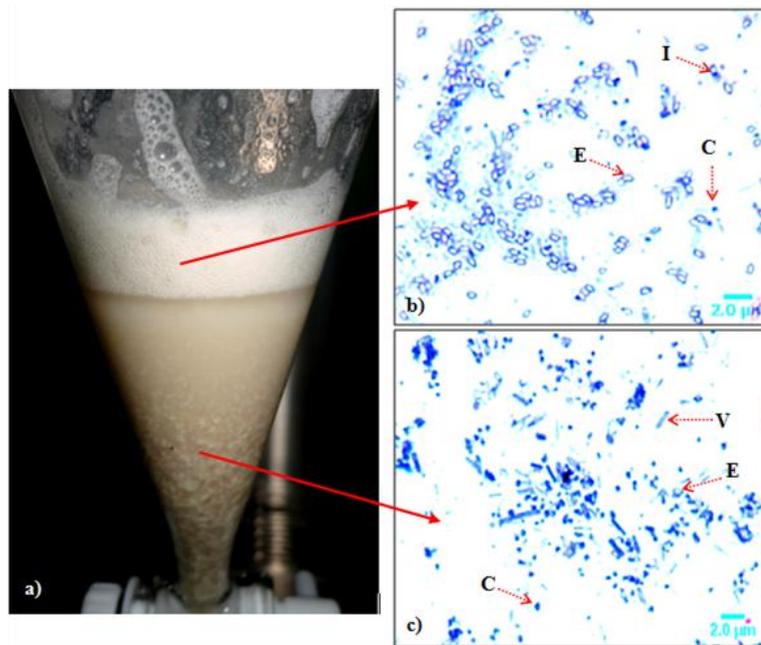


Figura 24. Esquema de separación de 4 L de extracto con el complejo espора-criстал de *Bti* mediante embudo de separación: a) embudo de separación con fase espumosa y fase acuosa del extracto crudo de *Bti*, b) vista microscópica de frotis realizado a la fase con espuma, c) vista microscópica de frotis hecho a la fase acuosa. Las flechas rojas indican algunas estructuras morfológicas que se lograron distinguir. C: cristal, E: espора, I: inclusión cristalina adherida en una espора, V: célula vegetativa.

La etapa de purificación en gradiente de densidad de sacarosa se aplicó a la fase acuosa que se recuperó del embudo de separación y que contenía la mayor proporción de cristales. El líquido se centrifugó y el botón resultante se colocó encima del gradiente y se centrifugó nuevamente en rotor de columpio sin freno. De cada capa del gradiente, se tomó una alícuota y se visualizaron las estructuras de *Bti* en microscopio óptico de luz (Figura 25).

En la fase de sacarosa saturada al 67% (m/v) se apreció una baja proporción de cristales y restos celulares (Figura 25a), en la capa con saturada con 72% (m/v) de sacarosa se apreció la mayor proporción de cristales en el medio (Figura 25b), y en las últimas dos fases saturadas a 79 y 84% (m/v), se visualizó el mayor número de esporas y muy pocos cristales, los cuales se observaron adheridos a esas esporas (Figuras 25c y 25d). La fase que se liofilizó fue la que se saturó al 72% de sacarosa, y de ella se recuperaron 1,717 g de extracto de *Bti*.

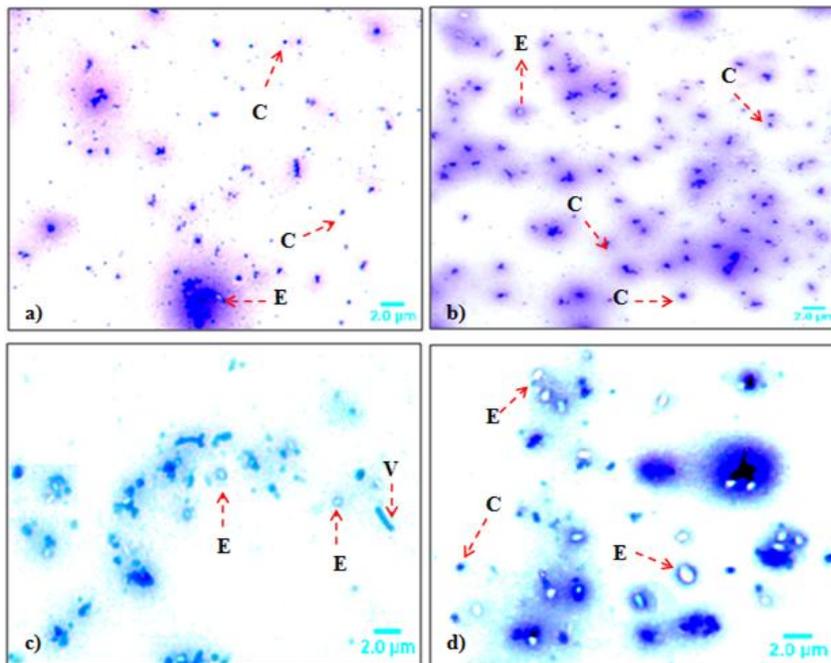


Figura 25. Vista microscópica del frotis realizado al aislado de *B. thuringiensis* subs. *israelensis*, mostrando las diferentes estructuras morfológicas observadas en las diversas capas del gradiente de sacarosa. A: capa con 67% de sacarosa, B: capa con 72% de sacarosa, C: capa con 79% de sacarosa, D: capa con 84% de sacarosa. C: cristal, E: espora, V: célula vegetativa.

5.3 Identificación y caracterización funcional de los extractos de soja y broca

5.3.1 Estimación del tamaño aparente de las tripsín-proteinasas purificadas a partir de intestinos de adultos de *H. hampei*

Los pesos moleculares de las tripsín-proteinasas solubles en el extracto de adultos de *H. hampei* y de los inhibidores de proteasas (IPs) del extracto de harina de soja purificados parcialmente se estimaron en 24,1 kDa y 20,6 kDa, respectivamente. Estos resultados son comparables con los de los controles positivos de tripsina de páncreas porcino (23,8 kDa) y del inhibidor Kunitz de tripsina de soja (20,1 kDa). Las tripsín-proteinasas se encontraron en cantidades traza; mientras que el patrón de bandas observado para el extracto de soja exhibió dos bandas adicionales que se estimaron en 92,3 kDa y 36,6 kDa (Figura 28).



Figura 26. SDS-PAGE al 12,5% (m/v) de las fracciones de extractos de intestino medio de *H. hampei* y de *G. max*. El gel se tiñó con solución de azul de Coomassie al 2,5% (metanol al 45% y ácido acético al 9,2%), se decoloró con solución de metanol-etanol-ácido acético (2:1:0,5) y se observó con luz blanca. M: marcador de peso molecular (kDa), K: control de inhibidores Kunitz de tripsín-proteasas de *G. max*, S: fracción de extracto de soja (*G. max*) obtenida por precipitación con sulfato de amonio al 0-60% (m/v) y diálisis, C: control de tripsina porcina, T: fracción de extracto de intestino medio de la broca (*H. hampei*) obtenida por precipitación con sulfato de amonio al 0-70% (m/v) y diálisis.

5.3.2 Zimografía en una dimensión de las proteasas activas de *H. hampei*

El gel electroforético en condiciones no desnaturizantes desarrollado sobre las muestras del extracto de adultos de *H. hampei*, permitió descubrir que había una única banda de actividad enzimática, tanto en las muestras como en el control de tripsina porcina, que se caracterizó como una zona clara dentro del gel teñido con solución de azul de Coomasie al 2,5% (m/v) y cuyo peso molecular se estimó en 24 kDa (Figura 29, carriles C y T). Al mezclar la muestra del extracto de la broca con el extracto de soya en proporción 1:1, la banda observada inicialmente desapareció por completo (Figura 29, carril IP).

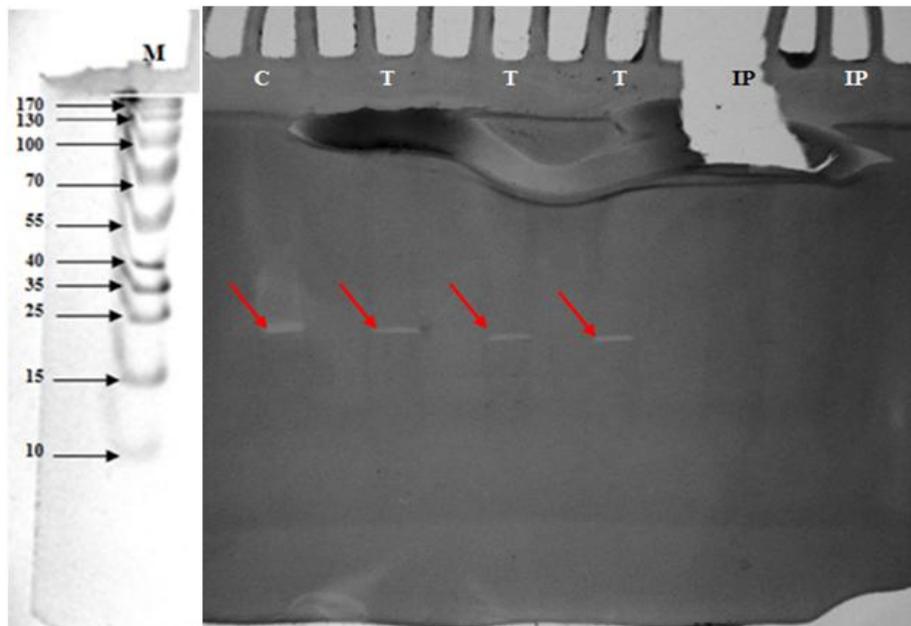


Figura 27. Zimograma con gelatina al 0,1% (m/v), comparando la actividad proteolítica del polvo intestinal de *H. hampei* con la actividad observada en el control positivo de tripsina porcina; y efecto del extracto de soya sobre la actividad proteolítica del extracto de intestino medio. Las bandas de actividad proteolítica se indican con flechas de color rojo. C: control de tripsina porcina, T: muestras de intestino medio de *H. hampei*, IP: mezcla 1:1 de muestras intestinales y extracto de soya purificado.

5.3.3 Cuantificación de la actividad proteolítica del extracto de broca y estimación del grado de inhibición producido por el extracto de *G. max*

Las bandas claras dentro del gel co-polimerizado con gelatina al 0,1% (m/v) aplicado sobre muestras diluidas de tripsina de páncreas porcino exhibieron un perfil de

actividad en el que conforme se diluyó 1 mg de la tripsina, las zonas claras donde se visualizó gelatina digerida en el gel fueron disminuyendo gradualmente conforme las muestras se diluyeron y la zona de actividad se fue estrechando hasta un factor de 10^{-5} (Figura 30). A partir de la imagen de este zimograma, se trazó la curva de actividad triptica área (mm^2) vs \log_{10} de la tripsina porcina (ng) y se calculó la proteína activa a través de la fórmula de la pendiente.

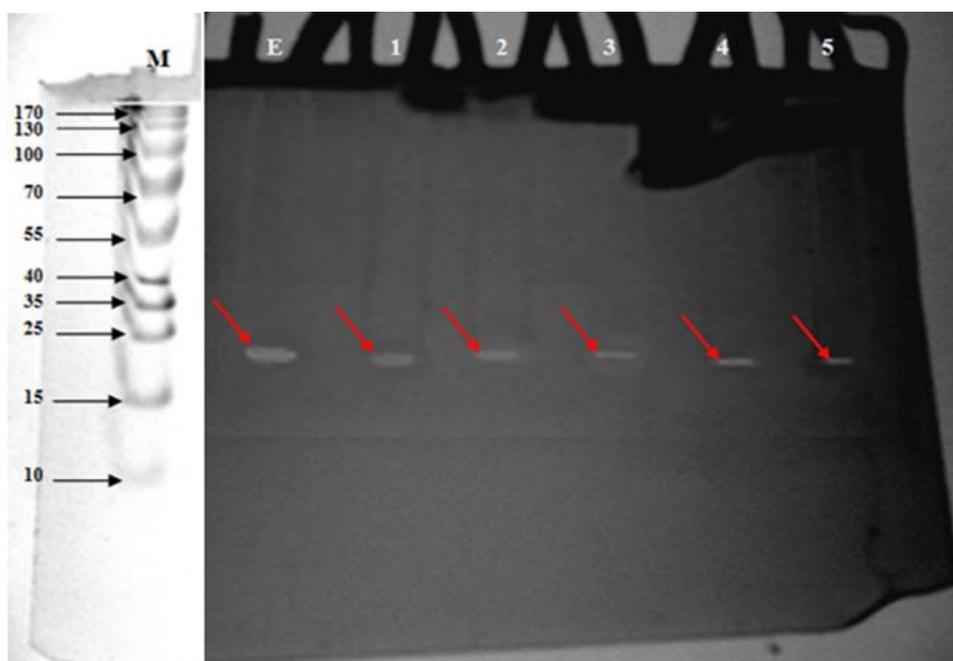


Figura 28. Zimograma co-polimerizado con gelatina al 0,1% (m/v), utilizando diluciones decimales de tripsina porcina y partiendo de 1 mg de la muestra. M: marcador de peso molecular, E: extracto de tripsina porcina sin diluir a 1 mg/100 μL de buffer de carga, 1: muestra de tripsina porcina diluida 1:10, 2: muestra de tripsina porcina diluida 1:100, 3: muestra de tripsina porcina diluida 1:1.000, 4: muestra de tripsina porcina diluida 1:10.000, 5: muestra de tripsina porcina diluida 1:100.000.

La cantidad de proteína activa promedio calculada a partir de 1 mg de extracto, partiendo del zimograma desarrollado para la cuantificación de las tripsín-proteinasas presentes en el intestino medio de *H. hampei* (Figura 29), se estimó en un promedio de $(0,218 \pm 0,457)$ μg . De los 30 mg de extracto intestinal recuperados y parcialmente purificados, se estableció que la actividad triptica neta dentro del gel correspondió a $(6,54 \pm 0,46)$ μg de proteína bio-activa, y el porcentaje de actividad proteolítica total

obtenida fue de 6,5% en los 30 mg que se aislaron y purificaron mediante precipitación y diálisis (Figura 31).

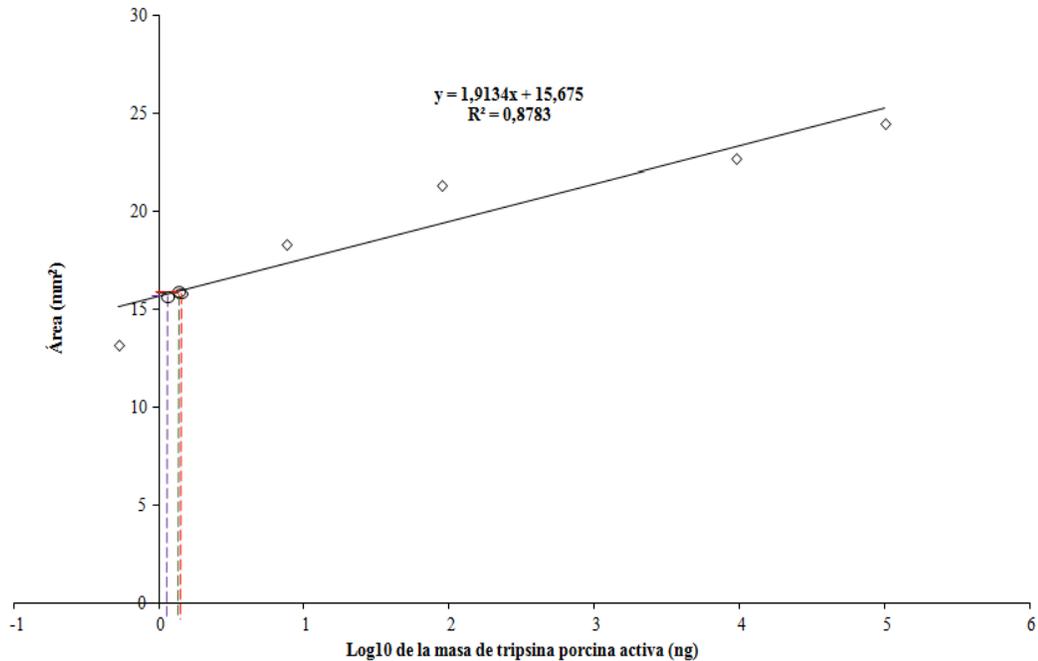


Figura 29. Curva de actividad trípica obtenida para la cuantificación de la proteína bio-activa en el extracto de intestino de *H. hampei*, al comparar el área estimada respecto al logaritmo en base 10 de la masa de la muestra utilizada de extracto. Las líneas punteadas corresponden al área de actividad proteolítica obtenida de las tres réplicas del intestino medio de *H. hampei*, observadas en el zimograma de gelatina al 0,1% (m/v).

5.4 Evaluación del efecto de los parámetros de pH y temperatura sobre la actividad proteolítica del extracto de soya parcialmente purificado

Las proteasas solubles presentes en el extracto de soya exhibieron una actividad proteolítica más elevada a un ámbito de pH alcalino (de 9.0 a 11.0) y mostraron un perfil de actividad enzimática bajo y constante a pH ácido y neutral primordialmente (de 2.0 a 8.5). Adicionalmente, se estimó que el pico de actividad máxima se obtuvo a un pH alcalino de 9.0 ($0,256 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$); el cual comenzó a disminuir y sólo se observó otro pico de actividad secundario a pH 11.0 ($0,129 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 26).

La mayor parte de los resultados fueron significativamente diferentes (Tukey, $p < 0,05$), aunque se encontraron dos subgrupos de respuestas: aquellas de muestras con valores de pH entre 2.0 a 8.5 y otro con valores de pH que oscilaron entre 9.5 y 11.5.

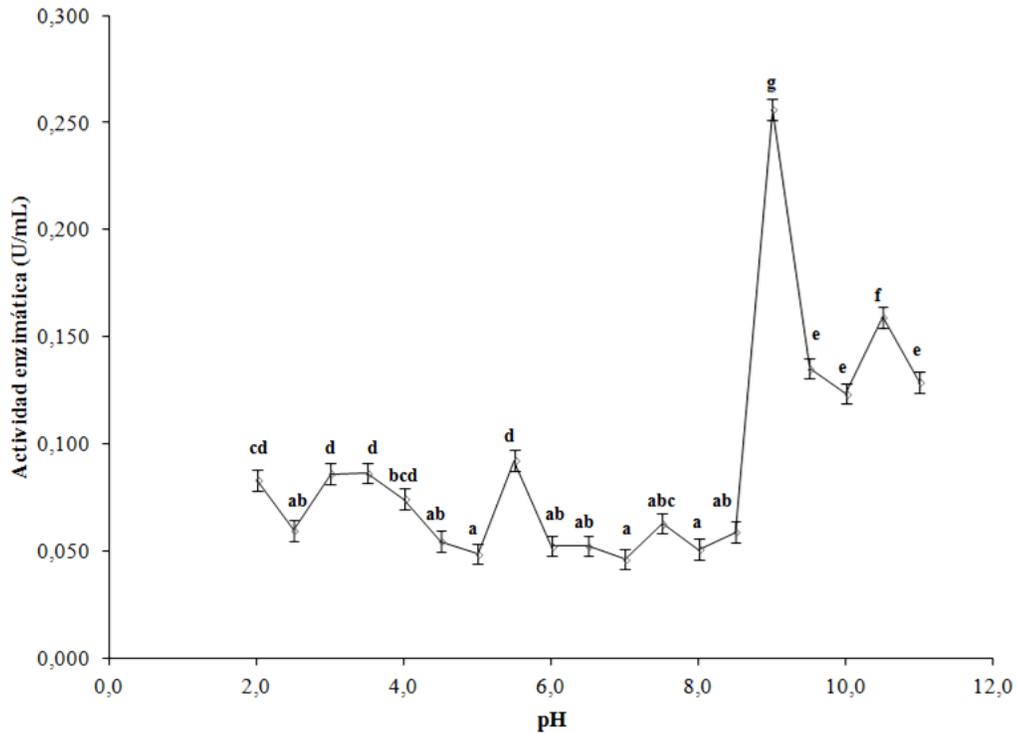


Figura 30. Efecto del pH sobre el extracto parcialmente purificado de *G. max*. La mezcla de reacción se incubó bajo diferentes soluciones buffer por 10 min a 37 °C, y la actividad proteolítica se estimó con sustrato cromogénico BApNA. Cada punto representa el promedio de tres réplicas ($n = 3$) \pm la desviación estándar (SD). Las diferentes letras indican que la actividad enzimática a diferente pH fue significativamente diferente (Tukey, $P = 0.001$).

Por su parte, la mayor actividad proteolítica se registró a 40 °C ($0,068 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, Figura 27). A temperaturas superiores a 70 °C se obtuvo una actividad más elevada a la observada a 40 °C; no obstante, es probable que dicho incremento se haya debido a que el sustrato BApNA se hidrolizó químicamente, por lo que estos valores se desestimaron al definir la actividad óptima en el extracto. La temperatura no influyó de manera significativa sobre la actividad proteolítica para valores de temperatura interpretables por debajo de los 60°C ($P < 0,05$).

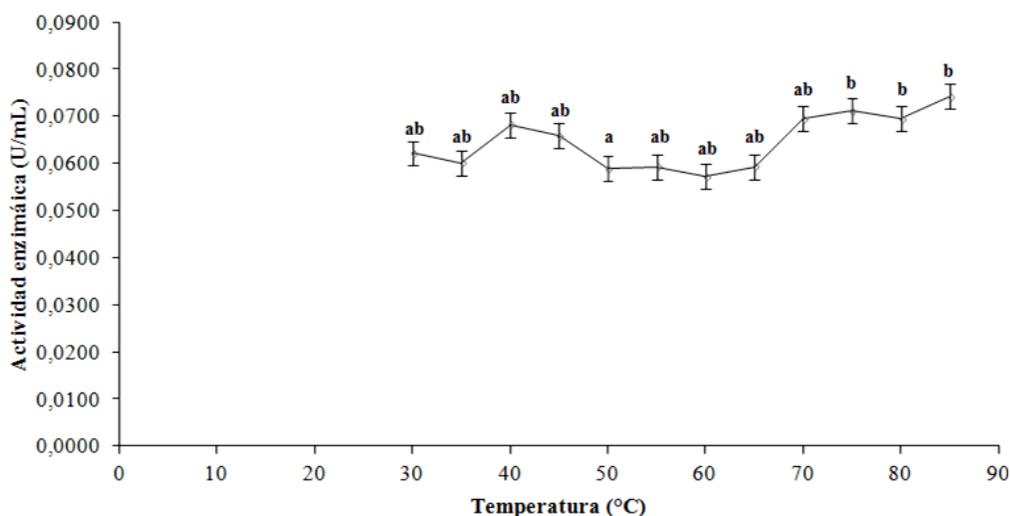


Figura 31. Efecto de la temperatura sobre la actividad proteolítica en la fracción purificada de extracto de soya, utilizando reactivo cromogénico BApNA. Cada punto se expresó como el promedio de tres réplicas. Los valores se expresaron como el promedio de tres réplicas \pm SD. Las diferentes letras indican que la actividad proteolítica fue significativamente diferente según los resultados arrojados por la prueba Tukey ($P < 0.036$).

5.5 Actividad proteolítica/inhibitoria de los inhibidores de serín-proteasas presentes en *G. max* y de las proteinasas de *H. hampei*

Como se esperaba, el extracto de *H. hampei* y de tripsina porcina (ambos a $0,500 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) mostraron mayor actividad proteolítica sobre el sustrato BapNA que los extractos de soya y el inhibidor Kunitz de tripsina de soya (SKTI) (ambos a $2,857 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 32). La tripsina porcina exhibió una actividad proteolítica que correspondió a $(1,218 \pm 0,003) \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, y fue casi dos veces más alta a la reportada con el extracto de *H. hampei*, que fue de $(0,699 \pm 0,003) \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$. Por otra parte, fue interesante notar que tanto el SKTI ($0,361 \pm 0,003 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) como el extracto de soya ($0,444 \pm 0,005 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) mostraron actividad proteolítica hacia un sustrato que es específico para reconocer actividad trípica; aunque dicha actividad fue superior en el extracto de soya que en el control SKTI.

Con el fin de averiguar el grado de inhibición de dos inhibidores comerciales, se evaluó la actividad proteolítica resultante después de mezclar tripsina porcina comercial con el inhibidor de serín-proteasas sintético fluoruro de fenilmetilsulfonilo

(PMSF), y con el inhibidor proteico Kunitz de tripsina de soya (SKTI). Los resultados obtenidos después de incubar la tripsina ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) con cada inhibidor (PMSF a $0,16 \text{ mM}$ y SKTI al $0,12 \text{ mM}$); permitieron determinar que la actividad inhibitoria del PMSF fue de $19,3\%$ ($0,028 \pm 0,002 \text{ IU}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), mientras que la obtenida con el SKTI produjo una inhibición de $82,8\%$ ($0,065 \pm 0,001 \text{ IU}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). En otras palabras, el SKTI a una menor concentración fue cuatro veces más efectivo en inhibir la tripsina porcina comercial que el PMSF.

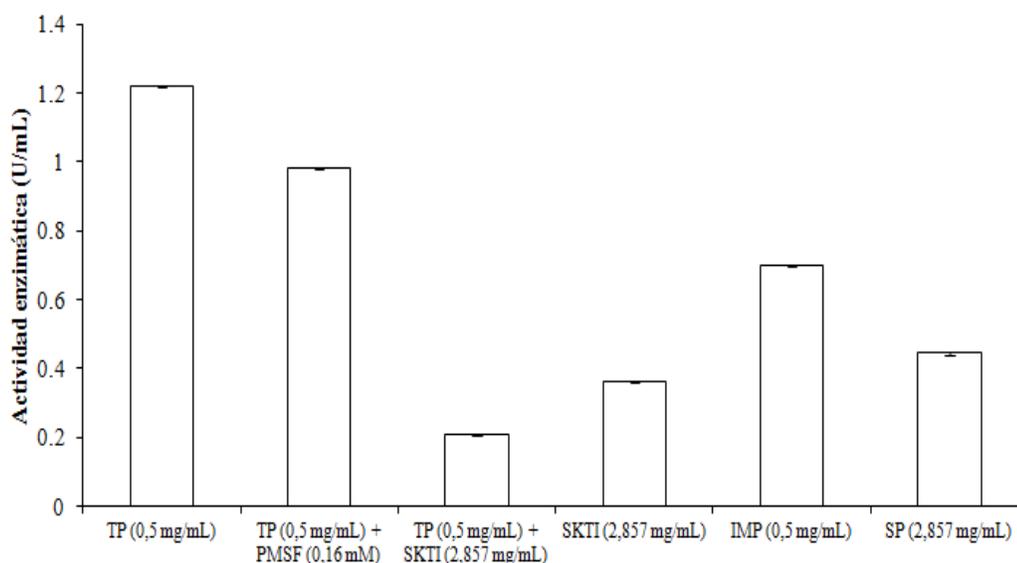


Figura 32. Actividades proteolíticas individuales obtenidas por los diferentes extractos y controles utilizados para comparar con cada extracto; y actividad inhibitoria obtenida con una mezcla de PMSF ó SKTI y tripsina porcina (1:1). El número de réplicas ensayado ($n=3$) se incubó junto con el sustrato DL-BApNA a $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, por 10 min a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ (pH 9.0). Las barras denotan el promedio de señales de actividad proteolítica producidas por las enzimas de los extractos o controles sobre el sustrato a 405 nm. TP: tripsina porcina, PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo, SKTI: inhibidor Kunitz de tripsín-proteasas de soya, IMP: extracto de intestino medio purificado, SP: extracto de soya purificado.

La mezcla del extracto de soya ($2,857 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) junto con el extracto de intestino medio de broca ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) reveló que la soya, en vez de ejercer un efecto inhibitorio sobre las proteasas solubles del intestino medio; favoreció una sinergia ($0,832 \pm 0,002 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) entre la actividad proteolítica ejercida por las enzimas de la soya ($0,444 \pm 0,005 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) como de broca ($0,699 \pm 0,003 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 33).

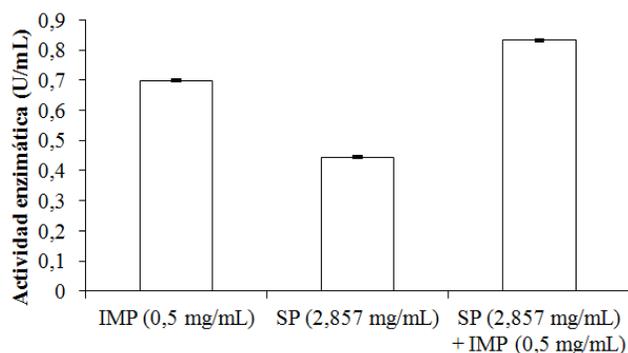


Figura 33. Actividad proteolítica individual de los extractos purificados de intestino medio de *H. hampei* y de *G. max*, y efecto de mezclar ambos extractos sobre la actividad proteolítica neta en sustrato cromogénico DL-BApNA. Las barras representan el promedio de actividad de tres réplicas de los extractos \pm SD. IMP: extracto de intestino medio purificado, SP: extracto de soja purificado.

Al mezclar diluciones seriadas del extracto de soja a $2,857 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ con una concentración fija de extracto de intestino medio de *H. hampei* ($0,05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), la actividad proteolítica disminuyó de forma proporcional conforme se diluyó la solución del extracto de soja (Figura 34). La máxima actividad proteolítica que se obtuvo a la concentración más alta de extracto de harina de soja ($2,857 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), correspondió a $(0,07500 \pm 0,00055) \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que la mínima ($5,08 \times 10^{-9} \pm 2,81 \times 10^{-11}$) se observó para $0,000257 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de soja (concentración más baja).

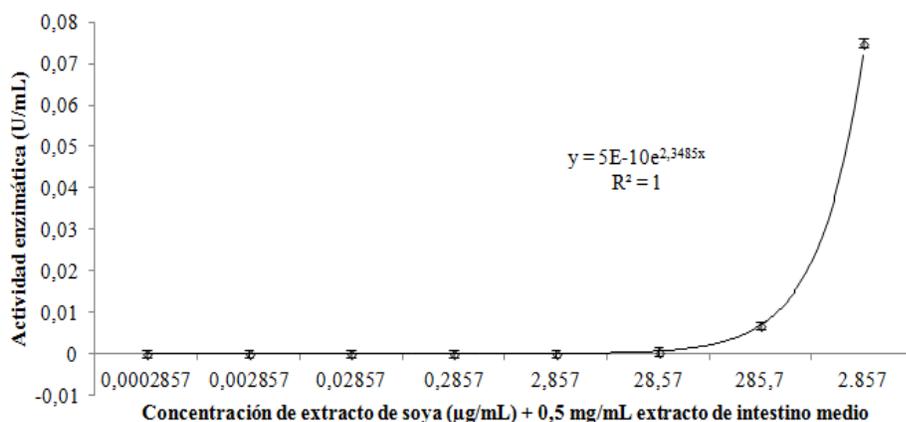


Figura 34. Efecto obtenido después de mezclar diluciones decimales seriadas del extracto de soja ($2,857 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) junto con el extracto de intestino medio de adultos de broca ($0,5 \text{ mg/mL}$), cuya mezcla de reacción se incubó por un periodo de 10 min a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ sobre el sustrato DL-BApNA (2 mg/mL) a pH 9.0. Los resultados se reportaron como el promedio de tres determinaciones \pm SD.

Al analizar paralelamente la actividad proteolítica de mezclas de las diluciones del extracto de soya observadas en la Figura 35 con tripsina de páncreas porcino a una concentración de $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, se obtuvieron resultados similares (Figura 34). Es decir, la actividad proteolítica se incrementó conforme se diluyó la concentración del supuesto extracto rico en inhibidores de proteasa derivado de soya. En este ensayo espectrofotométrico, la actividad máxima también se obtuvo a $2,857 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y fue de $(0,2094 \pm 0,0075) \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ y la actividad mínima, que se alcanzó a $0,0002857 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y resultó en $(8,82 \times 10^{-9} \pm 3,40 \times 10^{-11}) \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

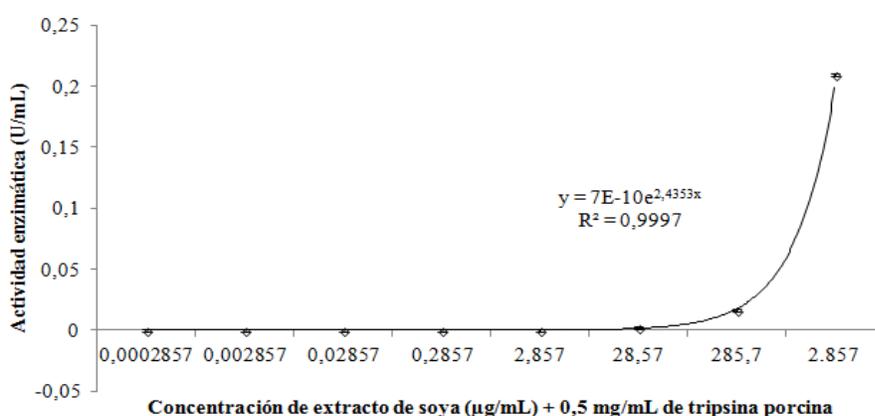


Figura 35. Efecto de mezclar diluciones decimales seriadas del extracto de soya ($2,857 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) sobre tripsina de páncreas porcino comercial ($0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), cuya reacción se desarrolló por un periodo de 10 min a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ sobre el sustrato DL-BApNA (2 mg/mL) y buffer glicina-NaOH (pH 9.0). Los resultados se reportaron como el promedio de tres réplicas ($n = 3$) \pm SD.

5.6 Efecto combinatorio de las toxinas purificadas de *Bti* y del extracto de *G. max* sobre el comportamiento del extracto intestinal de *H. hampei*

Al separar la preparación de cristales purificados de *Bti* en un SDS-PAGE (Figura 36) se observaron dos bandas con tamaños aparentes de 52 y 24 kDa (muestra Cry). Esta muestra se sometió a degradación por parte de la tripsina porcina (muestra CT) y por el extracto de soya (muestra CS). La degradación causada por el extracto de soya se confirmó al mezclar diluciones decimales seriadas del extracto de soya con el extracto de *Bti* y con la tripsina porcina en proporción 1:1:1 (CTS, CTS5 y CTS10). En todos los casos, las bandas de *Bti*, aunque no se apreciaron con claridad, se

observaron ligeramente más degradadas que las muestras que sólo fueron digeridas únicamente por la tripsina porcina.

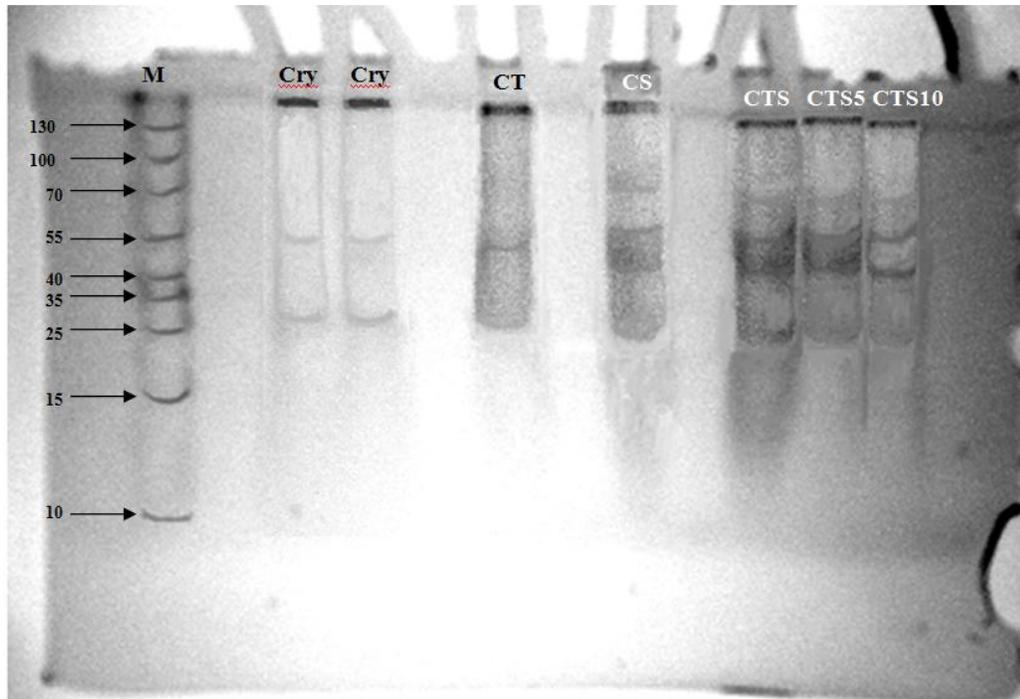


Figura 36. Gel electroforético SDS-PAGE para determinar el efecto de tripsina porcina y del extracto de soja sobre los cristales purificados de *Bti*, luego poner las muestras en contacto por 30 min a 37 °C. Las proteínas se fraccionaron con un gel de separación al 12% (m/v), se tiñeron con solución de azul de Coomassie al 2,5% (m/v) con metanol al 45% y ácido acético al 9,2% y se destiñó con solución decolorante de etanol-metanol-ácido acético (10%-20%-5%). M: marcador de peso molecular, Cry: muestras de cristales de *Bti* purificados, CT: mezcla 1:1 cristales *Bti* + tripsina porcina, CS: mezcla 1:1 cristales *Bti* + extracto de soja purificado, CTS: mezcla 1:1:1 de cristales *Bti* + tripsina porcina + extracto de soja, CTS5: mezcla 1:1:1 cristales *Bti* + tripsina porcina + dilución 1:100.000 extracto de soja, CTS10: mezcla 1:1:1 cristales *Bti* + tripsina porcina + dilución 1:10.000.000.000 extracto de soja. Los volúmenes finales se mantuvieron fijos para evitar efectos de dilución.

5.7 Toxicidad del extracto de soja y *Bti* frente a adultos de *H. hampei*

Tanto los bioensayos realizados con el extracto de *Bti* puro como con una mezcla de *Bti* y extracto de soja, se ajustaron al modelo de regresión de Probit, debido a que los valores de Chi-Cuadrado (X^2) resultantes fueron mayores a los valores de probabilidad obtenidos (P), y estos valores de probabilidad indican que las varianzas

entre los tratamientos mostraron diferencias significativas ($P < 0,05$) entre todas las concentraciones evaluadas de los cristales de *Bti* y del extracto de *G. max* (Cuadro 6).

Cuadro 4. Toxicidad de cristales purificados de *Bti* y de los cristales purificados de *Bti* mezclados con el extracto purificado de harina de *G. max* sobre adultos de *H. hampei* (Ferrari)

Muestra	n^a	χ^2	g.l.	LC ₅₀ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) ^a	P (LC 95%)
Extracto de <i>Bti</i>	192	7,8	1	1,135 (0,450 – 2,657)	0,005
Extractos de <i>Bti</i> + <i>G. max</i>	240	7,9	2	0,315 (0,166 – 0,7815)	0,019

Resultados: n : número de individuos evaluados en el bioensayo, g.l.: grados de libertad, LC₅₀: concentración letal media.

La sobrevivencia de la broca disminuyó significativamente ($P = 0,006$) conforme se aumentó la dosis de los cristales. Las mortalidades corregidas estimadas en el bioensayo con cristales de *Bti* se estimaron en 14% ($0,233 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 59% ($0,389 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 59% ($0,648 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y 64% ($1,080 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), por lo que la concentración que causó el 50% de mortalidad (LD₅₀) correspondió a $1,135 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (Figura 37).

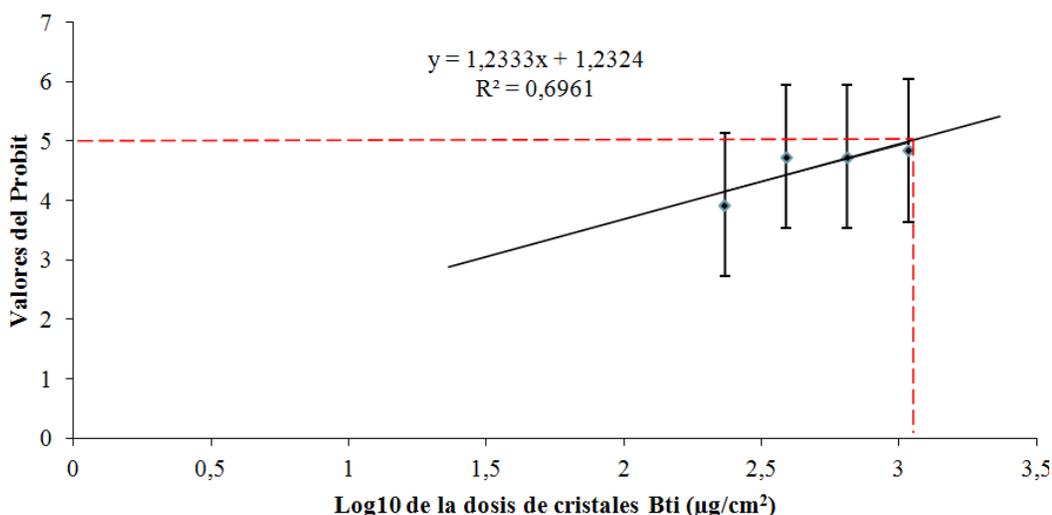


Figura 37. Mortalidad obtenida mediante el análisis de regresión de Probit para la determinación de la dosis letal media sobre hembras adultas de *H. hampei*, incorporando concentraciones incrementales de *Bti* en la dieta Cenibroca II. Cada punto corresponde al promedio de las réplicas desarrolladas ($n = 3$) de valores Probit, derivados de la mortalidad corregida y calculados con la fórmula Abbott \pm SD.

Los resultados del segundo bioensayo, aplicando la concentración subletal obtenida después de evaluar el efecto tóxico del polvo liofilizado con los cristales de *Bti* ($1,135 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) adicionando dosis crecientes del extracto parcialmente purificado de harina de soya fueron significativamente diferentes entre los tratamientos ($P = 0,003$) y produjeron un efecto superior al que se obtuvo en el bioensayo evaluado al incorporar únicamente los cristales purificados de *Bti*, ya que la concentración letal media fue de $0,315 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (Figura 38). La mezcla de extracto de soya a $0,284 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ y extracto de *Bti* a $1,135 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ causó un 50% de mortalidad sobre las hembras adultas de broca, por lo que esta concentración no potenció el efecto sinérgico con *Bti*. Por el contrario, el resto de concentraciones evaluadas sí mostraron efecto sinérgico, ya que se alcanzaron mortalidades de 54% ($0,568 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 59% ($1,135 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$), 66% ($2,270 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y 73% ($4,540 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$). El resultado del análisis de regresión de Probit sugiere, por tanto, que por cada 0,1% en la concentración de extracto de soya aplicado a *H. hampei*, la mortalidad se incrementó en 20%.

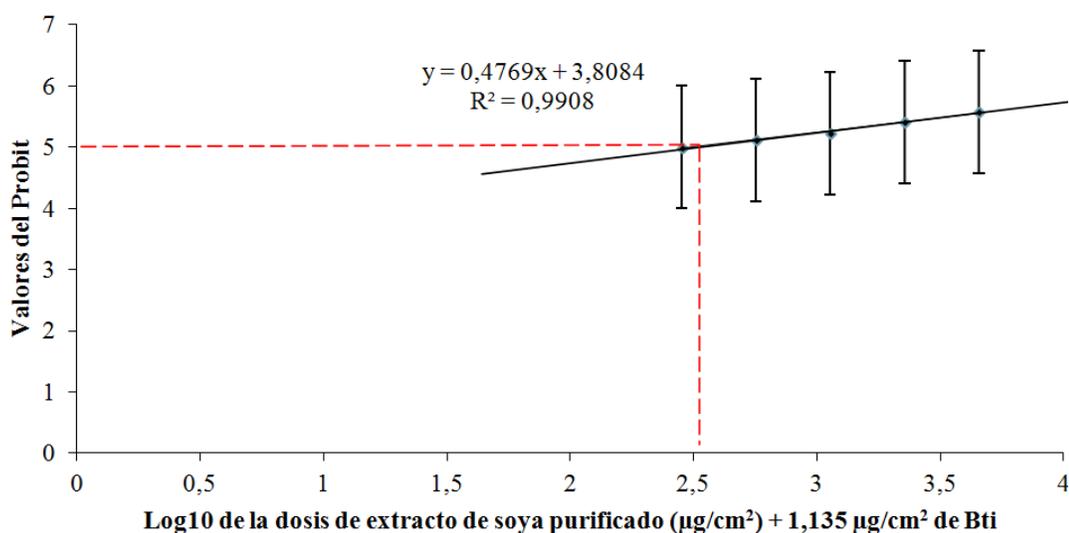


Figura 38. Mortalidad obtenida del análisis de regresión de Probit para definir la dosis letal media sobre hembras adultas de broca, incorporando una dosis fija de cristales de *Bti* y concentraciones crecientes del extracto de soya en dieta Cenibroca II. Cada punto en el gráfico representa el promedio de tres réplicas de los valores de Probit obtenidos a partir de la mortalidad corregida, calculada a partir de la fórmula Abbott \pm SD.

La exposición de hembras adultas de *H. hampei* a una concentración fija del extracto de cristales de *Bti* ($1,135 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) a concentraciones incrementales del extracto de soya causó mortalidades significativamente diferentes ($P > 0,05$) entre los tratamientos evaluados, con respecto a la mortalidad sub-letal que se alcanzó con *Bti* (Figura 39). Los tres tratamientos evaluados fueron estadísticamente diferentes con un grado de confianza del 95% (ANOVA de una vía). Sin embargo, los resultados arrojados por la prueba estadística *Post-Hoc* de Tukey, comprueban que la concentración $0 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ (que sólo contenía los cristales de *Bti*) y la concentración de $0,284 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ no fueron difirieron entre sí; mientras que el resto de concentraciones manifestaron ligeras variaciones, ya que los subconjuntos mostraron que había cierta asociación entre el resto de concentraciones; con excepción de la concentración más elevada ($4,54 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) que sí fue significativamente diferente respecto a las otras concentraciones y tratamientos que se evaluaron.

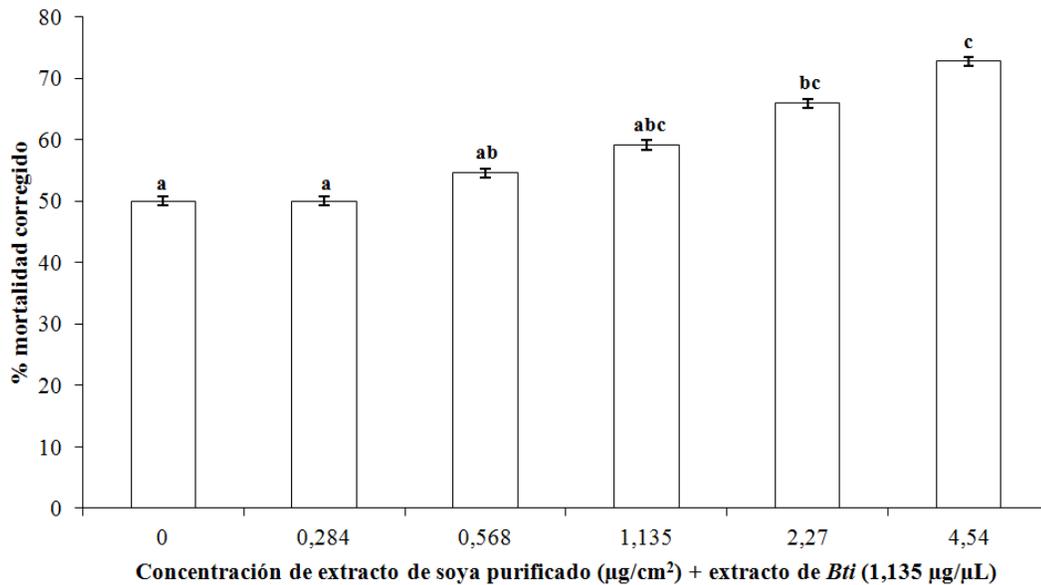


Figura 39. Evaluación de los porcentajes de mortalidad de adultos de *H. hampei*, luego exponer los insectos por 7 días en dieta artificial Cenibroca II, suplementada con el extracto de cristales de *Bti* a $1,135 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, junto con dosis crecientes del extracto de soya. Los valores de mortalidad resultantes son el promedio de tres réplicas ($n = 3$) que se calcularon a partir de la fórmula Abbott. Las letras iguales encima de la barra indican que las varianzas entre los tratamiento no fueron significativamente diferentes una de la otra, con base en los resultados de la prueba de Tukey ($P = 0,05$).

CAPÍTULO 6

Discusión

Las endopeptidasas del intestino medio son las principales enzimas que poseen las plagas, y son responsables de proporcionar continuamente aminoácidos esenciales y energía de las fuentes de alimento de plantas hospederas para su desarrollo (Macedo & Machado, 2011). En el orden Coleoptera, es frecuente hallar un gradiente de pH a lo largo del intestino, donde las proteinasas se encuentran compartimentalizadas; y según el ambiente bioquímico del lumen, se favorece a que predomine uno o dos grupos de proteasas sobre las demás (Castro-Guillén *et al*, 2012). *H. hampei* no es una excepción, ya que un importante número de serín-proteasas participa en la digestión inicial del alimento (Lončar *et al*, 2009; Sharifi *et al*, 2012).

Ya que en el entorno interno y externo en el que se desarrolla la broca del café ocurre una serie de reacciones bioquímicas complejas en las que participan las enzimas hidrolíticas, es de suma importancia explorar los mecanismos de proteólisis de las proteasas ambientales y digestivas como uno de los aspectos clave en la formulación de un bioinsecticida que contenga *Bt*, ya que la actividad proteolítica podría generar una disminución sustancial sobre la actividad tóxica de los cristales. Luego de conocer las propiedades de las proteasas, se debe analizar si los inhibidores de proteasas (IPs) del extracto vegetal de interés cuentan con un grado de actividad inhibitoria lo suficientemente efectivo para reducir de forma significativa la proteólisis producida por las proteasas endógenas y exógenas con las que se asocia la broca, para establecer si la soya se podría seleccionar para complementar y potenciar la actividad insecticida de las proteínas de *Bt* (Fabrick *et al*, 2002).

El protocolo de purificación que se desarrolló para el extracto de soya derivó en un factor de purificación de 1.8 y un rendimiento del 62% (Cuadro 3). El primer valor es comparable con el factor de 1,8 que obtuvo Bijina (2006) al aislar los IPs Kunitz de hojas de moringa (*Moringa oleifera*, Moringaceae) (29 kDa), mediante precipitación con solución de sulfato de amonio bajo saturación de 30-90% (m/v). Este factor

también es parecido al que reportaron Pereira *et al* (2007), quienes precipitaron un extracto de semillas de cubases (*Phaseolus coccineus*, Fabaceae) con soluciones de sulfato de amonio saturadas a 0-60% (m/v) para obtener los IPs Bowman-Birk (9,5 kDa), y obtuvieron un factor de 1,5; aunque con un rendimiento superior que fue de ~84%. Sin embargo, a nivel de rentabilidad, el factor obtenido no parece ser muy atractivo porque si se compara con los métodos de separación y purificación en columna de Sepharosa desarrollados por Gomes *et al* (2005) para purificar los SKTI de *Crotalaria pallida* (Fabaceae), aunque la cobertura de recuperación fue muy baja (0,5%), el factor obtenido fue de 180,4. Asimismo, Aguirre *et al* (2004) al purificar los IPs de semillas de chan (*Hyptis suaveolens*, Lamiaceae) mediante cromatografía líquida de alta presión (HPCL), alcanzaron un factor de 57,4 con una recuperación de 10%. Por ende; si bien se recuperó bastante producto, considerando el bajo grado purificación reportado para *G. max*, el extracto obtenido no sería tan atractivo en el mercado y sería conveniente purificarlo aún más antes de pretender comercializarlo.

Como señalan Carreras *et al* (2008) y Lenin *et al* (2007), los cristales de *Bt* suelen ser solubles en medio acuoso y en solventes inorgánicos a pH ácido a neutral (4.0 a 7.0). El medio de cultivo HCT que se utilizó para cosechar las proteínas Cry fue productivo porque se contabilizaron entre 81×10^6 esporas $\cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ y 90×10^7 esporas $\cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$, que son valores correlacionados con la producción de las toxinas de *Bti* (Tilquin *et al*, 2008). Los resultados reportados en esta investigación son incluso más altos a los conseguidos por Foda *et al* (2010), quienes aislaron *Bti* en medio HCT y contabilizaron entre $(10,22 \pm 1,37) \times 10^6$ esporas $\cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ y $(66,83 \pm 15,80) \times 10^6$ esporas $\cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ de la alícuota cosechada en medio LB. Lamentablemente, el conteo de esporas viables sólo se contabilizó en las etapas previas a la separación y la purificación, por lo que las figuras 24 y 25 sólo dieron un indicio de cuán bien se llevaron a cabo los procedimientos para aislar sólo las toxinas.

Los resultados conseguidos en esta investigación al separar el complejo espора- cristal son argumentados por Goodman *et al* (1967), quienes reportaron que al emplear el sistema bifásico agua-espuma con embudo separador para disociar la suspensión de

esporas y cristales de 1 L de medio, lograron que de 250 mg de *pellet* recuperado, la mayor parte de esporas y restos celulares se ubicaron en la fase con espuma y la fase inferior acuosa obtuvieron un *pellet* con 99,94% de cristales y 0,06% de esporas. Investigaciones preliminares realizadas por Delafield *et al* (1986), mencionan que al realizar la separación de esporas y cristales de *Bti* (cosechadas en 1 L de medio de cultivo con agar, CaCl₂, MnCl₂·4H₂O, ZnSO₄·7H₂O y CuSO₄·5H₂O) en dos fases; una con agua y otra con polietilenglicol, la proporción de cristales y esporas en la fase inferior fueron $2,93 \times 10^{12}$ UFC·mL⁻¹ y $0,01 \times 10^{12}$ UFC·mL⁻¹, respectivamente. Por ello, se espera que mediante el método, se alcanzara una separación apropiada.

Mediante el gradiente de sacarosa las esporas se recuperaron en la fase con 79% (m/v) de sacarosa, que se asemeja a los estudios hechos por Weiner (1978), quien demostró que la purificación de *Bacillus popilliae* en gradiente de sacarosa fue útil para separar los restos celulares y las esporas en la fase más saturada (70% (m/v)), de las inclusiones cristalinas en un gradiente con menor saturación (30% (m/v)). Los cristales, por su parte, se recuperaron en la capas de 67 y 72% cuyo resultado se confirmó por Swiecicka y colaboradores (2008) aplicando gradientes de sacarosa de 67%, 72% y 79% (m/v) sobre un *pellet* centrifugado con la mezcla del complejo espора-cristal de *Bacillus thuringiensis* subs. *thuringiensis*.

Los motivos clave por los que se han seleccionado inhibidores proteínáceos dentro de un programa de control de plagas insectiles se relacionan con sus características particulares como tamaño pequeño, abundancia en la naturaleza, estabilidad y elevada especificidad hacia un grupo de enzimas digestivas (Jaber *et al*, 2010; Oliveira *et al*, 2007). La exploración biotecnológica se debe enfocar en la comprensión de los dos principales parámetros que interfieren a nivel bioquímico en la afinidad enzima-inhibidor y que pueden afectar la actividad inhibitoria de los inhibidores de proteinasas vegetales: el pH y la temperatura (Ajamhassani *et al*, 2012). El pico principal de actividad proteolítica a pH 9.0 muestra que el extracto de *G. max* opera óptimamente bajo condiciones alcalinas. Valencia & Arboleda (2005) mencionan que las proteasas del intestino medio de las larvas de *H. hampei* presentan actividad

hidrolítica óptima a un intervalo de pH fisiológico entre 3.0 y 9.0 sobre sustrato azocaseína, y se presumen que las proteinasas que participan en este ámbito de pH son las serín- y aspártico-proteinasas. Tomando en cuenta dicha propuesta, los IPs en el extracto de soya podrían ser capaces de inhibir las proteasas que están más activas a pH básico, y que son las serín-proteinasas (Rodríguez-Macedo *et al*, 2011).

Los inhibidores de proteasas en leguminosas han sido ampliamente estudiados por diversos autores. Benjakul *et al* (1999) aislaron y purificaron parcialmente extractos de caupí (*Vigna unguiculata*), gandul (*Cajanus cajan*), maní bambara (*Voandzeia subterranea*) mediante precipitación con sulfato de amonio bajo una saturación de 30-65% (m/v) y notaron que la actividad de todas las leguminosas sobre el sustrato BApNA se mantuvo estable dentro del espectro de pH entre 2.0 y 10.0, aunque la actividad tendió a ser más baja a pH entre 2.0-4.0; posiblemente debido a una repulsión electrostática intramolecular que podría ocasionar acumulación de fluido dentro de las células (*swelling*) y afectar el plegamiento proteico. Asimismo, Pereira *et al* (2007) notaron que el inhibidor Kunitz de tripsina de soya (SKTI) inhibió en 90%, la actividad proteolítica de las proteasas digestivas de *H. hampei* bajo condiciones de pH en el intervalo neutro a alcalino (6.0 a 9.0).

Además, Bijina (2006) demostró que los inhibidores Kunitz extraídos de hojas de moringa (*Moringa oleifera*, Moringaceae), luego de poner en contacto el extracto con diversas soluciones amortiguadoras por un periodo de 24 h a 37 °C, la actividad proteolítica más elevada respecto al pH se observó pH neutral a ligeramente a alcalino (pH 7.0-10.0); mientras que a pH ácido, la actividad disminuyó considerablemente. Pichaikannu (2005) destaca que la mayor parte de inhibidores de proteasas (IPs) son más estables a pH alcalino, ya que las condiciones bioquímicas ácidas pueden alterar parcial o totalmente la estructura tridimensional de un inhibidor; modificando su carga neta, inactivando su centro reactivo y promoviendo su desnaturalización, lo que repercute directamente sobre la actividad específica y el índice de colisiones que originan el complejo inactivo proteasa-inhibidor.

La mayor parte de los IPs en la soya tienen la particularidad de ser inestables a elevadas temperaturas y suelen ser parcial o totalmente destruidos, luego de cortos periodos de exposición a temperaturas por debajo de 60 ó 70 °C (Ajamhassani *et al*, 2012; Alarcón *et al*, 2001). Este fenómeno se corroboró al determinar la temperatura óptima de actividad del extracto de *G. max* en sustrato BApNA (Figura 25), ya que dicha actividad proteolítica fue más elevada entre 40 y 45 °C; mientras que a temperaturas superiores a 50 °C, la actividad comenzó a declinar respecto a la reportada a 30 °C. Cabe resaltar que aunque hubo mayor actividad proteolítica a temperaturas superiores de 70 °C, los valores obtenidos se desestimaron porque DL-BApNA puede auto-hidrolizarse bajo temperaturas tan elevadas o, alternativamente, por la presencia de otras enzimas carentes de actividad trípica que puedan hidrolizar el sustrato (Díaz-Mendoza, 2006; Gordon-Omondi, 2005). Al mismo tiempo, no hay que perder de vista que a temperaturas superiores a ~50 °C, los IPs se pueden inactivar o perder más de un 50% de actividad inhibitorio, producto de procesos de desdoblamiento y disociación sobre los enlaces polipeptídicos y disulfuro que genera el calor (Ramalho-de-Oliveira *et al*, 2012). Si las temperaturas no son extremas, se produce una inactivación parcial o reversible, donde suelen intervenir interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y puentes de hidrógeno (Abdolgader, 2000).

Considerando que el intervalo de temperaturas de 30 a 65 °C el liofilizado de soya no mostró actividades proteolíticas significativamente diferentes (Tukey, $P > 0,05$), se infiere que el extracto mostró un alto grado de termoestabilidad hasta ~70 °C. Este aspecto es de gran relevancia al seleccionar un IP para atacar a una plaga como *H. hampei*, porque la mayoría de investigaciones anteriores se han enfocado en probar cuán resistente es un IP hacia el calor, previendo que este factor podría repercutir en la efectividad en campo por el clima tropical en que se desenvuelve la plaga y dado el ambiente hostil a los que el IP se podría enfrentar en el sistema digestivo del herbívoro (Major & Constabel, 2008). Cabe destacar que aunque las hidrolasas del lumen de *H. hampei* suelen actuar a temperaturas por debajo de 30 °C, Preciado-Rodríguez *et al* (2000) demostraron que las proteasas digestivas de larvas de *H.*

hampei exhiben actividad proteolítica hacia el sustrato BApNA a un ámbito óptimo de 30-70 °C; por lo que el extracto de soya que se aisló en este proyecto podría potencialmente inhibir las actividad trípica de la broca, incluso a altas temperaturas.

Gomes *et al* (2005) y Shamin *et al* (2011), verificaron que las actividades proteolítica e inhibitoria de los IPs intramoleculares de la familia Kunitz de leguminosas (SKTI) se mantienen constantes dentro del espectro de temperatura entre 25 y 70 °C debido a que estas serpinas cuentan con dos enlaces disulfuro, que son presumiblemente responsables de proporcionar la estabilidad funcional de la estructura terciaria ante las variaciones de temperatura, excepto cuando esa temperatura es extrema y promueve un mal plegamiento o la desnaturalización. Cuando se llega a 100 °C, se ha evaluado que esta condición extrema de calor puede causar que en 9 min el 87% de los SKTI sean destruidos (Vorlová, 2011). Tomando como base dichas evidencias y el hecho de que actividad proteolítica del extracto de soya purificado (Figura 26) mostró un patrón de actividad bastante constante en el intervalo de 30 a 65 °C, se puede sugerir que los IPs aislados del extracto pertenecen a la familia Kunitz de tripsín-proteinasas.

Mediante la electroforesis SDS-PAGE (Figura 27), se identificó que el liofilizado de soya fue más complejo a nivel de composición molecular respecto al de *H. hampei*; ya que en el extracto de intestino medio se observó una única banda que representa una cadena polipeptídica, mientras que en extracto de soya se identificaron tres bandas de proteínas. Los controles positivos de la tripsina de páncreas porcino (23,8 kDa) e inhibidor comercial Kunitz de tripsina de soya (20,1 kDa), así como el marcador de peso molecular *Prestained Page Ruler*, permitieron verificar que las bandas vistas en ambos extractos tenían proteínas con los pesos aparentes compatibles con el de las enzimas que se pretendía extraer.

El perfil proteico del extracto de soya, además de contar con el inhibidor de tripsín-proteasa que se estimó en 20,6 kDa y que suele encontrarse entre 18-22 kDa, se pudieron visualizar otras dos bandas a aproximadamente 36,6 kDa y 92,3 kDa. Al realizar un gel Tricina-SDS-PAGE con un extracto crudo de semillas de soya, Chen

et al (2010) distinguieron que el perfil de bandas obtenido contenía una serie de proteínas que se caracterizaron como las subunidades α (83 kDa), α' (72 kDa) y β (48,4 kDa) del trímero β -conglucina, una glicinina ácida (38,9 kDa) y una glicinina básica (18 kDa). Schwingel & Bates (1996) observaron que en un extracto de soya lograron identificar las subunidades α (93-89 kDa), α' (82-72 kDa) y β (54-48 kDa) del polipéptido β -conglucina, la glicinina ácida (33-40 kDa) y la glicinina básica (18-14 kDa). De la misma forma, Bennet (2005), Besler *et al* (2000), y Sriket *et al* (2011), luego de realizar geles SDS-PAGE al 12% de acrilamida/ bisacrilamida, identificaron que el perfil proteico estuvo constituido por una glicinina ácida que contó con un peso molecular de 45-31 kDa, una glicinina básica de 18-20 kDa, y las subunidades α (93-89 kDa), α' (82-72 kDa) y β (42-54 kDa) de la β -conglucina.

La β -conglucina (vicilina, subunidad 7S), en conjunto con la glicinina (leguminina, subunidad 11S), son agentes antigénicos del grupo de las globulinas (proteínas de almacenamiento) que se encuentran comúnmente en la soya y representan entre el 70 y 90% de proteína en *G. max*, mientras que los IPs (subunidad 2S) son un grupo de globulinas de la soya que corresponde al 20% de proteínas totales (Benjakul, 1999; Roosta *et al*, 2011; Vorlová, 2011). Estas evidencias sugieren que las bandas observadas a 92,3, 36,6 y 20,6 kDa se podrían identificar como la subunidad α de la β -conglucina, la glicinina ácida y el IP Kunitz de tripsina de soya, respectivamente.

La observación del peso molecular estimado de las proteasas digestivas de *H. hampei* correspondió a 24,1 kDa, que coincide con la que obtuvo Parde (2009) al purificar un extracto de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera); quien al desarrollar un gel SDS-PAGE obtuvo un banda que estimó en 24 kDa y con el resto de análisis bioquímicos, se categorizó dentro el grupo de serín-proteasas. Las plagas de coleópteros suelen estar equipadas con un complejo grupo de proteasas digestivas, que les permite adaptar su metabolismo catalítico a sus hábitos alimenticios (Major & Constabel, 2008). A pesar de este argumento, en el extracto sólo se ubicó una banda que corresponde a un único grupo de proteasas; por lo que se presume que durante la

etapa de diálisis en membrana semipermeable, se pudieron remover algunas proteinasas que contaban con pesos moleculares menores a 14 kDa.

Con la técnica de zimografía en una dimensión se detectó y se cuantificó la densidad de las proteasas bioactivas presentes en el extracto luminal de intestino medio de hembras adultas de *H. hampei* dentro del gel co-polimerizado con gelatina al 0,1% (m/v) bajo condiciones no reductoras (Figura 29), tal y como publicaron Klug *et al* en el 2006 y Nack-Shick *et al* en el 2003. En el zimograma se observó que en el extracto había una única banda de proteólisis, la cual tuvo masa molecular aproximada de 24 kDa; que coincidió con la banda en el gel SDS-PAGE. Un resultado similar fue obtenido por Fabrick *et al* (2002), quienes al realizar el zimograma de gelatina al 0,3% (m/v) de un extracto de intestino medio del gusano taladrador del maíz (*Diabrotica undecimpunctata*, Coleoptera), estimaron que la única banda obtenida, mostró un peso molecular de 25 kDa y se clasificó en el grupo de serín-proteinasas.

Por otra parte, el zimograma de actividad proteolítica utilizando diluciones seriadas de la tripsina porcina comercial (Figuras 30 y 31), reveló que la actividad trípica de 30 mg de extracto de *H. hampei* fue bastante baja (6,5%). Al mezclar el extracto de soya junto con el extracto intestinal de broca en proporción 1:1 y cargar una muestra en el zimograma, se visualizó que la zona de actividad producida por la gelatina digerida en el extracto de broca desapareció completamente. Estos resultados apuntan a que el 0,2% de actividad proteolítica obtenido en el extracto luminal de adultos de *H. hampei* fue bloqueado por la acción de los inhibidores de proteasas que había en el extracto de harina de *G. max*, ya que la mayor parte de extractos de soya cuentan con 5 a 20% de actividad anti-trípica (Becker-Ritt *et al*, 2004). Adicionalmente, sugieren que las tripsín-proteasas fueron las principales enzimas que digirieron la gelatina y al adicionar el extracto de soya, los IPs reaccionaron de manera específica con la tripsina y formaron un complejo proteico inactivo y estable, que en el gel se vio reflejado como la desaparición de la zona clara sobre el gel teñido.

La supresión de las bandas de actividad observadas en el liofilizado de soya fue investigada por Sriket *et al* (2011), empleando un extracto de hepatopáncreas obtenido de gambas, *Macrobrachium rosenbergii*. Los resultados obtenidos en el zimograma mostraron una supresión parcial sobre la banda proteolítica del extracto de hepatopáncreas, aunque no mencionan qué tanta actividad inhibitoria se obtuvo, ya que no fue cuantificada. Además, destacan que al analizar el efecto preventivo a la degradación del extracto, los IPs de soya no inhibieron del todo la hidrólisis causada por el extracto de este pescado, ya que a dosis tan bajas como $1,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, el efecto de degradación disminuyó considerablemente. Hosseinaveh *et al* (2007), aislaron las proteasas del intestino medio del escarabajo de Khapra (*Trogoderma granianum*, Coleoptera), y obtuvieron un perfil de actividad que generó un patrón de bandas sobre un zimograma co-polimerizado con caseína al 2% (m/v). Sin embargo, al mezclar fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) ó IP Kunitz de tripsina de soya (SKTI) al 5 mM en proporción 1:1 con el extracto del escarabajo, la intensidad de una de las seis bandas de actividad (visualizada a 21 kDa) que contribuía a la digestión de la caseína, se redujo en ~76% por el PMSF y en ~77% por el SKTI; por lo que estos resultados confirman que los IPs pueden inhibir un grupo de proteasas más que otras. Este argumento requiere notoria atención porque plantea la posibilidad de que la soya no sea una fuente óptima de IPs para atacar las proteasas digestivas de la broca.

Liao *et al* (2007) sugieren que un extracto aislado de *Cassia obtusifolia* (Fabaceae), que fue estable a pH entre 2 a 12 y a temperaturas por debajo de 60 °C, puede tomarse como criterio para seleccionar este IP para el control de la actividad trípica de una plaga como *Pieris rapae* (Lepidoptera), ya que al realizar un zimograma de gelatina, la reducción de la banda digerida por el extracto intestinal de este lepidóptero fue elevada. Por otra parte, el aislamiento y purificación parcial de extractos de un cultivar de soya mostró una disminución de la banda de actividad proteolítica en 90% a causa del fluido intestinal de *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera) en un zimograma de gelatina al 0,1% (m/v), manifestando el efecto inhibitorio de la soya (Ghodke *et al*, 2012).

Cuando ocurre inhibición de la actividad proteolítica, los efectos secundarios suelen ser una reducción significativa en la digestibilidad proteica, hiperplasia e hipertrofia. Estos efectos producen un estrés fisiológico sobre el metabolismo del insecto que induce a un alto gasto energético por parte del coleóptero, que a su vez desencadena la sobreproducción y expresión selectiva de proteasas insensibles al IP, con el fin de compensar la pérdida progresiva y la capacidad de asimilar aminoácidos (Ghodke *et al*, 2012; Oppert *et al*, 2006; Rodríguez-Macedo *et al*, 2011). Aunque en este estudio no se puede asegurar que estos fenómenos ocurrieron dentro del intestino de *H. hampei*, en futuros proyectos se podría hacer hincapié para analizar estos aspectos.

Como se evidencia en la Figura 32, fue interesante notar que tanto el inhibidor comercial Kunitz de tripsina de soya, SKTI ($0,361 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), como el extracto de soya purificado ($0,444 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), exhibieron actividad proteolítica hacia el sustrato BapNA, que suele usarse para reconocer la actividad amidolítica de una enzima como la tripsina que reacciona sobre residuos de arginina y lisina (McLennan *et al*, 2012). Una potencial explicación para este resultado se basa en la competencia entre la formación del complejo inactivo tripsina-inhibidor y entre la reacción que se produce entre la tripsina el sustrato BApNA. Tal como explican Dorrah *et al* (2008); Green & Work (1952) Kakade *et al* (1969) y Odei (2000), aunque la afinidad de la tripsina hacia el sustrato cromogénico DL-BApNA es un poco menor ($Km^{16} = 1,2 \times 10^{-5}$) respecto a la que existe entre la tripsina y el inhibidor Kunitz de tripsina de soya ($Ki^{17} = 2,1 \times 10^{-9}$) a pH 9.0; dado que los valores experimentales de ambas constantes están relativamente cercanos entre sí; podrían ser diferentes de acuerdo con el grado de purificación, el tipo de muestras evaluadas, la concentración utilizada del sustrato BApNA (que en esta investigación fue de $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y el tiempo de reacción. En este contexto, el índice de reacción pudo favorecer la formación del producto tripsina-BApNA en vez del complejo inactivo tripsina-inhibidor debido a la interferencia de las otras globulinas que se aislaron en el extracto de soya que afectó las colisiones

¹⁶ *Km*: constante de disociación de Michaelis-Menten.

¹⁷ *Ki*: Constante de inhibición enzima-inhibidor.

efectivas, y a que probablemente el tiempo de reacción (10 min) utilizado no fue lo suficientemente óptimo para que la actividad inhibitoria ocurriera o fuera detectable.

Al comparar la actividad inhibitoria obtenida con un inhibidor sintético (PMSF), respecto a la de uno proteico (SKTI) sobre tripsina porcina comercial a 40 °C y a pH 9.0; los resultados mostraron que el PMSF (19%) fue menos efectivo en inhibir la actividad inhibitoria de la tripsina, mientras que el SKTI (84%) mostró actividad anti-tríptica mucho más elevada (Figura 32). Estos resultados son parecidos a los que obtuvo Sáenz-de-Rodríguez *et al* (2005), quienes al evaluar la actividad inhibitoria sobre proteasas digestivas del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*), determinaron que las actividades inhibitorias del PMSF y del SKTI fueron 74% y 39,1%, respectivamente. Asimismo, Pereira *et al*, (2007) alcanzaron una actividad inhibitoria de ~80% al mezclar las proteasas digestivas de la broca con un extracto de cubases que contenía inhibidores Bowman-Birk utilizando el sustrato Z-fenilalanina-arginina-(7-amino-4-metilcoumarin) (Z-Phe-Arg-MCA) al 0,6 mM. García-Carreño (1993) explica que el PMSF reacciona lentamente con serín-proteasas, por lo es aconsejable incubar la mezcla de reacción enzima-sustrato-inhibidor por un periodo de al menos tres horas, ya que la inhibición parcial suele apreciarse hasta después de una hora. Además, el PMSF tiene una vida media de ~35 min en medio acuoso a temperatura ambiente y a pH alcalino, por lo que es probable que la actividad inhibitoria durante el análisis se haya disminuido, dado que la mezcla de reacción con este IP se trató a pH básico. Por otra parte, este autor afirma que el SKTI, a concentraciones bajas en el orden de μM , actúa de forma específica y reacciona rápidamente sobre las proteínas trípticas solubles debido a que éstas poseen grupos funcionales afines con los grupos que posee el SKTI, cuyo producto de hidrólisis es altamente estable y genera una absorción a una longitud de onda específica, que suele alcanzarse a 405 nm.

Cuando se compararon las actividades proteolíticas obtenidas cuando se mezcló el SKTI y la tripsina porcina ($0,210 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$), con el extracto de soya parcialmente purificado junto con el extracto de *H. hampei* ($0,832 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$); se observó que el SKTI comercial produjo una inhibición de ~80% sobre la actividad tríptica de la tripsina,

mientras que el extracto de soya produjo un efecto aditivo sobre actividad proteolítica en vez de producir inhibición (Figura 33). Este comportamiento anómalo también se observó luego de mezclar diluciones seriadas del liofilizado de soya, partiendo de una concentración de $2,857 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, con un volumen del extracto de intestino medio de *H. hampei* o de tripsina porcina al $0,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figuras 34 y 35). Conforme se diluyó la concentración del extracto de soya, la actividad enzimática disminuyó considerablemente hasta llegar a ser prácticamente imperceptible. Estos resultados son contradictorios a los anticipados por Clauss *et al* (2011), quienes analizaron la actividad trípica de diluciones seriadas de tripsina bovina, para calcular la expresión del inhibidor recombinante de tripsín-proteasas de páncreas bovino (BPTI, aptotina). Ellos comprobaron que el porcentaje de actividad inhibitoria se aumentó proporcionalmente conforme incrementó la concentración del inhibidor.

Una posible explicación para esta inesperada relación directa puede radicar en que las proteínas identificadas en el gel SDS-PAGE (Figura 28)¹⁸ produjeran actividad enzimática interferente, cuyo razonamiento es respaldado por Kakade *et al* (1969), quienes al evaluar una elevada dosis de un extracto vegetal parcialmente purificado para inhibir la actividad trípica de una hidrolasa, la presencia de otras proteasas de mayor peso molecular en el extracto pueden interferir en la reacción, dado el impedimento estérico que se produce entre estas proteínas y el inhibidor proteico, que repercute en la especificidad del IP. Dicho postulado también es respaldado por Macintosh (1990), quienes purificaron los IPs de extractos de semillas y hojas de las leguminosas caupí (*Vigna unguiculata*) y poroto adzuki (*Vigna angularis*) por precipitación con sulfato de amonio al 80% (m/v) y cromatografía, y no detectaron actividad inhibitoria sobre un extracto luminal del escarabajo de la papa del Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptera) mediante BApNA, porque en cada extracto había otras sustancias interferentes, tales como la clorofila y otras proteínas. Bajo este contexto, el proceso de purificación desarrollado en este proyecto no fue adecuado en las etapas de caracterización de los mecanismos de acción catalítica de los IPs en el

¹⁸ Ver detalles en la sección 4.6

extracto de soya debido a que la β -conglucina y la glicina ácida interrumpieron la reacción inhibitoria, lo que conllevó a que las actividades proteolíticas en la soya y el extracto de broca produjeran un efecto aditivo y no inhibitorio.

En un complejo plaga-hospedero estabilizado como en el que se ha desenvuelto *H. hampei*, la broca como insecto monófago ha co-evolucionado y se ha adaptado rápidamente a estar en contacto con las sustancias tóxicas (incluyendo IPs) que secreta *C. arabica*, dada una presumible presión selectiva que se ha ejercido sobre poblaciones con el paso del tiempo (Harsulkar *et al*, 1999; Molina *et al*, 2011). Tal comportamiento ha sido reportado por Panchal & Kachole (2012), quienes al llevar a cabo diversas pruebas espectrofotométricas y de zimografía evaluaron que la proteasas de las larvas del barrenador manchado del tallo (*Chilo partellus*, Lepidoptera) fueron más susceptibles a la actividad inhibitoria de los extractos de plantas no-hospederas como la reonja (*Acacia leucophloea*, Fabaceae) y el nim (*Azadirachta indica*, Meliaceae), en relación con plantas hospederas como sorgo (*Sorghum bicolor*, Poaceae) y mijo perla (*Pennisetum glaucum*, Poaceae), dado que la actividad inhibitoria fue más elevada en las plantas no-hospederas (33-68%) que en las hospederas (12-25%). Estas consideraciones han generado algunas inquietudes en torno a los IPs derivados de extractos vegetales de plantas no-hospederas, para comprobar si la plaga de interés posee mecanismos bioquímicos y fisiológicos para regular o modular su patrón proteolítico y superar los efectos deletéreos causados por los IPs, como la hiperplasia o la síntesis de proteasas insensibles a los IPs; o si por el contrario, los inhibidores son capaces de obstruir la actividad proteolítica de las hidrolasas (Panchal & Kachole, 2012; Prasad *et al*, 2010). Previamente, se reportaron algunos casos (Carrillo, 2009; Prasad *et al*, 2010) en los que se explica que la moderada respuesta de las proteinasas de algunas plagas al efecto de las serpinas de plantas no-hospederas ha causado una baja efectividad de los IPs y ha favorecido la resistencia del herbívoro hacia estas sustancias tóxicas.

Los estudios realizados Molina (2010), empleando un extracto de lupino (*Lupinus bogotensis*, Fabaceae) contra las aspártico-proteasas del intestino medio de *H. hampei*

apuntan a que los inhibidores que secreta esta planta fueron mejores inhibidores y causaron menor supervivencia, en comparación con las sustancias tóxicas presentes en el café. Tal disertación puede conllevar a que incluso, se podría complementar el efecto de las serpinas de *G. max* con el de los IPs de aspártico-proteinasas de *L. bogotensis* para producir un efecto aún más perjudicial sobre la mortalidad de esta plaga. De hecho, una combinación similar ya fue probada por Oppert *et al* (2003), quienes mezclaron la pepstatina (inhibidor de aspártico-proteasas) y el inhibidor Kunitz de tripsina de soya (SKTI) para emplearlos en bioensayos sobre larvas del el gorgojo del caupí (*Callosobruchus maculatus*, Coleoptera); y el efecto sinérgico de ambos inhibidores permitió retrasar el crecimiento de los insectos.

Al aplicar un formulado de *Bt* sobre una plantación agrícola infestada; las δ -endotoxinas están propensas a interactuar con las peptidasas ambientales o; al ser ingeridas por el insecto, con las proteasas del fluido intestinal por medio de enlaces disulfuro, puentes de hidrógenos y enlaces hidrofóbicos. Tales interacciones conducen a una pre-hidrólisis y a la activación de la toxina y contribuyen eventualmente a su disolución parcial (Oppert *et al*, 2006). Como los inhibidores de proteasas de la soya se pueden aplicar para interferir sobre la actividad catabólica de la tripsina; en un escenario ideal, uno de los propósitos prácticos de implementar los IPs es que desempeñen un efecto protector sobre la actividad hidrolítica generada por tripsín-proteasas digestivas y ambientales como la disolución y posterior degradación de las protoxinas (Blanco-Labra *et al*, 1996; Jaber *et al*, 2010; Oppert, 1999). Para verificar esta premisa, se hizo un SDS-PAGE con el liofilizado de *Bti*, con la consigna de conocer el nivel de actividad proteolítica de la tripsina porcina como control ambiental sobre las bandas de *Bti* obtenidas, y probar si los IPs del extracto de soya podían prevenir la degradación de las bandas visualizadas en el gel (Figura 36). Las bandas obtenidas en el gel se ubicaron a 52 y 24 kDa, que indican que en los cristales purificados se ubicaron las toxinas Cry3 y Cyt, ya que como mencionan Ali *et al* (2010), De-Souza *et al* (2009) y López-Pazos *et al* (2009), el perfil de polipéptidos de *Bt* (subs. *israelensis*) en SDS-PAGE posee proteínas entre 20-140

kDa, y revelaron que las proteínas Cry3 estaban entre 53 a 43 kDa y las citolisinas (Cyt) entre 28 y 22 kDa; las cuales en algunos casos, se pueden ver ligeramente digeridas por la actividad de las proteasas endógenas de *Bt*.

Al analizar el efecto alcanzado al mezclar el liofilizado de *Bti* junto con la tripsina porcina, las bandas de *Bti* fueron ligeramente degradadas a 50 y 22 kDa por la tripsina comercial. Estos concuerdan con el SDS-PAGE obtenido por Carroll *et al* (1989), quienes al tratar una mezcla de toxinas de *Bt* subs. *tenebrionis* purificadas mediante gradientes de sacarosa con tripsina bovina ó con extracto de tripsín-proteinasas intestinal de la mariposa blanca del repollo (*Pieris brassicae*, Lepidoptera) en proporción 1:2, descubrieron que en la mayoría de las cepas evaluadas ocurría un digestión limitada sobre las bandas de *Btt*, que conllevó a la conversión de una banda de 73 kDa a 67 kDa. Para complementar la explicación, Martínez-Ramírez y Real (1996) realizaron un SDS-PAGE con extractos intestinales del escarabajo de la papa del Colorado (*Leptinotarsa. Decemlineata*, Coleoptera) con el complejo espora-cristal de *Bt* subs. *kurstaki*; y notaron que aunque el fragmento de *Btk* había sido digerido por el extracto luminal, su toxicidad en los bioensayos se incrementó significativamente ($P < 0,05$). Aunque no se realizó un ensayo del efecto de actividad proteolítica de los cristales sobre el extracto de proteasas digestivas de hembras de *H. hampei* debido a que para dicho ensayo ya se había agotado el material biológico; como la señal de actividad enzimática emitida en este extracto ($0,699 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) por la reacción con el sustrato BApNA fue casi dos veces menor que la reportada con la tripsina porcina ($1,218 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Figura 32), se asumió que el efecto degradador de las proteasas en el extracto de broca habría sido más bajo.

Al parecer, las tripsín-proteasas activadas a una temperatura adecuada que suele ser de 35-40 °C, pueden hidrolizar lenta y gradualmente las cadenas polipeptídicas de las proteínas Cry en el extremo amino-terminal (N-terminal), produciendo péptidos que disminuyen su peso molecular entre 3 y 10 kDa, los cuales tienden a ser poco estables en el ambiente y en las condiciones bioquímicas del fluido intestinal de la plaga que van a atacar, provocando reacciones contraproducentes en el intestino medio

(Azarkan *et al*, 2006; Díaz-Mendoza, 2006; Haider & Ellar, 1987) Dicho aspecto fue estudiado por (Oppert, 1999), quien averiguó que las proteasas digestivas de *P. brassicae*, (Lepidoptera) y del gusano de seda (*B. mori*, Lepidoptera), incubadas a 37 °C por 15-30 min, digerían lentamente las toxinas Cry, y que la disolución de los cristales producida por el pH alcalino en el fluido intestinal del insecto fue un pre-requisito para aumentar el índice de proteólisis.

Mediante la mezcla de diluciones seriadas analizadas sobre el liofilizado de soya con la tripsina porcina, se logró notar que el extracto protegió las toxinas de *Bti* de la digestión enzimática porque la degradación de las bandas con las masas aparentes anticipadas para Cry3 y Cyt declinó ligeramente. Estos resultados concuerdan con los registrados por Macedo *et al* (2011), quienes evaluaron el efecto de un extracto de talisina (*Talisia esculenta*, Sapindaceae) purificado por cromatografía de exclusión iónica sobre las endoproteasas de *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera) sobre tripsina bovina, y demostraron que la talisina evitó la actividad trípica de *A. gemmatalis*. Una posible razón por la que el extracto de soya redujo levemente la hidrólisis de los cristales de *Bti* se relacionó con el grado de purificación obtenido con el liofilizado de harina de soya; y al hecho de que en el gel SDS-PAGE (Figura 28) se identificaron dos proteínas adicionales aparte de la posible serpina. Las investigaciones desarrolladas por Subramaniam & Smith (2013) y Wilson *et al* (1986) explican este resultado; ya que mediante análisis en SDS-PAGE verificaron que las globulinas glicinina ácida y β -conglucina extraídas de la soya poseían proteólisis limitada a las semillas germinadas, debido a que las plántulas en desarrollo y parte de las plantas maduras requieren del proceso de proteólisis que realizan estas enzimas para recibir energía y aminoácidos esenciales. Además, Schwingel & Bates (1996), determinaron que estas proteínas son resistentes a la proteólisis endógena en la soya porque estructuralmente cuentan con puentes disulfuro en sus enlaces internos.

A pesar de la disolución de los cristales, se ha planteado la posibilidad de que una elevada proteólisis sobre las proteínas de *Bt* puede suscitar un incremento en la actividad insecticida. Vidal-Quist *et al* (2010) cultivaron las protoxinas Cry de varias

cepas de *Bacillus*, pero sólo *Bt* (subs. *israelensis*) en medio CCY (*casein casein yeast*, caseína caseína levadura), y a través de ensayos en geles SDS-PAGE, determinaron que las proteínas Cyt incubadas sobre extractos de intestino medio de las larvas de *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera) fueron procesadas y sufrieron una conversión de bandas de 25 a 22 kDa después de 20 h a 37 °C; lo que causó un efecto contraproducente sobre el insecto, ya que provocó un incremento significativo ($P < 0,05$) sobre la toxicidad y el desarrollo de las larvas de este lepidóptero. Estas observaciones parecen relacionarse con los resultados obtenidos al desarrollar el gel con las mezclas de *Bti*-tripsina, *Bti*-soya y *Bti*-tripsina-soya (Figura 36), debido a que el gel resultante mostró que las bandas de Cry3 y Cyt fueron digeridas por esta hidrolasa, lo que posiblemente favoreció a que se produjera una mayor toxicidad y mortalidad sobre la broca, como se explicará en los siguientes párrafos.

El análisis de regresión Probit obtenido en ambos bioensayos con los cristales de *Bti* de manera individual ($1,135 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) (Figura 37) o incorporando la dosis letal media de *Bti* y diferentes dosis del extracto de soya ($0,315 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) (Figura 38); demostró que los valores de concentración letal media (LD_{50}) fueron muy distintos. La LD_{50} de *Bti* fue tres veces más alta que la obtenida al agregar *Bti* + extracto de soya, lo que sugiere que por cada $\sim 0,57 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de liofilizado de soya incorporado en dieta, la mortalidad aumentó en $\sim 5\%$. Pardo-López *et al* (2011) comentan que el efecto potenciador de los IPs se ha visto a dosis con un factor de 10^5 por debajo de la concentración letal media de las δ -endotoxinas, y tal efecto parece acrecentar la vida media y la habilidad de las toxinas para unirse al receptor ubicado en la membrana del intestino medio. Pese a ello, se debe aclarar que a una concentración tan baja como la que proponen estos autores no se podría haber alcanzado una mortalidad considerable sobre los adultos de *H. hampei*, debido a que en el extracto de soya pudo haber interferencia de al menos otras dos proteínas, como se explicó anteriormente.

Los estudios hechos por MacIntosh *et al* (1990) complementan los resultados obtenidos en esta investigación, ya que bioensayos en hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*, Solanaceae) de *Bt* subs. *israelensis* ($2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) con dosis crecientes

de inhibidor Kunitz de tripsina de soya (SKTI) mataron más larvas del escarabajo de la papa del Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*, Coleoptera). Estos autores demostraron que a dosis bajas como $0,01 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ del inhibidor, la mortalidad corregida alcanzó $\sim 74\%$; mientras que a $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, la mortalidad fue de 93% . Por su parte, Fuchs *et al* (1991) desarrollaron bioensayos en dieta artificial y compararon el efecto potenciador al adicionar el SKTI a $4 \mu\text{M}$ ($0,02 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) junto con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de la toxina de *Bt* (especie *kurstaki*) completa ($\sim 80 \text{ kDa}$) ó $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de la toxina digerida por las proteasas trípticas del intestino medio de larvas de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera) para estimar los efectos sobre el peso de larvas del gusano cogollero del tabaco (*Heliothis virescens*, Lepidoptera), a $27 \text{ }^\circ\text{C}$ después de seis días. La mejor respuesta respecto al índice de mortalidad, se obtuvo con los cristales digeridos por *T. ni* en la mayoría de los casos porque el factor de potenciación correspondió a 3,3, respecto al obtenido con el cristal sin digerir que resultó en 2,5.

Aunque los mecanismos de interacción entre las δ -endotoxinas de *Bt* y los inhibidores de proteinasas vegetales (IPs) no han sido completamente dilucidados, se ha sugerido que la actividad insecticida de las toxinas a una concentración sub-lethal puede ser inefectiva, no sólo por las condiciones ambientales sobre a las que se exponen los cristales; sino también por la acción proteolítica de las proteasas ambientales y de las proteinasas del canal alimentario del insecto blanco, que pueden inactivar las inclusiones proteicas cristalinas por la sobre-expresión de péptidos insensibles a las proteínas Cry y por la estimulación de las diversas cascadas de señalización que se estimulan en el ambiente y en aparato digestivo del insecto, que ponen en riesgo la actividad tóxica de *Bt* (Carrillo, 2009; López, 2011).

Los resultados obtenidos en la Figura 39 sugieren que los IPs en el extracto de soya parcialmente purificado, exhibieron un importante grado de sinergia con los cristales *Bti*. Pareciera que a dosis menores a $0,284 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, *H. hampei* puede modular su arsenal de proteasas digestivas en el intestino medio, degradando las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* (Saadati & Bandani, 2011 y 2013). Además, los IPs pueden producir respuestas variables o contrastantes entre pruebas espectrofotométricas y

bioensayos, y este comportamiento fue ensayado por Amorim *et al* (2009), quienes demostraron que un extracto de *G. max* producía un 96% de inhibición sobre las enzimas digestivas de las larvas de la palomilla bandeada (*Plodia interpunctella*, Lepidoptera) empleando el sustrato azocaseína, pero al desarrollar bioensayos en dieta artificial al 1%, reportaron que sólo se alcanzó una mortalidad de ~10%.

De la misma forma, Saadati *et al* (2011), determinaron que extractos de frijol (*Phaseolus vulgaris* var. *naz*, Fabaceae), garbanzo (*Cicer arietinum*, Fabaceae), triticale (*Triticosecale wittmack*, Poaceae), y *Celosia argentea* (Amaranthaceae) bloquearon la actividad de las hidrolasas a 40-80% en sustrato BApNA, sobre las proteinasas de adultos del gorgojo del caupí (*Callosobruchus maculatus*), pero al incorporar los extractos en dieta artificial, la mortalidad de los insectos no se afectó significativamente y el extracto de *Celosia argentea* fue el único en producir una de mortalidad máxima de 50%. Esta discrepancia también fue examinada por Castro-Guillén *et al* (2012) al aislar y purificar un extracto de semillas de chan (*Hyptis suaveolens*, Lamiaceae), el cual fue capaz de inhibir la actividad trípica de extractos luminales del gorgojo ngungutawa (*Pericoptus truncatus*, Coleoptera) en sustrato N-benzoil-L-arginina-*p*-nitroanilina (Bz-R-*p*NA), pero fue inefectivo cuando se agregaron concentraciones incrementales del extracto de chan a la dieta artificial.

Aunque los resultados entre los análisis espectrofotométricos y los bioensayos son contradictorios, tal conducta es esperable porque no se contempló la presencia de otras serín-peptidasas como la quimiotripsina, que puede contribuir a la resistencia adaptativa del insecto. Por otra parte, el tipo de pruebas analizadas es variable no sólo por el tipo de muestras utilizadas; sino también porque la interacción proteasa-inhibidor pudo originar un complejo inestable que indujo una inhibición parcial o favoreció la degradación de los IPs por parte de las proteasas ambientales o digestivas del escarabajo (Amorim *et al* 2009; Castro-Guillén *et al*, 2012; Saadati *et al*, 2011).

De hecho, a pesar de que las repercusiones que el insecto pueda sufrir a nivel de permeabilidad intestinal y de absorción de nutrientes, la proteólisis limitada en el

tracto digestivo puede ser suficiente para suministrar los nutrientes necesarios y degradar las proteínas Cry. Al incorporar extracto de soya, se pudo haber inducido una competencia funcional por el centro activo de las tripsín-proteinasas entre el sustrato que éstas enzimas hidrolizan para asimilar los aminoácidos esenciales y los inhibidores de proteasas, lo que pudo conllevar a una deficiencia nutricional y a un retraso en el crecimiento por la síntesis gradual del complejo proteico inactivo tripsín-proteasa/inhibidor (Bravo *et al*, 2012; Zhu *et al*, 2007).

Estudios paralelos que se realizaron en el Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas (CIEMic) de la Universidad de Costa Rica en microscopio de transmisión electrónica (TEM) complementaron los resultados de los bioensayos, ya que al comparar el intestino medio de adultos de *H. hampei* alimentados únicamente en dieta artificial (como control) con el intestino de las hembras tratadas con 1,135 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de los cristales de *Bti* ó con una mezcla de cristales (1,135 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) y el extracto de soya (4,540 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$); se observaron diferencias considerables (Dahdouh, 2013)¹⁹. Las observaciones del intestino en la dieta control demostraron que *H. hampei* tenía células bien formadas con una membrana plasmática consistente; en las muestras del intestino tratadas con *Bti* se observó una serie de células lisadas, producto de la unión de los cristales con los receptores de la membrana y algunos daños en las microvellosidades; y en las muestras tratadas con *Bti* y con el extracto de soya; no sólo las células lisadas y las microvellosidades del intestino medio se visualizaron aún más deterioradas, sino que también el lumen celular se observó más disperso y algunas células se visualizaron más comprimidas (datos no publicados).

Parte de los experimentos realizados por Kirouac *et al* (2005) para comprobar el efecto permeabilizante de dos IPs sintéticos de serín-proteasas (PMSF²⁰ y AEBSF²¹) sobre la proteína Cry1Aa de *Bacillus thuringiensis* (subs. *kurstaki*) sobre las vesículas

¹⁹ Dahdouh-Cabia, S. 2013. Estudios de microscopía electrónica de transmisión para evaluar el efecto tóxico de *Bt* subs. *israelensis* junto con un extracto purificado de *Glycine max* sobre muestras de intestino medio de hembras adultas de *Hypothenemus hampei*. San José, Costa Rica, CIEMic. (Comunicación personal).

²⁰ Fluoruro de fenilmetil sulfonilo

²¹ Hidrocloruro de 4-fluoro-(2-aminoetil)-bencenosulfonilo.

de la membrana del intestino medio del gusano del tabaco (*Manduca sexta*, Lepidoptera) coinciden con el resultado obtenido en el TEM. Estos investigadores explican que usar dosis de serpinas más elevadas a la dosis sub-lethal obtenida en un bioensayo evaluada con las proteínas tóxicas de *Btk*, promovió la formación del poro dentro las células epiteliales del intestino medio de un insecto, sin alterar las propiedades biofísicas del poro y favoreció a que el efecto tóxico fuera más elevado.

Se ha planteado que la sinergia en el intestino medio conlleva a que mientras las protoxinas de *Bti* estimulan la formación del poro oligomérico en las células epiteliales, las serpinas inducen una antibiosis que detiene la tasa metabólica que promueve la expresión de un alto número de tripsín-peptidasas a degradar los cristales; lo cual afecta condiciones fisiológicas como absorción, digestión y transporte de nutrientes esenciales (Zibae *et al*, 2010). Estos fenómenos se pudieron ver reflejados en el intestino medio observado en el microscopio, dado que los daños a nivel de lumen y membrana celular se vieron más marcados en los tratamientos con los cristales *Bti* y el extracto de soya que únicamente con los cristales.

La tecnología de fusionar inhibidores de proteinasas vegetales con *Bt* podría ser una opción promisorio para la protección de las cultivos agrícolas de interés económico contra la herbivoría de insectos plaga, sin perturbar el balance ecológico en torno a reacciones proteolítica-inhibitoria que afectarían la homeostasis del escarabajo (Álvarez-Afageme *et al*, 2011). Sin embargo también hay que ser juicioso al tomar la decisión de seleccionar IPs en el marco de un programa de control integrado de plagas, ya que se ha probado que la incorporación de IPs a un formulado de *Bt* no es una solución del todo efectiva porque estas proteínas con actividad anti-metabólica producen un efecto transitorio / temporal en la reducción de la respuesta fisiológica de las proteasas de la broca y la habilidad que tenga el insecto de adaptarse hacia las pro-toxinas de *Bti*, por lo que también ha representado un tema controversial (Alarcón *et al*, 2001; Lomate & Hivrale, 2013; Tabashnik, 1994).

CAPÍTULO 7

Conclusiones

- Se obtuvo un extracto de intestino medio de *Hypothenemus hampei* con una masa aparente de 24,1 kDa y enriquecido en tripsín-proteinasas bioactivas en 6,5% cuando se observaron en el zimograma con gelatina al 0,1% (m/v).
- Se aislaron los inhibidores de proteinasas presentes en el extracto de harina de frijol de *Glycine max* con un bajo grado de purificación, con masas aparentes de 20,1 kDa y con actividad inhibitoria sobre el extracto de *H. hampei*.
- Las técnicas de separación bifásica y purificación en gradientes discontinuos de sacarosa permitieron obtener una suspensión de *Bti*, que presentó toxinas con las masas aparentes anticipadas para Cry3 y Cyt.
- Las proteasas solubles en el extracto de soya mostraron actividad óptima a pH alcalino de 9.0 y fueron termoestables entre 35 y 65 °C.
- La mezcla de reacción de inhibidores de proteasas de soya junto con las proteasas digestivas de intestino medio de broca manifestaron un efecto aditivo sobre el sustrato BApNA.
- El liofilizado de cristales de *Bti* resultó ser degradado tanto por tripsina de páncreas porcino como por el extracto de soya en los geles de poliacrilamida.
- Dosis incrementales del extracto de *G. max* junto con una dosis de 1,135 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ de cristales de *Bti* permitieron demostrar que hubo un efecto sinérgico que incidió sobre la supervivencia de adultos de *H. hampei* al realizar los bioensayos *in vivo*.

CAPÍTULO 8

Recomendaciones

Para afinar el nivel de purificación de las muestras extraídas para obtener únicamente el inhibidor Kunitz de tripsina de soya (SKTI), se recomienda aplicar la técnica de cromatografía de filtración en gel, aplicando una columna cromatográfica que permita fraccionar únicamente las serpinas. Esta técnica se podría complementar con la cromatografía de intercambio catiónico y HPLC en fase reversa, comparando la proteína eluida con la de un control comercial de SKTI (Berg *et al*, 2002).

Si los IPs se quisieran aplicar junto con *Bti* para potenciar el efecto sinérgico para controlar otras plagas, sería conveniente hacer pruebas *in vitro* e *in vivo*, ya que la proporción de peptidasas varía entre especies, y es probable que ciertos insectos expresen las cisteín-, aspártico- o metalo-proteinasas en mayor proporción que las serín-proteinasas (Alarcón, 2001; Tabashnik, 1994). Además, la efectividad y efecto inhibitorio entre variedades de soya es diferente entre especies de insectos porque como han descrito Major & Constabel (2008), el acervo genético que codifica a los IPs de la familia Kunitz sufre la especialización funcional. Este fenómeno fue estudiado por Oppert *et al* (2011), quienes mediante bioensayos analizaron el efecto combinatorio de toxinas Cry3Aa de *Btt* y el IP de carboxipeptidasas a 105 mg·kg⁻¹, sobre larvas de los coleópteros *Rhyzopertha dominica*, *Tribolium castaneum* y *Tenebrio molitor*; y demostraron que el 100% de mortalidad se observó sólo con *T. molitor*; mientras que en con otros individuos se obtuvieron mortalidades de 5% (*T. castaneum*) y 79% (*R. dominica*), por lo que no en todos los casos se potenció *Btt*.

Finalmente, para mejorar las características insecticidas de una mezcla de *Bt* e IP de tripsina de soya sería adecuado utilizar un acarreador como sílica o vermiculita si se trata de un formulado de contacto, o un polímero si la aplicación es por aspersión Fuchs *et al* (1991). Estas recomendaciones podrían mejorar la manipulación y la tolerancia de los cristales hacia la degradación ambiental y particularmente hacia la exposición a los rayos ultravioleta, para prevenir la pérdida de actividad tóxica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdolgader, RE. 2000. Isolation and characterization of a high gelling protein from soybean. Tesis Ph.D Filosofía. Montreal, Canadá, McGill University. 189 p.
- Aehle, W. 2007. Enzymes In Industry: Production and Applications. Catalytic activity of enzymes. 3 ed. New York, Wiley. pp: 13-33.
- Aguilera, C. 2012. Caracterización bioquímica de una endo- β -1,4-mananasa de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytinae). Tesis MSc. Ciencias-Biotecnología. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional de Colombia. 89 p.
- Aguirre, C; Valdés-Rodríguez, S; Mendoza-Hernández, G; Rojo-Domínguez, A. & Blanco-Labra, A. 2004. A novel 8.7 kDa protease inhibitor from chan seeds (*Hyptis suaveolens* L.) inhibits proteases from the larger grain borer *Prostephanus truncatus* (Coleoptera: Bostrichidae) (en línea). En: *Comparative Biochemistry and Physiology*. 138B: 81-89. Consultado el 19 set. 2012. Disponible en <http://web.cua.uam.mx/docs/CNI/profesores/archivos/275.pdf>
- Ajamhassani, M; Zibae, A; Sendi, JJ; Askary, H & Farrar, N. 2012. Proteolytic activity in the midgut of the crimson speckled moth *Utethesia pulchella* L. (Lepidoptera: Arctiidae). En: *Journal of Plant Protection Research*. 52(3): 368-373.
- Alarcón, FJ; García-Carreño, FL & Navarrete del Toro, MA. 2001. Effect of plant protease inhibitor on digestive proteases in two fish species, *Lutjanus argentiventris* and *L. novemfasciatus*. En: *Fish Physiology and Biochemistry*. 24: 179-189.
- Alberts, B; Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K & Walter, P. 2008. Molecular Biology of the Cell. Fractionation of cells and analysis of their molecules. 5 ed. United Kingdom, Taylor & Francis. Alberts, B (ed). 1601 p.
- Ali, BA; Salem, HH; Wang, XM; Huang, TH; Xie, QD & Zhang, XY. 2010. Effect of *Bacillus thugiensis* var. *israelensis* on the intermediate snail host of *Schistosoma japonicum*. En: *Current Research in Bacteriology*. 3(1): 37-41.
- Alvarez-Alfageme, F; Maharramov, J; Carrillo, L; Vandenabeele, S; Vercammen, D; Van-Breusegem, F & Smagghe, G. 2011. Potencial use of a serpin from *Arabidopsis* for pest control. En: *PLoS One*. 6(5): 1-9.
- Amorim, TML; Macedo, LLP; Uchoa, AF; Oliveira, AS; Pitanga, JCM; Macedo, FP; Santos, EA & de Sales, MP. 2008. Proteolytic digestive enzymes and peritrophic membranes during the development of *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Piralidae): targets for the action of soybean trypsin inhibitor (SBTI) and chitin-binding vicilin (EvV). En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(17): 7738-7745.

- Arias, EB. 1993. Biomoléculas. Primeros estudios sobre la estructura de las proteínas. 2 ed. Salamanca, España, Ediciones Universidad de Salamanca. v 51, 421 p.
- Azarkan, M; Dibiani, R; Goormaghtigh, E; Raussens, V & Baeyens-Volant, D. 2006. The papaya Kunitz-type trypsin inhibitor is a highly stable β -sheet glycoprotein. En: *Biochimica et Biophysica Acta*. 1764: 1063-1072.
- Bale, JS; van Lenteren, JC & Bigler, F. 2008. Biological control and sustainable food production. En: *Philosophical Transactions of The Royal Society*. 363: 761-776.
- Batista-Coelho, M; Rodrigues-Macedo, ML; Marangoni, S; Soares-da Silva, D, Cesarino, I & Mazzafera, P. 2010. Purification of leguminin-like proteins from *Coffea arabica* and *Coffea racemosa* seeds and their insecticidal properties toward cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) (Coleoptera: Bruchidae). En: *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 58: 3050-3055.
- Becker-Ritt, AB; Mulinari, R; Vasconcelos, IM & Carlini, CR. 2004. Antinutritional and/or toxic factors in soybean (*Glycine max* (L) Merrill) seeds: comparison of different cultivars adapted to the southern region of Brazil. En: *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 84: 263-270.
- Ben-Dov, E; Saxena, D; Wang, Q; Manasherob, R; Boussiba, S & Zaritsky, A. 2003. Ingested particles reduce susceptibility of insect larvae to *Bacillus thuringiensis*. En: *Journal of Applied Entomology*. 127: 146-152.
- Benavides, P; Góngora, C & Bustillo, A. 2012. Insecticides – Advances in Integrated Pest Management. IPM program to control coffee berry borer *Hypothenemus hampei*, with emphasis on highly pathogenic mixed strains of *Beauveria bassiana*, to overcome insecticide resistance in Colombia Perveen F (ed). 1 ed. Rijeka, Croacia, InTech. p. 511-540.
- Benjakul, S; Visessanguan, W & Thummaratwasik, P. 1999. Isolation and characterization of trypsin inhibitors from some Thai legume seeds. En: *Journal of Food Biochemistry*. 24: 107-127.
- Bennet, JO. 2005. Soybean seed components and affected by nodal position, environmental conditions, and irrigation. Tesis MSc. Missouri, Estados Unidos, University of Missouri. 83 p
- Berg, J; Tymoczko, J & Stryer, L. 2002. Biochemistry. The purification of proteins is an essential first step in understanding their function. 7 ed. New York, W.H. Freeman. 1054 p.
- Besler, M; Helm, RM & Ogawa, T. 2000. Allergen data collection – update: soybean (*Glycine max*). Internet Symposium of Food Allergens. Hamburgo, Alemania. 37 p.

- Bijina, B. 2006. Isolation, purification and characterization of protease inhibitor from *Moringa oleifera* LAM (en línea). Tesis Ph.D Filosofía en Biotecnología. Kerala, India, Cochin University of Science and Technology. 212 p. Consultado el 17 set. 2012. Disponible en <http://dyuthi.cusat.ac.in/xmlui/bitstream/handle/purl/2380/DyuthiT0652.pdf?sequence=1>
- Blanco-Labra, A; Martínez-Gallardo, A; Sandoval-Cardoso, L & Delano-Frier, J. 1996. Purification and characterization of a digestive cathepsin D proteinase isolated from *Tribolium castanemum* larvae (Herbst). En: *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 26(1): 95-100.
- Blaine, RL & Thomas, LC. 2012. Optimization of the freeze drying process using modulated differential scanning calorimetry. New Castle, Washington. 9 p.
- Brandon, DL; Bates, AH & Friedman, M. 2004. Immunoassays for Bowman-Birk and Kunitz soybean trypsin inhibitors in infant formula (en línea). En: *Journal of Food Science*. 69(1): 11-15. Consultado el 27 set. 2012. Disponible en <http://naldc.nal.usda.gov/download/5887/PDF>
- Brar, SK; Verma, M; Tyagi, RD; Surampalli, RY; Barnabé, S & Valéro, JR. 2007. *Bacillus thuringiensis* proteases: production and role in growth, sporulation and synergism. En: *Process Biochemistry*. 42(5): 773-790.
- Bravo, A; Gomes, I; Porta, H; García-Gómez, BI; Rodríguez-Almazan, C; Pardo, L & Soberón, M. 2012. Evolution of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins insecticidal activity. En: *Microbial Biotechnology*. 6: 17-26.
- Bravo, A y Silva-Filha, MH. 2002. Capítulo 3: Purificación de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. Libro no publicado.
- Brenes-Madriz, J; Flores-Mora, DM y Villalba-Velázquez, V. 2009. Manual de Laboratorio de Análisis y Aplicación de Sistemas de Producción Agrícola. Determinación de las texturas en muestras de suelo. 4 ed. Cartago, Costa Rica, Editorial Tecnológica. p. 5-11.
- Buarque, DS; Castro, PF; Silva-Santos, FM; Lemos, D; Carvalho-Júnior, LB & Bezerra, RS. 2009. Digestive peptidases and proteinases in the midgut gland of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* (Crustacea, Decapoda, Penaeidae). En: *Aquaculture Research*. 40: 861-870.
- Burbano, E; Wright, M; Bright, DE & Vega, FE. 2010. New record for coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Hawaii (en línea). En: *Journal of Insect Science*. 11(117): 1-3. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3281356/pdf/031.011.11701.pdf>

- Bustillo-Pradey, AE. 2005. Manejo integrado de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). En: *Revista Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 29(110): 55-68.
- Cao, S & Hu, Z. 2011. Characterization the expressed enzyme efficient hydrolysis of mannan and heteromannans in yeast (en línea). En: *Microbial & Biochemical Technology*. 3(1): 1-5. Consultado el 9 oct. 2012. Disponible en <http://www.omicsonline.org/1948-5948/JMBT-03-001.php>
- Cárdenas, S. 2007. Caracterización morfológica y agronómica de la colección núcleo de café (*Coffea arabica* L.) del CATIE) (en línea). Tesis MSc. Agr. Ecológica, Turrialba, Costa Rica, CATIE. 117 p. Consultado el 11 jun. 2012. Disponible en <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A1655E/A1655E.PDF>
- Cárdenas, MC; Marcano-Brito, RV; Giraldo, H y Aquino, A. 2007. Biología de la broca del café, *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae) bajo condiciones de campo, en el estado Táchira, Venezuela (en línea). En: *Entomotrópica*. 22(2): 49-55. Consultado el 15 jun. 2012. Disponible en <http://www.entomotropica.org/index.php/entomotropica/article/view/263/238>
- Carreras, B; Rodríguez, S; Ancheta, O; Valdés, T y Harvey, Y. 2008. La morfología de los cuerpos paraesporales y su relación con la actividad biológica en cepas cubanas de *Bacillus thugiensis*. En: *Revista del Centro Nacional de Investigaciones Científicas*. 39(2): 105-108.
- Carrillo, L. 2009. Cistatinas de cebada: proteínas de defensa contra artrópodos (en línea). Tesis Ph.D. Madrid, España, Universidad Politécnica de Madrid. 213 p. Consultado el 25 jul. 2012. Disponible en http://oa.upm.es/3003/1/LAURA_CARRILLO_GIL.pdf
- Carroll, J; Li, J & Ellar, DJ. 1989. Proteolytic processing of a coleopteran-specific δ -endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. En: *Biochemical Journal*. 261: 99-105.
- Casco-Gómez, KV. 2012. Potencial de pérdidas económicas debido a *Hypothenemus hampei*, en Pahala Hawaii y costo/beneficio de usar *Beauveria bassiana* en café. Tesis Lic. Adm. Agronegocios. Francisco Morazán, Honduras, Escuela Agrícola Panamericana. 17 p.
- Castillo-Yáñez, F.; Pacheco-Aguilar, R.; García-Carreño, F. & Navarrete-Del Toro, M. 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caceca of Monterrey sardine *Sardinops sagax caerulea*. En: *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140B: 91-98.
- Castro-Guillén, JL.; Mendiola-Olaya, E; García-Gasca, T & Blanco-Labra, A. 2012. Partial characterization of serine peptidases in larvae of *Prostephanus truncates* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae), reveals insensitive peptidases to

- some plant peptidase inhibitors. En: *Journal of Stored Products Research*. 50: 28-35.
- Chacón, R. 2008. Identificación de microorganismos endógenos en cicadélidos y endófitos asociados a la crespeta del café en el Valle Central Occidental de Costa Rica. Tesis Bach. Ing. Biotecnología. Cartago, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 187 p.
- Chapman, RF. 1998. The Insects: Structure and Function. Alimentary canal, digestion and absorption. 4 ed. Cambridge, Cambridge University Press, p. 38-68.
- Chen, CC; Shih, YC; Chiou, PWS & Yu, B. 2010. Evaluating nutritional quality of single stage- and two stage-fermented soybean meal. En: *Asian-Australian Journal of Animal Sciences*. 23(5): 598-606.
- Chen, P & Buller, CS. 1959. Activity staining of xylanases in polyacrylamide gels containing xylan. En: *Analytical Biochemistry*. 226: 186-188.
- Chow, E; Pal-Singh, GJ & Gill, SS. 1989. Binding and aggregation of the 25-kilodalton toxin of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* to cell membranes and alteration by monoclonal antibodies and amino acid modifiers. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 55(11): 2779-2788.
- Christeller, JT. 2005. Evolutionary mechanisms acting on proteinase inhibitor variability (en línea). En: *FEBS Journal*. 272: 5710-5722. Consultado el 19 set. 2012. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2005.04975.x/pdf>
- Clauss, A; Persson, M; Lilja, H & Lundwall, A. 2011. Three genes expressing Kunitz domains in the epididymis are related to genes of WFDC-type protease inhibitors and semen coagulum proteins in spite of lacking similarity between their protein products. En: *BMC Biochemistry*. 12(55): 1-13.
- Constantino, LM; Navarro, L; Berrío, A; Acevedo, FE; Rubio, D y Benavides, P. 2011. Aspectos biológicos, morfológicos y genéticos de *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). En: *Revista Colombiana de Entomología*. 37(2): 173-182.
- Correia, LC; Bocewicz, AC; Esteves, SA; Pontes, MG; Versieux, LM; Teixeira, SMR; Santoro, MM & Bemquerer, MP. 2001. The effect of organic solvents and other parameters on trypsin-catalyzed hydrolysis of N-alpha-Benzoyl-arginine-p-nitroanilide. En: *Journal of Chemical Education*. 78(11): 1535-1537.
- Cutler, P. 2004. Protein Purification Protocols. Making and changing buffers, purification and concentration by ultrafiltration, bulk purification and fractional precipitation. 2 ed. Hiedelberg, Springer. v 244, p. 91-116.

- D'Mello, J.P.F. 2000. Farm animal metabolism and nutrition. Antinutritional factors and mycotoxins. 1 ed. D'Mello, JPF (ed). Wallingford, United Kingdom, CAB International. p. 383-403.
- Damon, A. 2000. A review of the biology and control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) (en línea). En: *Bulletin of Entomological Research*. 90: 453-465. Consultado el 5 jul. 2012. Disponible en http://www.kohalacenter.org/cbbworkshop/pdf/PAPER_BiologyControlCBB.pdf
- De la Rosa, W; Figueroa, M & Ibarra, JE. 2005. Selection of *Bacillus thuringiensis* strains native to Mexico active against the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). En: *Vedalia*. 12(1): 3-9.
- De-Souza, JDA; Jain, S; de-Oliveira, CMF; Ayres, CF & Lucena, WA. 2009. Toxicity of *Bacillus thuringiensis israelensis*-like strain against *Spodoptera frugiperla*. En: *BioControl*. 54: 467-473.
- Delafield, FP; Somerville, HJ & Rittenberg, SC. 1968. Immunological homology between crystal and spore protein of *Bacillus thuringiensis*. En: *Journal of Bacteriology*. 96(3): 713-720.
- Deshimaru, M; Hanamoto, R; Kusano, C; Yoshimi, S & Terada, S. 2002. Purification and characterization of proteinase inhibitors from wild soja (*Glycine soja*) seeds. En: *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry Journal*. 66(9): 1897-1903.
- Díaz-Mendoza, MM. 2006. Proteasas digestivas de tipo tripsina del taladro del maíz, *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae): caracterización e interacción con la proteína insecticida Cry1Ab (en línea). Tesis Ph.D. Madrid, España. Universidad Politécnica de Madrid. 189 p. Consultado el 25 jul. 2012. Disponible en http://oa.upm.es/453/1/MARIA_MERCEDES_DIAZ_MENDOZA.pdf
- Díaz-Tenorio, LM; García-Carreño, FL; Navarrete del Toro, MA. 2006. Characterization and comparison of digestive proteinases of the Cortez swimming crab, *Callinectes bellicosus*, and the arched swimming crab, *Callinectes arcuatus* (en línea). En: *Invertebrate Biology*. 125(2): 125-135. Consultado el 13 ago. 2012. Disponible en <http://www.bashanfoundation.org/carreno/carrenocallinectes.pdf>
- Dorrah, MAA; Elmelegi, MKA & Bassal, TTM. 2008. Trypsin- and chymotrypsin esterase-like activity in the midgut regions of the larval *Parasarcophaga hertipes* (Sarcophagidae, Cyclorhapha, Diptera). En: *Efflatoun's Journal of Entomology*. 8:1-8.

- El-Beltagy, AE; El-Adawy, TA; Rahma, EH & El-Bedawey, AA. 2005. Purification and characterization of an alkaline protease from the viscera of boliti fish (*Tilapia nilotica*). En: *Journal of Food Biochemistry*. 29: 445-458.
- Ezquerro, JM; García-Carreño LF. 1997. Effects of feed diets on digestive proteases from the hepatopancreas of white shrimp (*Panaeus vannamei*) (en línea). En: *Journal of Food Biochemistry*. 21: 401-419. Consultado el 17 ago. 2012. Disponible en <http://www.bashanfoundation.org/carreno/carrenoezquerro.pdf>
- Fabrick, J; Behnke, C; Czaplá, T; Bala, K; Rao, AG; Kramer, KJ & Reeck, GR. 2002. Effects of a potato cysteine proteinase inhibitor on midgut proteolytic enzyme activity and growth of the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae). En: *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32: 405-415.
- Fan, S & Wu, G. 2005. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. En: *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. 46: 273-292.
- Fernández, S y Cordero, J. 2007. Biología de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae) en condiciones de laboratorio (en línea). En: *Bioagro*. 19(1): 35-40. Consultado el 27 jun. 2012. Disponible en <http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev19%281%29/5.%20Biolog%C3%ADa%20de%20la%20broca.pdf>
- Finney, DJ & Stevens, WL. 1948. A table for the calculations of working probits and weights in probit analysis. En: *Biometrika*. 35(1-2): 191-201.
- Foda, MS; El-Beih, FM; Moharam, ME & El-Gamal, NNA. 2010. Physiological formation of mosquitocidal toxin by a novel *Bacillus thuringiensis* isolate under solid state fermentation. En: *Life Science Journal*. 7(4): 145-152.
- Fluhr, R; Lampl, N & Roberts, T. 2012. Serpin protease inhibitors in plant biology. En: *Physiologia Plantarum*. 145: 95-102.
- Fuchs, RL; Kishore, GM & MacIntosh, SC. 1993. Method for improving the efficacy of insect toxins. US Patent 5.250.515. Monsanto, St. Louis, MO.
- García, DE. 2004. Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. En: *Pastos y Forrajes*. 27(1): 1-12.
- García-Carreño, FL. 1993. Protease inhibition in theory and practice. En: *Biotechnology Education*. 3(4): 145-150.
- García-Carreño, FL; Dimes, LE & Haard, NF. 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. En: *Analytical Biochemistry*. 214: 65-69.

- García-Carreño, FL & Haard, NF. 1993. Characterization of proteinase classes in langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and crayfish (*Pacifastacus astacus*) extracts. En: *Journal of Food Biochemistry*. 17: 97-113.
- García-Fernández, R; Salas, E; del Monte, A; del Rivero, MA; Guerra, Y; y Chávez, MA. Micro y nano-biotecnologías en la detección y caracterización de inhibidores de proteasas de interés biomédico. En: *Revista Cubana de Física*. 26(1): 76-82.
- Ghodke, AB; Chavan, SG; Sonawane, BV & Bharose, AA. 2012. Isolation and *in vitro* identification of proteinase inhibitors from soybean seeds inhibiting helicoverpa gut proteases. En: *Journal of Plant Interactions*. 1080(10): 1-9.
- Gholamzadeh-Chitgar, M; Ghadamyari, M & Sharifi, M. 2013. Identification and characterization of gut proteases in the fig tree skeletoniser moth, *Choreutis nemorana* Hübner (Lepidoptera: Choreutidae). En: *Plant Protection Science*. 49(1): 19-26.
- Ginsburg, C. 2006. The safety to humans of *Bacillus thuringiensis* insecticidal sprays: a reassessment (en línea). Washington, No Spray Zone. Consultado el 26 ene. 2013. Disponible en <http://www.nosprayzone.org/pesticides/NSZPaper.pdf>
- Glare, TR & O'Callaghan. 1998. Environmental and health impacts of *Bacillus thuringiensis israelensis* (en línea). New Zeland, Ministry of Health of Manatū Hauora. 13 p. Consultado el 7 feb. 2013. Disponible en <http://www.beyondpesticides.org/mosquito/documents/BacillusThuringiensisIsraelensisNZ.pdf>
- Gómes, CE; Barbosa, AE; Macedo, LL; Pitanga, JC; Moura, FT; Oliveira, AS; Moura, RM; Queiroz, AF; Macedo, FP; Andrade, LB; Vidal, MS & Sales, MP. 2005. Effect of trypsin inhibitor from *Crotalaria pallida* seeds on *Callosobruchus maculatus* (cowpea weevil) and *Ceratitis capitata* (fruit fly). En: *Plant Physiology and Biochemistry*. 43: 1095-1102.
- Goodman, NS; Gottfried, RJ & Rogoff, MH. 1967. Biphasic system for separation of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis*. En: *Journal of Bacteriology*. 94(2): 485.
- Gordon-Omondi, J. 2005. Digestive endo-proteases from the midgut glands of the Indian white shrimp, *Penaeus indicus* (Decapoda: Penaeiade) from Kenya. En: *Western Indian Ocean Journal of Marine Science*. 4(1):109-121.
- Granados, C. 2004. El impacto ambiental del café en la historia costarricense. En: *Diálogos*. 4(2): 1-41.
- Grandvalet, C; Gominet, M & Lereclus, D. 2001. Identification of genes involved in the activation of the *Bacillus thuringiensis* inhA metalloprotease gene at the

- onset of sporulation (en línea). En: *Microbiology*. 147: 1805-1813. Consultado el 25 mar. 2013. Disponible en <http://mic.sgmjournals.org/content/147/7/1805.full.pdf+html>
- Green, NM & Work, E. 1952. Pancreatic trypsin inhibitor. 2. Reaction with trypsin (en línea). En: *Biochemical Journal*. 54(2): 347-352. Consultado el 17 feb. 2013. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1268949/pdf/biochemj01097-0183.pdf>
- Guedidi, S; Portugal, CAM; Innocent, C; Janot, JM; Deratani, JA & Crespo, JG. 2012. Fluorescence monitoring of trypsin adsorption in layer-by-layer membrane systems (en línea). En: *Enzyme and Microbial Technology*. 51(6-7): 325-333. Consultado el 20 mar. 2013. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022912001299#gr2>
- Guerreiro-Filho, O & Mazzafera, P. 2003. Caffeine and resistance of coffee to the berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51(24): 6987-6991.
- Guillamón, E; Pedrosa, MM; Burano, C; Cuadrado, C; Sánchez, M de Cortés; Muzquiz, M. 2008. The trypsin inhibitors present in seed of different grain legume species and cultivar. En: *Food Chemistry*. 107: 68-74.
- Gutiérrez, G; León, J; Montoya, LA y Pérez, J. 1968. Pruebas de rendimiento de nuevas introducciones de café en Costa Rica, 1962-1967. En: *Café (Perú)*. 9(2): 12-18.
- Habib, H & Fazili, KM. 2007. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. En: *Biotechnology and Molecular Biology Review Vol. 2*. 2(3): 68-85.
- Haider, MZ & Ellar, DJ. 1987. Analysis of the molecular basis of insecticidal specificity of *Bacillus thuringiensis* crystal δ -endotoxin. En: *Biochemical Journal*. 248: 197-201.
- Harsulkar, AM; Giri, AP; Parankar, AG; Gupta, VS; Sainani, MN; Ranjekar, PK & Deshpande, VV. 1999. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. En: *Plant Physiology*. 121: 497-506.
- Hernández-Soto, A. 2002. Aislamiento y caracterización de cepas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* a partir de plantaciones de café infestadas con broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari). Tesis Bach. Ing. Biotecnología. Cartago, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 69 p.

- Hernández-Soto, A; del Rincón-Castro, MC, Espinoza, AM & Ibarra, JE. 2009. Parasporal body formation by overexpression of the Cry10a toxin of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* and its synergism with the Cyt1Aa toxin. En: Applied and Environmental Microbiology. 75(14): 4661-4667.
- Hosseininaveh, V; Bandani, A & Hosseininaveh, F. 2009. Digestive proteolytic activity in the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. En: Journal of Insect Science. 70(9): 1-11.
- Hosseininaveh, V; Bandani, A; Azmayeshfard, P; Hosseinkhani, S & Kazzazi, M. 2007. Digestive proteolytic and amyolytic activities in *Trogoderma granianum* Everts (Dermestidae: Coleoptera). En: Journal of Stored Products Research. 43: 515-522.
- Instituto del Café de Costa Rica (ICAFFE). 2011. Análisis del mercado nacional del café: distribución de la producción por cantones. Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica. San José, Costa Rica, pp: 22-25.
- Jaber, K; Haubruge, É y Francis, F. 2010. Development of entomotoxic molecules as control agents: illustration of some protein potential uses and limits of lectins (Review) (en línea). En: Biotechnology, Agronomy, Society and Environment. 14(1): 225-241. Consultado el 7 jun. 2012. Disponible en <http://www.bib.fsagx.ac.be/base/text/v14n1/225.pdf>
- Jiménez, AJ. 2009. As enzimas presentes no trato digestivo dos insetos: um alvo susceptível de inibição (en línea). Tesis Ph.D. Brasil D.F., Brasil, Universidad de Brasília. 99 p. Consultado el 17 ene. 2013. Disponible en http://repositorio.bce.unb.br/bitstream/10482/4014/1/2009_ArnubioValenciaJimenez.pdf
- Jongsma, MA & Bolter, C. 1997. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. En: Journal of Insect Physiology. 43(10): 885-895.
- Joyce, E; Phull, SS; Lorimer, JP & Mason, TJ. 2003. The development and evaluation of ultrasound for the treatment of bacterial suspensions. A study of frequency, power and sonication time on cultured *Bacillus subtilis*. En: Ultrasonics Sonochemistry. 10: 315-318.
- Kakade, ML; Simons, N & Liener, IE. 1969. An evaluation of natural vs. synthetic substrates for measuring the antitryptic activity of soybean samples. En: Cereal Chemistry. 46: 518-526.
- Kennedy, A, 1998. The Bowman-Birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. En: The American Journal of Clinical Nutrition. 68(suppl): 1406S-12S.
- Kim, DY; Ham, S; Lee, HJ; Kim, Y; Shin, D; Rhee, YH; Son, K & Park, H. 2011. A highly active endo- β -1,4-mannanase produced by *Cellulosimicrobium* sp.

- strain HY-13, a hemicellulolytic bacterium in the gut of *Eiseinia fetida*. En: Enzyme and Microbial Technology. 48: 365-370.
- Kirouac, M; Vachon, V; Quievy, D; Schwartz, JL & Laparde, R. 2005. Protease inhibitors fail to prevent pore formation by the activated *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Aa in insect brush border membrane vesicles. En: Applied and Environmental Microbiology. 72(1): 506-515.
- Klomklao, S; Benjakul, S; Kishimura, H & Chaijan, M. 2011a. 24 kDa trypsin: a predominant protease purified from the viscera of hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*). En: Food Chemistry. 129: 739-746.
- Klomklao, S; Benjakul, S; Kishimura, H & Chaijan, M. 2011b. Extraction, purification and properties of trypsin inhibitor from Thai mung bean (*Vigna radiata* (L.) R. Wilczek). En: Food Chemistry. 129: 1348-1354.
- Klug, WS; Cummings, MR y Spencer, CA. 2006. Conceptos de Genética. La proteómica identifica y analiza proteínas de una célula. 5 ed New Jersey, Prentice Hall. p. 588-592.
- Kuehl, RO. 2001. Diseño de Experimentos. Diagnóstico de concordancia entre los datos y el modelo. González-Osuna, M (trad). 2 ed. Conneticut, Thompson Learning. p. 123-147.
- Kumar, A; Galaev, IY & Mattiason, B. 2003. Isolation and Purification of Proteins. Precipitation of proteins: nonspecific and specific. Ed. Hutti-Kaul, R & Mattiason, B. CRC Press. Lund University, Sweden. 676 p.
- Kumar, S; García-Carreño, FL; Chakrabarti, R; Toro MAN & Córdova-Murueta, JH. 2007. Digestive proteases of three carps *Catla catla*, *Labeo rohita* and *Hypophthalmichthys molitrix*: partial characterization and protein hydrolysis efficiency. En: Aquaculture Nutrition. 13: 381-388.
- Kusuma, R; Theppakorn, T & Rawdkuen, S. 2009. Extraction of trypsin inhibitor from three legume seeds of the Royal Project Foundation. En: Asian Journal of Agricultural & Food Agro-Industry. 2(03): 245-254.
- Kutschbach, MS y Gutiérrez, CN. 2006. La innovación tecnológica de la agricultura costarricense, 1880-1920. En: Revista de Historia. 53-54: 99-114.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. En: Nature. 227: 680-685. Lara, L. 2005. Efectos de la altitud, sombra, producción y fertilización sobre la calidad del café (*Coffea arabica* L. var. Caturra) producido en sistemas agroforestales de la zona cafetalera Norcentral de Nicaragua. Tesis MSc. Agr. Tropical. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 106 p.

- Lagos-Giraldo, AM. 2009. Normalización de la dieta artificial y evaluación de actividad insecticida contra la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari) de extractos vegetales de plantas recolectadas en la ecorregión cafetera. Tesis Bach. Tecnólogo en Química. Pereira, Colombia, Universidad Tecnológica de Pereira. 69 p.
- Lara, L. 2005. Efectos de la altitud, sombra, producción y fertilización sobre la calidad del café (*Coffea arabica* L. var. Caturra) producido en sistemas agroforestales de la zona cafetalera Norcentral de Nicaragua. Tesis MSc. Agroforestería Tropical. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 106 p.
- Lawrence, PK & Koundal, KR. 2002. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. En: *Electronic Journal of Biotechnology*. 5(1): 1-17.
- Lecadet, MM; Blondel, MO & Ribier, J. 1980. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715 using bacteriophage CP-54Ber (en línea). En: *Journal of General Microbiology*. 121: 203-212. Consultado el 3 mar. 2013. Disponible en <http://mic.sgmjournals.org/content/121/1/203.long>
- Lenin, K; Udayasuriyan, V & Kannaiyan, S. 2007. Diversity in cry genes of *Bacillus thuringiensis*. Boletín científico NBA N° 10. National Biodiversity Authority. Tamil Nadu, India. 56 p.
- Li, YN; Meng, K; Wang, YR & Yao, B. 2006. A β -mannanase from *Bacillus subtilis* B36: purification, properties, sequencing, gene cloning and expression in *Escherichia coli*. En: *Zeitschrift für Naturforschung*. 61: 840-846.
- Li, Y; Zhao, P; Liu, S; Dong, Z; Chen, J; Xiang, Z & Xia, Q. 2012. A novel protease inhibitor in *Bombyx mori* is involved in defense against *Beauveria bassiana*. En: *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 42: 766-775.
- Liao, H; Ren, W; Kang, Z; Jiang, H; Zhao, X & Du, L. 2007. A trypsin inhibitor from *Cassia obtusifolia* seeds: isolation, characterization and activity against *Pieris rapae*. En: *Biotechnology Letters*. 29: 653-658.
- Lightwood, DJ; Ellar, DJ & Jarret, P. 2000. Role of proteolysis in determining potency of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac δ -endotoxin. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 66(12): 5174-5181.
- Lingaraju, MH & Gowda, LR. 2008. A Kunitz trypsin inhibitor of *Entada scandens* seeds: Another member with single disulfide bridge. En: *Biochimica et Biophysica Acta*. 1784: 850-855.
- Lioi, L; Galasso, I; Daminati, MG & Piergiovanni, AR. 2009. inhibitory properties and binding loop polymorphism in Bowman-Birk inhibitors from *Phaseolus* species. En: *Genetic Resources and Crop Evolution*. 57: 533-542.

- Liu, C; Adams, LF; Lufburrow, PA; Thomas, MD & Califf, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* strains active against lepidopteran and coleopteran pests. United States Patent US 5 770 431. Abbott Laboratories, Abbott Park, IL.
- Lomate, PR & Hivrale, VK. 2011. Differential responses of midgut soluble aminopeptidases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host and non-host plant diets. En: *Arthropod-Plant Interactions*. 5: 359-368.
- Lomate, PR & Hivrale, VK. 2013. Effect of *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1Ac toxin and protease inhibitor on growth and development of *Helicoverpa armigera* (Hübner). En: *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 105(2): 77-83.
- Lončar, N; Božić, N; Nenadović, V; Ivanović, J & Vujčić, Z. 2009. Characterization of trypsin-like enzymes from the midgut of *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. En: *Archives of Biological Sciences*. 61(4): 713-718.
- López, SA. 2011. Actividad biológica de proteínas Cry recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de primer instar de *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). Tesis Ph.D. Ciencias Biológicas. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional de Colombia. 97 p.
- López-Bravo, DF. 2010. Efecto de la carga frutífera sobre la roya (*Hemileia vastatrix*) del café, bajo condiciones microclimáticas del sol y sombra, en Turrialba, Costa Rica. Tesis MSc. Agroforestería Tropical. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 117 p.
- López-Pazos, SA; Cortázar-Gómez, JE & Cerón-Salamanca, JA. 2009. Cry1B and Cry3A are active against *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). En: *Journal of Invertebrate Pathology*. 101(3): 242-245.
- López-Pazos, S y Cerón, J. 2010. Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con coleópteros (en línea). En: *Nova-Publicación Científica*. 8(14): 121-240.
- Lovic, I. 2012. New Perspectives in Plant Protection. Plant proteinaceous α -amylases and proteinase inhibitors and their use in insect pest control. Bandani, AR (ed). 1 ed. Rijeka, Croacia, InTech. p. 229-246.
- Ludwig, E; Lipke, U; Raczek, U & Jäger, A. 2000. Investigations of peptides and proteases in green coffee beans. En: *European Food Research and Technology*. 211: 111-116.
- Mabrouk, M. & Ahwany, A. 2008. Production of β -mannanase by *Bacillus amylolequifaciens* 10A1 cultured on potato peels. En: *African Journal of Biotechnology*: 7(8): 1123-1128.

- Macedo, ML & Machado, M. 2011. Insect digestive enzymes as target for pest control (en línea). En: *Invertebrate Survival Journal*. 8: 190-198. Consultado el 9 jun. 2012. Disponible en <http://www.isj.unimo.it/articoli/ISJ247.pdf>
- Macedo, MLR; Freire, M das Graças; Kubo, CEG; Parra, JRP. 2011. Bioinsecticidal activity of *Talisia esculenta* reserve protein on growth and serine digestive enzymes during larval development of *Anticarsia gemmatalis*. En: *Comparative Biochemistry and Physiology*. 153C: 24-33.
- Macgregor, JM. 2001. Alimentary tract proteinases of the Southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*) and the potential of potato Kunitz proteinase inhibitors for larval control. Ph.D Filosofía. Durham, England, Durham University. 270 p.
- MacIntosh, SC; Kishore, GM; Perlak, FJ; Marrone, PG; Stone, TB; Sims, SR & Fuchs, RL. 1990. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 38(4): 1145-1151.
- McLennan, AG. 2012. Practical Biochemistry for Medical Students. Digestive enzymes, specificity and pH (en línea). 3 ed. Liverpool, Inglaterra, Liverpool University Press, p. 24-36. Consultado el 8 abr. 2013. Disponible en http://www.liv.ac.uk/~agmclen/Medpracs/practical_3/practical_3.pdf
- Madriz-Ordeñana, K; Peraza-Moraga, J y Rivas-Solano, O. 2011. Manual de Laboratorio de Biología Molecular. Extracción de proteínas a partir de muestras maceradas y análisis electroforético en geles de acrilamida. 5 ed. Cartago, Costa Rica, Editorial Tecnológica, p. 25-29.
- Major, IT & Constabel, CP. 2008. Functional analysis of the Kunitz trypsin inhibitor family in poplar reveals biochemical diversity and multiplicity in defense against herbivores (en línea). En: *Plant Physiology*. 146(3): 888-903. Consultado el 9 oct. 2012. Disponible en <http://www.plantphysiol.org/content/146/3/888.full.pdf+html>
- Martínez-Ramírez, AC y Real, MD. 1996. Proteolytic processing of *Bacillus thuringiensis* CryIII toxin and specific binding to brush border membrane vesicles of *Leptinotarsa decemlineata* (Colorado potato beetle) (en línea). *Pesticide Biochemical Physiology*. 54(2): 115-122. Consultado el 13 feb. 2013. Disponible en <http://openagricola.nal.usda.gov/Record/IND20517475>
- Merlo-Caballero, ME. 2007. Comportamiento productivo del café (*Coffea arabica* var. caturra), el poró (*Erythrina poeppigiana*), el amarillón (*Terminalia amazonia*) y el cashá (*Chloroleucon eurycyclum*) en sistemas agroforestales bajo manejos convencionales y orgánicos en Turrialba, Costa Rica. Tesis MSc. Agroforestería Forestal. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 92 p.

- Messing, RH. 2012. The coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) invades Hawaii: preliminary investigations on trap response and alternate hosts. En: *Insects*. 3: 640-652.
- Meza-Gutiérrez, GI. 2005. Soya como cobertura en el cultivo de yuca bajo el sistema de labranza reducida (en línea). Tesis Lic. Ing. Agroindustrial. Guácimo, Limón, EARTH. 68 p. Consultado el 1 nov. 2012. Disponible en <http://usi.earth.ac.cr/glas/sp/dpg/200550.pdf>
- Miller, DJ. 2004. Sydney Ringer; physiological saline, calcium and the contraction of the heart. En: *Journal of Physiology*. 555(3): 585-587.
- Molina, D. (2010). Aislamiento, purificación y caracterización de un inhibidor de aspártico proteasa vegetal específico contra las aspártico proteasas de la broca del café (en línea). Tesis Ph.D. Ciencias-Química. Bogotá, Colombia, Universidad Nacional de Colombia. 189 p.
- Molina, D; Blanco-Labra, A y Zamora, H. 2011. Inhibidores de proteasas de plantas efectivos contra las aspártico proteasas de *Hypothenemus hampei*. En: *Revista Colombiana de Entomología*. 37(2): 183-191.
- Montgomery, DC & Runger, GC. 2010. Applied Statistics and Probability for Engineers. Design and analysis of single-factor experiments: the analysis of variance. 5 ed. NY, Wiley, pp: 468-498.
- Mora, N. 2008. Generalidades de la actividad. Agrocadena de Café. San José, Costa Rica, Ministerio de Agricultura y Ganadería. 49 p.
- Mora, R; Ibarra, JE & Espinoza AM. 2007. A reliable bioassay procedure to evaluate *per os* toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains against the rice delphacid, *Tagosodes orizicolus* (Homoptera: Delphacidae). En: *Revista Biología Tropical*. 55(2): 373-383.
- Muñoz, FE. 2011. Aislamiento y purificación de los inhibidores de tripsina presentes en semillas de leguminosas o gramíneas producidas en el Ecuador. Tesis Ing Agroindustrial. Quito, Ecuador, Escuela Politécnica Nacional. 115 p.
- Nack-Shick, C; Ki-Hyun, Y; Kab-Seog, T; Pil JM & Seung-Ho, K. 2004. Nano-scale proteomics approach using two-dimensional fibrin zymography combined with fluorescent SYPRO ruby dye. En: *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 37(3): 298-303.
- Nagy, A.; Trexler, M. & Patthy, L. 2003. Expression, purification and characterization of the second Kunitz-type protease inhibitor domain of the human WFIKKN protein. En: *European Journal of Biochemistry*. 270: 2101-2107.

- National Center for Biotechnology Information (NCBI). 1992. Cn3D macromolecular structure viewer (en línea). Maryland, US. Consultado 21 jun. 2012.
- Nokkala, S & Nokkala, C. 2004. *Drosophila* Cytogenetics Protocols. Cytological Analysis of Oogenesis Henderson, D. (ed). 1 ed. New York, Humana Press. v 247, p. 129-138.
- Ochoa, C. 2011. Análisis de las interacciones moleculares de la toxina Cry3 de *Bacillus thuringiensis* en la membrana del epitelio intestinal de *Leptinotarsa decemlineata* (Escarabajo de la patata). Tesis Ph.D. Valencia, España, Universitat de Valencia. 205 p.
- Ochoa, G y Arrivillaga, J. 2009. *Bacillus thuringiensis*: avances y perspectivas en el control biológico de *Aedes aegypti*. En: *Malariología y Salud Ambiental*. 64(2): 181-191.
- Oliveira, AS; Migliolo, L; Aquino, RO; Ribeiro, JKC; Macedo, LLP; Andrade, LBS; Bemquerer, MP; Santos, EA; Kiyota, S & Sales, MC. 2007. Identification of a Kunitz-type proteinase inhibitor from *Pithecellobium dumosum* seeds with insecticidal properties and double activity. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 7342-7349.
- Oppert, B. 1999. Protease interactions with *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins. En: *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 42: 1-12.
- Oppert, B. 2005. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). En: *Comparative Biochemistry and Physiology*. 140C: 53-58.
- Oppert, B; Morgan, TD & Kramer, KJ. 2011. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa protoxin and protease inhibitors against coleopteran storage pests. En: *Pest Management Science*. 67: 568-573.
- Oppert, B; Walters, P & Zuercher, M. 2006. Digestive proteinases of the larger black flour beetle, *Cynaesus angustus* (Coleoptera: Tenebrionidae). En: *Bulletin of Entomological Research*. 96: 167-172.
- Oviedo, AV. 2006. Evaluación de la incorporación de diferentes fungicidas y dosis en dietas artificiales para la reproducción de la broca de café con miras a la multiplicación de sus parasitoides bajo condiciones controladas. Tesis Bach. Biotec. Cartago, Costa Rica, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 102 p.
- Özgür, E. 2006. Identification and characterization of hydrolytic enzymes of Sunn pest (*Eurygaster integriceps*) and cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). Tesis Ph.D. Ankara, Turquía, Middle East Technical University. 137 p.
- Pan, D; Hill, AP; Kashou, A; Wilson, KA & Tan-Wilson, A. 2011. Electrophoretic transfer protein zymography. En: *Analytical Biochemistry*. 411: 277-283.

- Panchal, BM & Kachole, MS. 2012. Identification of potent inhibitors of *Chilo partellus* (Swinhoe) (Lepidoptera: Pyralidae) gut proteinase from plant gum PIs. En: *International Journal of Science and Technology*. 1(12): 662-670.
- Parde, VD. 2009. Inhibition of *Helicoverpa armigera* gut zymogen activation by plant protease inhibitors. Tesis Ph.D Bioquímica. Maharashtra, India, Dr. Babasaheb Ambedkar Marathwada University. 212 p.
- Pereira, R; Valencia-Jiménez, A; Magalhaes, C; Prates, M; Melo, J; de Lima.; L; Sales, M de; Tempel, E; Silva, M da. & Grossi-de-Sá, M. 2007. Effect of a Bowman-Birk proteinase inhibitor from *Phaseolus coccineus* on *Hypothenemus hampei* gut proteinases *in vitro* (en línea). En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55(26): 10714-10719. Consultado el 14 dic. 2012. Disponible en <http://www.fulbright.edu.co/fb/library/files/05.pdf>
- Pérez, JJ; Wicki, GA; Moyano, FJ y Alarcón, FJ. 2003. Evaluación del efecto de inhibidores de proteasa presentes en ingredientes vegetales utilizables en piensos para dos especies piscícolas cultivadas en Argentina, Pacó (*Piaractus mesopotamicus*) y Pejerrey (*Odontesthes bonaeriensis*). II Congreso Iberoamericano Virtual de Acuicultura. Corrientes, Argentina, pp- 442-454.
- Peterson, R.; Grinyer, J.; Joss, J.; Khan, A. & Nevalainen, H. 2009. Fungal proteins with mannanase activity identified from a red Congo stained zymogram by mass spectroscopy. En: *Journal of Microbiological Methods*. 79: 374-377.
- Phillips, W. 2001. Mejoramiento genético y conservación de cultivos agrícolas y especies forestales. Semana Científica del CATIE. Turrialba, Cartago, Costa Rica. pp: 1-10.
- Pichaikannu, S. 2005. The effect of cations on trypsin kinetics using [DL-]BAPNA as the substrate. Tesis MSc. California, United States, San Jose State University. 86 p.
- Porras-Venegas, CM. 2006. Efecto de los sistemas agroforestales de café orgánico y convencional sobre las características de suelos en el Corredor Biológico Turrialba-Jiménez, Costa Rica. Tesis MSc. Agricultura Ecológica. 150 p.
- Poveda, M; Soriano, J y Villalba, D. 2006. Evaluación de la eficacia del insecticida Rimon 10 EC para el control de la broca del café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari). Memorias XXXIII Congreso de Entomología. Manizales, Colombia. pp: 102-111.
- Prabhakar, S. 2006. Molecular characterization of digestive proteases of yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. Tesis Ph.D Filosofía en Entomología. Kansas, United States, Kansas University. 160 p.

- Prasad, ER; 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 pests. En: *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 98: 80-88.
- Preciado-Rodríguez, DP; Bustillo-Pardey, AE y Valencia-Jiménez, A. 2000. Caracterización de parcial de una proteinasa digestiva proveniente de la broca del café (Coleoptera: Scolytidae). En: *Cenicafé*. 51(1): 20-27
- Rajesh, RK; Manjunatha, HB & Aparna, HS. 2011. Altered protease activity due to heat shock in the whole organism *Bombyx mori* L. En: *African Journal of Biochemistry Research*. 5(7): 206-213.
- Rajguru, M & Sharma, AN. 2012. Comparative efficiency of plant extracts alone and in combination with *Bacillus thuringiensis* sub sp. *kurstaki* against *Spodoptera litura* Fab. larvae. En: *Journal of Biopesticides*. 5(1): 81-86.
- Rajoka, MI; Jalal, F & Bukhari, SA. 2012. Enhanced sporulation and toxin production by a mutant derivative of *Bacillus thuringiensis*. En: *African Journal of Biotechnology*. 11(100): 16607-16614.
- Ramalho-de-Oliveira, CF; Vasconcelos, IM; Aparicio, R; Machado-Freire, M das Garças; Baldasso, PA; Marangoni, S & Rodríguez-Macedo, ML. 2012. Purification and biochemical properties of a Kunitz-type trypsin inhibitor from *Entada acaciifolia* (Benth.) seeds. En: *Process Biochemistry*. 47: 929-935.
- Ramírez-Lepe, M & Ramírez-Suero, M. 2012. Insecticides – Pest Engineering: Biological control of mosquito larvae by *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis*. Ed. F Perveen. 1^a ed. Rijeka, Croacia, InTech. p. 239-264.
- Rammannagari, M; Chandra, S; Lee, T; Park, I; Zhou, Y; Kim, K & Choi, YL. 2011. Isolation, purification and characterization of a thermostable β -mannanase from *Paenibacillus* sp. DZ3. En: *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 54(3): 325-331.
- Rashed, NA; MacDonald, MH & Matthews, BF. 2008. Protease inhibitor expression in soybean roots exhibiting susceptible and resistant interactions with soybean cyst nematode. En: *Journal of Nematology*. 40(2): 138-146.
- Renjifo, A. 1992. Ensayos sobre Economía Cafetera. El café en Costa Rica. Bogotá, Colombia, Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. 5(7): 29-77.
- Reza, H; Javadi, T & Nazari, F. 2011. Isolation and characterization of trypsin inhibitors (Kunitz Soybean Trypsin Inhibitor, Bowman-Birk Inhibitor) in soybean. En: *Advances in Environmental Biology*. 5(1): 145-153.

- Roberts, TH & Hejgaard, J. 2008. Serpins in plants and green algae. En: *Functional & Integrative Genomics*. 8: 1-27.
- Rodríguez-Macedo, ML; Machado-Freire, M das Garças; Franco, OL; Migliolo, L & Ramalho-de-Oliveira, CF. 2011. Practical and theoretical characterization of *Inga lauriana* Kunitz inhibitor on the control of *Homolinotus coriaceus*. En: *Comparative Biochemistry and Physiology*. 158B: 164-172.
- Rodríguez, L; Borrás, O; Téllez, P; Morán, I; Ponce, M; Fernández, Y & Ayra, C. 2011. Identification of a new trypsin from *Spodoptera frugiperda* involved in a defensive mechanism against the *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca1 toxin. En: *Biotecnología Aplicada*. 28(3): 176-179.
- Rojas, M. 2012. Manejo sostenible de la broca del café (*Hypothenemus hampei*) mediante poda sistemática del cafeto en Costa Rica. En: *Agronomía Costarricense*. 36(2): 71-79.
- Roosta, HR; Javadi, T & Nazari, F. 2011. Isolation and characterization of trypsin inhibitors (Kunitz Soybean Trypsin Inhibitor, Bowman-Birk Inhibitor) in soybean. En: *Advances in Environmental Biology*. 5(1): 145-153.
- Rose, J & Acuña, R. 2009. United State Patent Application Publication: Beta-mannanase from coffee borer *Hypothenemus hampei*, and uses thereof. US Patente 0117614 A1. Cornell Research Foundation Inc., Ithaca, NY.
- Rubio, JD; Bustillo, AE; Vallejo, LF; Acuña, JR & Benavides, P. 2008. Alimentary canal and reproductive tract of *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae, Scolytinae). En: *Neotropical Entomology*. 37(2): 143-151.
- Saadati, F & Bandani, AR. 2005. Effects of serine protease inhibitors on growth and development and digestive serine proteinases of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* (en línea). En: *Journal of Insect Science*. 11(72): 1-12. Consultado el 5 jun. 2012. Disponible en <http://www.insectscience.org/11.72/i1536-2442-11-72.pdf>
- Saadati, F; Bandani, AR & Moslemi, A. 2011. Effect of plant seed protein extract on the Sunn pest, *Eurygaster integriceps* Puton, growth and development and its gut serine protease activity. *African Journal of Biotechnology*. 10(55): 11502-11510.
- Sáenz-de-Rodrigáñez, M; Alarcón, FJ; Martínez, MI; Ruiz, F. Díaz, M y Moyano, FJ. 2005. Caracterización de proteasas digestivas de lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858. En: *Instituto Español de Oceanografía*. 21(1-4): 95-104.

- Sanahuja, G; Banakar, R; Twyman, R; Capell, T & Christou, P. 2011. *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. En: *Plant Biotechnology Journal*. 9: 283-300.
- Sauka, DH y Benintende, GB. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. En: *Revista Argentina de Microbiología*. 40: 124-140.
- Schwingel, WR & Bates, DW. 1996. Use of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis to measure degradation of soluble soybean proteins by *Prevotella ruminicola* GA33 or mixed ruminal microbes *in vitro*. En: *Journal of Animal Science*. 74: 475-482.
- Shamin, Md; Khan, NA & Singh, KN. 2011. Inhibition of midgut protease of yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*) by cysteine protease-like inhibitor from mature jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed (en línea). En: *Acta Physiologiae Plantarum*. 33: 2249-2257. Consultado el 19 jun. 2012. Disponible en <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11738-011-0764-2?LI=true>
- Sharifi, M; Gholamzadeh, M; Ghadamyari, M & Ajamhasani, M. 2012. Identification and characterization of midgut digestives proteases from the rosaceous branch borer, *Osphrantheria coerulescens* redtenbacher (Coleptera: Cerambycidae). En: *Romanian Journal of Biochemistry*. 49(1): 33-47.
- Shekhar-Bhol, C. 2012. Isolation and characterization of soybean (*Glycine max*) lectin. Tesis MSc. Ciencias de la Vida. Orissa, India, National Institute of Technology, Rourkela (NITR). 43 p.
- Shilpa-Shateesh, L & Murugan, K. 2012. Protease inhibitors from *Coccinia grandis* (L.) Voigt. leaves: purification, characterization and kinetic properties. En: *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4(1): 565-573.
- Sigma-Aldrich, US. 2008. Life Science Home, Metabolomics (en línea). Missouri, US. Consultado el 21 jun. 2012. Disponible en <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/trypsin/trypsin-inhibitors.html>
- Silva, WD; Mascarin, GM; Romagnoli, EM & Simões-Bento, JM. 2012. Mating behavior of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae: Scolytinae). En: *Journal of Insect Behavior*. 25: 408-417.
- Soetan, KO & Oyewole, OE. 2009. The need for adequate processing to reduce the anti-nutritional factors in plants used as human foods and animal feeds: a review. En: *African Journal of Food Science*. 3(9): 223-232.

- Song, J.M.; Nam, K.; Kang, S.G.; Kim, C.; Kwon, S. & Lee, Y. 2008. Molecular cloning and characterization of a novel cold-active β -1,4-D-mannanase from the Antarctic springtail *Cryptopygus antarticus*. En: *Comparative Biochemistry and Physiology*. 151B: 32-40.
- Spectra/Por®. 2011. Standard grade regenerated cellulose dialysis membrane (Spectra/Por® 1-5, 6 & 7) (en línea). Consultado el 15 ago. 2012. Disponible en <http://www.spectrumlabs.com/lit/420x10116x000.pdf>.
- Sriket, C; Benjakul, S; Visessanguan, W & Hara, K. 2011. Effect of legume seed extracts on the inhibition of proteolytic activity and muscle degradation of fresh water prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). *Food Chemistry*. 129: 1093-1099.
- Stålbrand, H. 2002. Handbook of Food Enzymology. Enzymology of endo-1,4- β -mannanases. Ed. Whitaker J; Voragen A and Wong, D. CRC Press. Lund University, Sweden. p. 75-83.
- Stauffer, CE. 1990. Measuring trypsin inhibitor in soy meal: suggested improvements in the standard methods. En: *Cereal Chemistry*. 67(3): 296-302.
- Subramaniam, J; Murugan, K & Kovedan, K. 2012. Larvicidal and pupicidal efficacy of *Momordica charantia* leaf extract and bacterial insecticide, *Bacillus thuringiensis* against malarial vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). En: *Journal of Biopesticides*. 5: 163-169.
- Subramanian, S & Smith, DL. 2013. A Comprehensive Survey of International Soybean Research - Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen Relationships. A Proteomics Approach to Study Soybean and Its Symbiont Bradyrhizobium japonicum – A Review. Ed. J. Board. 3^a ed. Rijeka Croacia, InTech. p. 3-30.
- Swiecicka, I; Bideshi, DK; Federici, BA. 2008. Novel isolate of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* that produces a quasicuboidal crystal of Cry1Ab21 toxic to larvae of *Trichoplusia ni*. En: *Applied and Environmental Microbiology*. 74(4): 923-930.
- Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). 2007. ExPASy ProtParam (en línea). Geneva, Switzerland. Consultado el 21 jun. 2012. Disponible en <http://web.expasy.org/protparam/>
- Tabashnik, BE. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. En: *Annual Reviews of Entomology*. 39: 47-79.
- Tabatabaei, PR; Hosseinaveh, V; Goldasaz, SH & Talebi, K. 2011. Biochemical characterization of digestive proteases and carbohydrates of the carob moth,

- Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae). En: *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 14: 187-194.
- Takeda, N.; Hirasawa, K.; Uchimura, K., Nogi, Y.; Hatada, Y.; Usami, R.; Yoshida, Y.; Grant, W.; Ito, S. & Horikoshi, K. 2004. Purification and enzymatic properties of a highly alkaline mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. strain JAMB-750 (en línea). En: *International Journal of Biological Macromolecules*. 4(2): 67-74. Consultado el 6 dic. 2012. Disponible en http://www.jsb.gr.jp/jbm/2004/0402_3.pdf
- Terra, WR & Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties compartmentalization and function. En: *Comparative and Biochemical Physiology*. 109B: 1-62
- Tilquin, M; Paris, M; Reynaud, S; Despres, L; Ravanel, Geremia, RA & Gury, J. 2008. Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* (*Bti*) in mosquito natural habitats. En: *PloS One*. 3(10): e3432.
- Vaca, DF. 2007. Utilización de proteasa para la asimilación de la torta de soya en la cría y engorde de pollos. Tesis Ing. Riobamba, Ecuador, Escuela Superior Técnica de Chimborazo. 133 p.
- Valencia, A y Arboleda, JW. 2005. Digestion of the inhibition α AI by *Hypothenemus hampei* aspartic proteinases. En: *Revista Colombiana de Entomología*. 31(2): 117-121.
- Van-Hau, P & Benjakul, S. 2006. Purification and characterization of trypsin from pyloric caeca of bigeye snapper (*Priganthus macracanthus*) (en línea). En: *Journal of Food Biochemistry*. 30: 478-495. Consultado el 28 set. 2012. Disponible en <http://www.ctu.edu.vn/institutes/biotech/5.pdf>
- Vargas, J. 2006. Vocacionamiento Científico y Tecnológico. Metodología de extracción y purificación de inhibidores de proteasas en *Opuntia streptacantha*. *Ide@s Conciteg*. 1(13): 30-35.
- Vázquez-Pineda, A; Bravo-de-la-Parra, A; Mendoza-de-Gives, P; Liébano-Hernández, E; Hernández-Linares, I; Yáñez-Pérez, N; Aguilar-Marcelino, L; Ramírez-Vargas, G; Hernández-Castro, E; Gutiérrez-Segura, I & López-Arellano, ME. 2012. Uso de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en nematodos de importancia veterinaria. Revisión. En: *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 3(1): 77-88.
- Vega, FE; Infante, F; Castillo, A & Jaramillo, J. 2009. The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions (en línea). En: *Terrestrial Arthropod Reviews*. 2: 129-147. Consultado el 5 jul. 2012. Disponible en http://dev.ico.org/event_pdfs/cbb/presentations/vega_review.pdf

- Vidal-Quist, JC. 2010. Estrategias para la utilización de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* (Berliner) en el control de *Ceratitis capitata* (Wiedemann). Tesis Ph.D Ing. Agronomía. Valencia, España, Universidad Politécnica de Valencia. 261 p.
- Vorlová, L. 2011. Soybean and Health. Important minor soybean proteins: soybean allergens and enzyme inhibitors. El-Shemy, H (ed). 1 ed. Brno, República Checa. p. 425-432.
- Weiner, BA. 1978. Isolation and partial characterization of the parasporal body of *Bacillus papillae*. En: *Canadian Journal of Microbiology*. 24: 1557-1561.
- Wilkesman, J. & Kurz, L. 2009. Protease analysis by zymography: a review on techniques and patents (en línea). En: *Recent Patents on Biotechnology*. 3: 175-184. Consultado el 13 ago. 2012. Disponible en <http://wenku.baidu.com/view/e55c7a49852458fb770b5695.html>
- Wilson, KA; Rightmire, BR; Chen, JC & Tan-Wilson, AL. 1986. Differential proteolysis of glycinin and β -conglycinin polypeptides during soybean germination and seedling growth. En: *Plant Physiology*. 82: 71-76.
- Yamamoto, T; & Iizuka, T. 1983. Two types of entomocidal toxins in the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. En: *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 227:233-241.
- Yang, L; Fang, Z; Dicke, M; van Loon, JJA & Jongsma, MA. 2009. The diamondback moth, *Plutella xylostella*, specifically inactivates mustard trypsin inhibitor 2 (MTI2) to overcome host plant defense. En: *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 39: 55-61.
- Zhu, YC; Abel, CA & Chen, MS. 2007. Interaction of Cry1Ac toxin (*Bacillus thuringiensis*) and proteinase inhibitors on the growth, development, and midgut proteinase activities of the bollworm, *Helicoverpa zea*. En: *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 87: 39-46.
- Zibae, I; Bandani, AR; Sendi, JJ; Talaei-Hassanloei, R & Kouchaki, B. 2010. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and medicinal plants on *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae). En: *Invertebrate Survival Journal*. 7: 251-261.