

República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) (21) **PI 0605293-2 A**



(22) Data de Depósito: 12/12/2006  
(43) Data de Publicação: **05/08/2008**  
(RPI 1961)

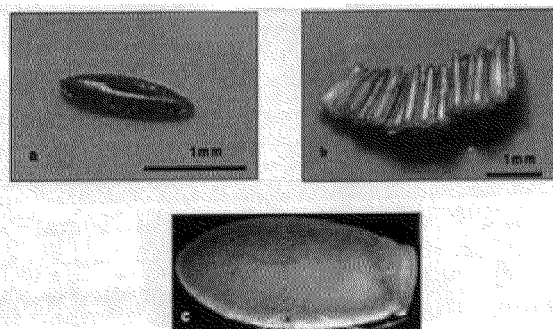
**(51) Int. Cl.:**  
**C07K 1/26 (2008.04)**  
**C07K 1/16 (2008.04)**  
**C12N 15/31 (2008.04)**  
**A61K 38/17 (2008.04)**  
**C07K 14/435 (2008.04)**

**(54) Título: COMPOSIÇÕES MICROBICIDAS, PROCESSOS PARA SUA OBTENÇÃO, CONSTRUÇÕES GÊNICAS, PROCESSOS PARA O CONTROLE DE PESTES**

**(71) Depositante(s):** Universidade Federal do Rio de Janeiro (BR/RJ)

**(72) Inventor(es):** Hatisaburo Masuda, Ana Claudia do Amaral Melo, Denise Marie Delgado Bouts, Adriana Lyn Hunter Andrade, Adriano Penha Furtado, Mário Alberto Cardoso da Silva Neto, Gabriela de Oliveira Paiva e Silva, Eduardo Corrêa Martins de Aguiar, Lillian Soares da Cunha Gomes, Sonia Rozental, Narcisa Leal da Cunha e Silva, Eleonora Kurtenbach, Edilene Oliveira da Silva, Marcos Henrique Ferreira Sorgine, Wanderley de Souza

**(57) Resumo:** Composições Microbicidas, Processos para sua Obtenção, Construções Gênicas, Processos para Controle de Pestes. A presente invenção é relacionada a fatores antimicrobianos extraídos de envoltórios protetores (cascas) de ovos de insetos. A maioria destes fatores compreende peptídeos e/ou proteínas obtidas de tais involuntários e/ou de seus respectivos genes codificantes, em construções gênicas artificiais. São descritas composições microbicidas e processos para sua obtenção, bem como construções gênicas e processos para o controle de pestes.



## **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

Composições Microbicidas, Processos para sua Obtenção, Construções Gênicas, Processos para o Controle de Pestes.

### 5 **Campo da Invenção**

A presente invenção é relacionada a composições microbicidas e a processos para sua obtenção, bem como a construções gênicas e a processos para o controle de pestes. Mais especificamente, as composições microbicidas da presente invenção compreendem peptídeos e/ou proteínas do envoltório protetor de ovos de insetos, cuja obtenção pode ser feita a partir da extração dos ovos de insetos e/ou a partir de técnicas modernas de biologia molecular, através de construções gênicas não naturais.

### **Antecedentes da Invenção**

15 A classe *Insecta* é aceita como o grupo mais diversificado do reino animal. A sua onipresença em todos os ambientes e, sua capacidade de viver em grupos numerosos e em ambientes muitas vezes bastante úmidos e ricos em outras formas de vida sugere que eles desenvolveram um sistema de defesa eficaz contra microrganismos.

20 Além das características reprodutivas, um outro fator que certamente contribuiu para o sucesso evolutivo dos insetos, foi à capacidade de se defender dos ataques de patógenos, através de um sistema imune simples, mas bastante funcional, pois consegue eliminar o agente invasor com eficiência e rapidez.

25 No aspecto reprodutivo, o embrião dos insetos está isolado do meio externo por um envoltório protetor, a casca do ovo, também denominada de córion. Este envoltório protetor é secretado pelas células do epitélio folicular do ovário no final da vitelogenese. Basicamente, o envoltório protetor ou córion se apresenta constituído por duas camadas: o endocórion e o exocórion. Estas camadas, dependendo da espécie, encontram-se subdivididas. Através de  
30 microscopia eletrônica de transmissão foi observada em *Drosophila virillis* mais

uma camada, além do endo e do exocóron, a membrana vitelínica. Esta camada é produzida pelo próprio embrião e, por muito tempo foi descrita erroneamente como endocóron. Atualmente, se convencionou denominar de córon propriamente dito as camadas produzidas pelas células foliculares do ovário.

As funções do envoltório protetor ou córon envolvem: (1) a proteção do embrião contra danos físicos e a desidratação; (2) permitir que o ovo flutue em ambiente aquoso; (3) proporcionar as trocas gasosas e a penetração do esperma.

Em 1997, foi descrita a existência de um peptídeo hidrofílico (ceratotoxina – 3 kDa), com atividade antibacteriana tipo lisozima, presente no exocóron da mosca de frutas *Ceratitis capitata*. Nesse estudo, demonstrou-se que este peptídeo era produzido pela glândula acessória, que faz parte do aparelho reprodutor feminino desta mosca. A função da glândula acessória seria o de secretar peptídeos antimicrobianos capazes de proteger o trato genital das fêmeas contra infecções bacterianas. Durante a passagem dos ovos pelo oviduto, estes peptídeos se associariam ao exocóron (casca do ovo) e protegeriam o embrião contra o ataque de microorganismos. Como característica de sua biologia a fase de larva desta mosca se desenvolve em frutas em decomposição. Foi proposto então que estes peptídeos presentes no envoltório protetor dos ovos se difundiriam para o substrato de oviposição (frutas muito maduras). Os peptídeos seriam liberados pela casca do ovo, lentamente, acompanhando a decomposição da fruta. A larva de primeiro estágio ao eclodir teria uma área isenta de microorganismos, podendo se alimentar sem correr o risco de ingerir patógenos que poderiam inviabilizar seu desenvolvimento até a fase adulta.

Em 2001, foi demonstrada a presença de dois peptídeos antimicrobianos (termicina e espinigerina) na saliva do cupim *Pseudacanthotermes spiniger*. Esses peptídeos estariam associados ao envoltório protetor dos ovos (casca) e estariam envolvidos na proteção do embrião. Esta hipótese se baseou na

observação de que esta espécie utilizava a saliva para fixar seus ovos no substrato de oviposição.

Nosso grupo vem trabalhando desde 1998 no estudo de agentes antimicrobianos presentes no envoltório protetor (casca) de ovos de insetos hematófagos, em especial, mosquitos da família Culicidae como *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae*, *Culex sp* e, barbeiros da família Reduviidae, em especial, *Rhodnius prolixus*. Os resultados indicam a presença de substâncias solúveis, facilmente extraídas com água, na casca dos ovos de mosquitos e que apresentam atividade antifúngica. Também podemos evidenciar que o extrato bruto de cascas de ovos de mosquito é capaz de retardar o desenvolvimento de fungos como *Aspergillus niger* e *Penicillium sp*. Baseados nestes achados estendemos nossos estudos para o triatomíneo *Rhodnius prolixus*.

Todos os artigos e patentes relacionados a esta invenção relatam proteínas e/ou peptídeos antimicrobianos extraídos da hemolinfa de insetos adultos ou formas de vida imaturas (larvas). A presente invenção descreve, pela primeira vez, a presença de fatores antimicrobianos, em especial antifúngicos, presentes no envoltório protetor (casca) de ovos de insetos hematófagos transmissores de doenças, tais como: dengue, febre amarela, malária e doença de Chagas. Nossa hipótese é que estes fatores antimicrobianos estejam presentes em todos os insetos independentemente do grupo, incluindo não hematófagos e pragas de lavouras.

A grande vantagem técnica da presente invenção se baseia na possibilidade de controle de populações de insetos vetores de doenças e/ou pragas de lavouras. A presente invenção descreve pela primeira vez que é possível desenvolver mecanismos que visem à destruição dos ovos dos insetos, ou seja, insetos ainda em desenvolvimento, de forma menos agressiva a natureza. Ou seja, a idéia é desenvolver um bloqueio da proteção do ovo do inseto, seja através da seleção de cepas de microorganismos que possam se desenvolver mais rapidamente, burlando a proteção do ovo, seja desenvolvendo produtos que interfiram nos fatores de proteção.

### **Sumário da Invenção**

A presente invenção proporciona fatores antimicrobianos, em especial antifúngicos, obtidos do envoltório protetor de ovos de insetos hematófagos transmissores de doenças, tais como: dengue, febre amarela, malária e doença de Chagas. É, portanto, um dos objetos da presente invenção proporcionar composições microbicidas compreendendo peptídeos e/ou proteínas do envoltório protetor de ovos de insetos.

É também um dos objetos da presente invenção proporcionar processos para a obtenção de composições microbicidas compreendendo peptídeos e/ou proteínas do envoltório protetor de ovos de insetos.

Em um aspecto preferencial, sendo, portanto, outro objeto da invenção, as composições microbicidas da invenção compreendem pelo menos parte da seqüência de aminoácidos da proteína Rp45 do envoltório protetor de ovos de *Rhodnius prolixus*.

Em um aspecto preferencial, sendo, portanto, outro objeto da invenção, as composições microbicidas da invenção compreendem a seqüência inteira de aminoácidos (seqüência N<sup>o</sup>. 1) da proteína Rp45 do envoltório protetor de ovos de *Rhodnius prolixus*.

É também um dos objetos da presente invenção proporcionar construções gênicas compreendendo pelo menos parte da seqüência codificante de ao menos parte substancialmente funcional como microbicida, de ao menos uma proteína do envoltório protetor de ovos de insetos.

Em ainda um outro aspecto, a manipulação, o uso e a aplicação das formulações da presente invenção são mais práticos e eficientes, aumentando o desempenho dos processos de controle de pestes conhecidos. É, portanto, ainda outro objeto da presente invenção proporcionar um processo de controle de pestes compreendendo a aplicação de composições microbicidas contendo peptídeos e/ou proteínas do envoltório protetor de ovos de insetos.

Estes e outros objetos da presente invenção serão melhor compreendidos e valorizados a partir da descrição detalhada da invenção e das reivindicações anexas.

### **Breve descrição das figuras**

A Figura 1 mostra alguns ovos dos insetos utilizados nesta invenção e que serviram para o isolamento dos fatores solúveis da água de postura e da proteína Rp45. A) Ovo de *Aedes aegypti*; B) Ovos de *Culex* sp; C) Ovo de *Rhodnius prolixus*.

A Figura 2 mostra uma fotomicrografia das estruturas de reprodução assexuada dos fungos utilizados nos experimentos. A) *Aspergillus niger*; B) *Penicillium* sp em aumento final de 400x.

A Figura 3 mostra uma foto da câmara de cultivo em lâmina de microscópio dos fungos utilizados nesta invenção. A) fragmentos de meio de cultivo sólido cortado e colocado sobre uma lâmina de microscópio; B) lâmina de vidro de microscopia; C) placa de Petri estéril; D) chumaço de algodão embebido em água destilada para manter o ambiente úmido.

A Figura 4 mostra uma fotomicrografia do meio de cultivo sólido contendo fungo e extrato bruto de envoltório protetor de ovo. A) Fragmento de meio de cultivo com extrato bruto de córion de *R. prolixus* mostrado pela seta ( $\rightarrow$ ); B) Meio de cultivo sólido controle, sem a presença de extrato bruto de envoltório protetor, cultivado apenas na presença de água autoclavada. Notar que as colônias do fungo *Aspergillus niger* se desenvolveram nas bordas do fragmento do meio de cultivo, indicado pela seta ( $\Rightarrow$ ).

A Figura 5 mostra uma fotomicrografia de uma cultura em lâmina de microscópio de *A. niger* na presença de extrato bruto de envoltório protetor de *R. prolixus*. O painel A mostra a cultura de fungo na presença do extrato bruto de envoltório protetor e o painel B a colônia crescida na presença apenas de água destilada, controle. Observar que os conidióforos apresentam um desenvolvimento menos intenso na presença de extrato bruto de envoltório protetor em A, evidenciado pela coloração marrom menos intensa, quando comparada com o controle em B com um tom de marrom mais escuro.

A Figura 6 mostra uma fotomicrografia de cultura do fungo *Aspergillus niger* na presença de extrato bruto de córion de *A. aegypti*. O número à

esquerda indica tempo de cultivo: 48 horas ou 72 horas de desenvolvimento. Em A e C, o *A. niger* foi cultivado na presença de extrato bruto de envoltório protetor de *A. aegypti*. Em B e D, o cultivo de *A. niger* foi feito apenas na presença de água autoclavada. Observar que existe um retardo no desenvolvimento do fungo na presença do extrato bruto de córion de *Aedes aegypti* nas primeiras 48 horas de cultura. Após 72 horas de cultura este efeito aparentemente é abolido.

A Figura 7 mostra uma fotomicrografia de uma cultura do fungo *Penicillium sp* na presença de extrato bruto de córion de *A. aegypti*. O número à esquerda indica o tempo de cultivo: 48 horas ou 72 horas. Em A e C o *Penicillium sp* foi cultivado na presença de extrato bruto de envoltório protetor. Em B e D o fungo foi cultivado apenas na presença de água autoclavada, usada como controle. Observar o retardo do crescimento da colônia quando comparado os painéis A com B e os painéis C com D. Novamente neste caso, o efeito parece ser abolido após 72 horas de cultivo.

A Figura 8 mostra uma fotomicrografia de cultura em lâmina de *A. niger* na presença de extrato bruto de envoltório protetor de *Culex sp*. (A) extrato bruto de envoltório protetor na concentração de 0,01 µg/µL; (B) extrato bruto de envoltório protetor na concentração de 0,0025 µg/µL; (C) extrato bruto de envoltório protetor na concentração de 0,0003125 µg/µL, diluição de 1:32; (D) extrato bruto de envoltório protetor na concentração de 0,01 µg/µL; (E) extrato bruto de envoltório protetor na concentração de 0,005 µg/µL, fator de diluição de 1:2; (F) extrato bruto de envoltório protetor na concentração de 0,0025 µg/µL, fator de diluição 1:4. Observar que o desenvolvimento das colônias de *A. niger* é dependente da concentração de extrato bruto de envoltório protetor (EBEP). No painel A, após 48 horas de cultivo, não existe desenvolvimento do fungo na presença de uma concentração de 0,01 µg/µL de EBEP, as colônias se desenvolvem a medida que o EBEP foi diluído, painéis B e D. Após 72 horas de cultivo, observa-se que no painel D já apresenta desenvolvimento da colônia, mas que este desenvolvimento é mais acentuado conforme o EBEP vai sendo diluído, evidenciando-se que o efeito do EBEP é dose dependente.

A Figura 9 mostra uma fotomicrografia de uma cultura em lâmina de *Penicillium* sp na presença de extrato bruto de envoltório protetor de *Culex* sp. Os números no canto inferior esquerdo referem-se à concentração do extrato bruto de envoltório protetor. (A) e (D): concentração de extrato bruto de envoltório protetor de 0,01 µg/µL; (B) e (E): extrato bruto de envoltório protetor diluído 1:4; (C) e (F): extrato bruto de envoltório protetor diluído 1:32. Observa-se que assim como em *A. niger*, o desenvolvimento de *Penicillium* sp na presença de EBEP é favorecido pela diminuição da concentração do extrato, mostrando, mais uma vez, que o efeito é dose dependente.

A Figura 10 mostra uma fotomicrografia do desenvolvimento de *A. niger* na presença de fatores solúveis presentes no envoltório protetor de *Culex* sp. O teste baseia-se na lavagem dos ovos, após a postura pelas fêmeas, com o objetivo de se identificar possíveis fatores solúveis presentes na superfície do envoltório protetor e que poderiam ser facilmente extraídos. A idéia é que estes fatores solúveis são liberados na água logo após o contato do ovo com a superfície líquida. Assim, desenhou-se um experimento baseado em lavagem sucessivas dos ovos. Primeira linha após 48 horas de cultivo e, na segunda linha após 72 horas de cultivo. (A) e (D): o cultivo foi realizado na presença do sobrenadante da primeira lavagem dos envoltórios protetores; (B) e (E): o cultivo foi realizado com o sobrenadante da quinta lavagem dos envoltórios protetores; (C) e (F): a cultura foi realizada na presença apenas de água destilada como controle. Este experimento evidencia a presença de fatores solúveis, que são liberados na água, com atividade antifúngica no envoltório protetor de *Culex* sp.

A Figura 11 mostra uma fotomicrografia do desenvolvimento de *Penicillium* sp na presença de fatores solúveis presentes na superfície dos ovos de *Culex* sp. (A) e (D): mostram o cultivo realizado na presença do sobrenadante da primeira lavagem dos ovos; (B) e (E): cultivo realizado na presença do sobrenadante da quinta lavagem dos ovos; (C) e (F): cultivo realizado na presença apenas de água autoclavada como controle. Observar que houve um nítido retardo no desenvolvimento das colônias na presença do



sobrenadante da primeira lavagem dos ovos. Este efeito foi totalmente revertido quando as colônias foram crescidas na presença do sobrenadante da quinta lavagem, ou seja, os fatores solúveis com atividade antifúngica estão presentes na superfície do ovo e são liberados para a água de postura. Após 5 72 horas de cultivo o efeito era abolido (D, E e F).

Figura 12 mostra uma fotomicrografia do desenvolvimento de *A. niger* na presença de extrato bruto de envoltório protetor de ovos de *Culex sp* após cinco lavagens com água. (A): o fungo cresceu na presença de extrato bruto de envoltório protetor; e (B): a cultura foi feita na presença de água autoclavada 10 como controle. Observar que apesar do envoltório protetor ter sido lavado 5 vezes ele mantém a capacidade de retardar o desenvolvimento do *A. niger*, sugerindo a existência de duas atividades, uma atividade relacionada aos fatores solúveis e uma relacionada ao extrato bruto, não solúvel .

A Figura 13 mostra uma fotomicrografia de uma cultura de *A. niger* na 15 presença de extrato bruto de envoltório protetor de ovos de *Aedes aegypti*. Esporos de *A. niger* foram submetidos ao crescimento em placas de Petri na presença e na ausência de extrato bruto de envoltório protetor de ovos de *A. aegypti*. (A) Controle - fungo cultivado na ausência de extrato bruto de envoltório protetor. Nesta imagem nota-se um denso emaranhado de hifas de 20 coloração clara, o que dificulta a visualização individualizada dessas estruturas. As esferas em tons que variam do castanho claro ao negro representam as vesículas produtoras de esporos em vários estágios de desenvolvimento; (B): colônia crescida na presença de extrato bruto de envoltório protetor (EBEP). Na figura observa-se que as colônias ainda estão em fase inicial de 25 desenvolvimento, e são representadas por um ponto onde encontramos um micélio pouco denso, de onde partem algumas hifas isoladas. Não foi observada nenhuma estrutura reprodutiva em formação. As manchas de cor escuras observadas nessa figura representam o extrato bruto de envoltório protetor, indicado pelo círculo (O).

30 A Figura 14 mostra uma fotomicrografia eletrônica de colônias de *A. niger* tratadas ou não com extrato bruto de envoltório protetor de ovos de

*Aedes aegypti*. As células controle e tratadas com extrato bruto de envoltório protetor foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão. O painel (A) mostra a cultura controle na ausência de EBEP. Os painéis (B), (C) e (D) mostram culturas tratadas com extrato bruto de envoltório protetor. PC: Parede Celular; M: Membrana Plasmática; Mt: Mitocôndria; EM: Estrutura Membranosa; Es: Espaço entre a membrana e a parede celular; Inv: Invaginação; EF: Estruturas fibrilares; EMD: Estruturas membranosas disformes; Vm: Vesículas membranosas; V: Vacúolo; N: Núcleo. Barra: A, B e D = 0,5  $\mu\text{m}$ ; C = 1,1  $\mu\text{m}$ . Em (A) observar duas células separadas por um septo (S). Em (B), a mesma observação. Neste painel podemos observar as alterações celulares provocadas pelo EBEP no fungo *A. niger*. Comparando a morfologia das células não tratadas com EBEP em (A) com a das células tratadas em (B, C e D). Podemos observar que as células controle apresentaram-se delimitadas pela parede celular de contorno homogêneo. A membrana celular com a bicamada lipídica bem aderida à parede celular, citoplasma com granulações fortemente eletrondensas, mitocôndrias de aspecto e formato normais, assim como o núcleo. Em contraste, as hifas crescidas na presença EBEP mostraram uma organização ultraestrutural muito diferente (B, C e D). A análise dos cortes ultrafinos do micélio cultivado na presença EBEP mostrou que a maioria das hifas apresentava alterações ultraestruturais bem evidentes na parede celular e na membrana plasmática, o citoplasma apresentou grande número de vacúolos e estruturas membranosas organizadas aleatoriamente. As células tratadas com EBEP apresentaram grandes alterações morfológicas condizentes com o fenômeno de apoptose ou morte celular. Portanto, demonstrando que o EBEP leva a desorganização e morte celular.

A Figura 15 mostra o perfil cromatográfico da água de postura dos ovos de *Aedes aegypti* após filtração em gel em coluna Superdex-75. A água de postura foi submetida à filtração em gel em coluna Superdex-75, acoplada a um aparelho de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC -Shimadzu LC-10AT). As condições de corrida incluíram 0,1 M tampão fosfato + 0,15 M NaCl,

pH 7,4 sob um fluxo contínuo de 0,5 mL/min/temperatura ambiente. Painel (A) Comprimento de onda  $\lambda=220\text{nm}$ ; painel (B) Comprimento de onda  $\lambda=280\text{nm}$ . Todas as frações foram testadas para atividade antifúngica em ensaios de inibição de crescimento de *A. niger* em lâmina. Apenas a fração com tempo de retenção igual a 38 min (indicada pela seta) apresentou atividade antifúngica.

A Figura 16 mostra uma prancha de fotomicrografias de cultura de *A. niger* na presença de algumas das frações purificadas da água de postura dos ovos de *A. aegypti* por filtração em gel. Para demonstrar a ação antifúngica do fator antifúngico com tempo de retenção igual a 38 min (FA38) sobre o *A. niger*, esporos numa concentração de  $3 \times 10^2$  esporos/mL foram semeados na presença de uma fração imediatamente anterior a que mostrou atividade e, uma imediatamente posterior. O fungo foi cultivado em meio líquido sobre uma lâmina durante 40 horas a temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram coradas com azul de metileno, montadas com lamínulas e fotografadas em microscópio acoplado a um sistema digital de captura de imagens. Painéis (A) e (B) colônias crescidas na presença da fração de tempo de retenção igual a 37 min. Nos painéis de (C) a (F) colônias crescidas na presença da fração de tempo de retenção igual a 38 min (FA38). Painéis (G) e (H) colônias crescidas na presença da fração com tempo de retenção igual a 39 min. Es: Esporo; TG: Tubo germinativo; Cnd: Conidióforo; V: Vesícula. Observar que as colônias crescidas na presença de FA38 (painéis C-F) não se desenvolveram.

A Figura 17 mostra a estimativa da massa molecular do fator antifúngico de 38 minutos (FA38) oriundo da água de postura de *Aedes aegypti*. Para a determinação da massa molecular do FA38 foram utilizadas proteínas padrões. A estimativa foi feita através da relação entre o tempo de retenção e a massa molecular de proteínas conhecidas. Os pontos correspondem à massa molecular da proteína soro albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (43 kDa), quimiotripsinogênio (25 kDa), ribonuclease (13,7 kDa) e aprotinina (5,6 kDa). O sinal + representa o ponto de intersecção entre o tempo de 38 minutos e a massa molecular correspondente a 1,86 kDa.

A Figura 18 mostra uma prancha de fotomicrografias de culturas de *A. niger* na presença da fração antifúngica 38 min (FA38) após a germinação prévia. Para verificar qual o tipo de efeito que o FA38 apresentava sobre o *A. niger* foi feita uma germinação prévia do fungo, esporos numa concentração de  $3 \times 10^2$  esporos/mL foram inoculados em meio líquido sobre uma lâmina de microscópio durante 18 horas para uma pré-germinação à temperatura ambiente. Após esse período, o FA38 e frações adjacentes foram adicionados separadamente aos fungos em cultivos. Estas culturas foram incubadas por mais 22 horas a temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram coradas com azul de metileno, montadas com lamínulas e fotografadas em microscópio acoplado a um sistema digital de captura de imagens. Painel (A) cultura do fungo na presença da fração com tempo de retenção igual a 37min. Painéis (B) a (D) cultura do fungo na presença da fração FA38. Painel (E) cultura do fungo na presença da fração com tempo de retenção igual a 39 min. Es: Esporo; H: Hifas pouco desenvolvidas. Observar pelos painéis (B) a (D) que o efeito da FA38 é fungicida, ou seja, retarda o desenvolvimento do fungo.

A Figura 19 mostra o perfil cromatográfico da água de postura dos ovos de *A. gambiae* após filtração em gel em Superdex-75. As amostras da água de postura foram submetidas à filtração em gel em coluna Superdex-75, acoplada a um aparelho de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC -Shimadzu LC-10AT). As condições de corrida incluíram 0,1 M tampão fosfato + 0,15 M NaCl, pH 7,4 em fluxo contínuo de 0,5 mL/min à temperatura ambiente. Comprimento de onda = 220nm. Após a corrida cromatográfica todas as frações foram testadas para inibição do crescimento de *A. niger*. Apenas a fração com tempo de retenção igual a 14 min (indicado pela seta) apresentou atividade antifúngica.

A Figura 20 mostra uma prancha com fotomicrografia de colônias de *A. niger* crescidas na presença de algumas frações coletadas da cromatografia por filtração em gel da água de postura de *A. gambiae*. Esporos, numa concentração de  $3 \times 10^2$  esporos/mL, foram semeados na presença de uma

fração imediatamente anterior a que mostrou atividade e, uma imediatamente posterior. O fungo foi cultivado em meio líquido sobre uma lâmina de microscópio durante 40 horas à temperatura ambiente. Após este período, as lâminas foram coradas com azul de metileno, montadas com lamínulas e fotografadas em microscópio acoplado a um sistema digital de captura de imagens. Painel (A) cultura de *A. niger* na presença da fração com tempo de retenção igual a 13 min. Painéis (B) a (E) fungo crescido na presença da fração com tempo de retenção igual a 14 min. Painel (F) fungo crescido na presença da fração com tempo de retenção igual a 15 min. Observa-se, assim como em *Aedes*, a presença de um fator solúvel na água de postura de *Anopheles gambiae* com atividade antifúngica.

A Figura 21 mostra uma foto de uma placa de Petri contendo uma cultura de *A. niger* na presença de envoltório protetor de ovos de *Rhodnius prolixus*: inibição do crescimento de *Aspergillus niger* pelo envoltório protetor de ovos de *Rhodnius prolixus*. (A) Cultura de *A. niger* na presença de envoltório protetor de ovos de *Rhodnius prolixus*. (B) Cultura de *A. niger* na presença de envoltório protetor de ovos de *Rhodnius prolixus* previamente autoclavados. Observar que em (A) houve a formação do halo de inibição, não observado em (B). Este resultado sugere que o fator antifúngico tenha origem protéica.

A Figura 22 mostra o processo de purificação da proteína de 45 KDa do envoltório protetor de *Rhodnius prolixus* denominada de proteína Rp45 e a purificação de soro albumina bovina (BSA) em gel de poliacrilamida com SDS. Os envoltórios protetores foram homogeneizados em tampão contendo 8 M uréia, 0,03 M DTT, Tris/HCl 0,36 M pH 8,4. O homogeneizado foi aplicado em gel 10 % SDS-PAGE e corado com KCl 1M. As bandas da proteína de Rp45 e BSA foram eluídas do gel em tampão contendo 50 mM de bicarbonato de amônio pH 7,8 e 0,1% SDS durante 90 minutos a 37° C. Coluna 1: Padrão de massa molecular (220; 160; 120; 100; 90; 80; 70; 60; 50; 25 kDa); Coluna 2: Homogeneizado de envoltórios protetores de ovos postos de *Rhodnius prolixus*; Coluna 3: Proteína Rp45 purificada; Coluna 4: BSA.

A Figura 23 mostra um gráfico e uma foto de uma cultura de *A. niger* em placa de poliestireno de 96 furos na presença da proteína Rp45 extraída do envoltório protetor de *R. prolixus*. A experiência foi realizada de acordo com o protocolo de Broekaert et al (1990). O primeiro painel mostra o gráfico de inibição dose-dependente do crescimento do fungo *A. niger*, com um IC<sub>50</sub> de 0,91 µM. O segundo painel mostra a foto da cultura do fungo representativa do gráfico.

A Figura 24 mostra uma fotomicrografia eletrônica de cultura de *Aspergillus niger* cultivado na presença da proteína Rp45. No painel A uma visão panorâmica de *A. niger* não tratado com Rp45 e cultivado em meio de cultura durante 48 horas. No painel B visão geral de *A. niger* tratado com 10 µM de BSA. O painel C mostra *A. niger* cultivado durante 48 horas na presença de 10 µM de Rp45. O "inset" mostra que 5 horas de tratamento com a proteína Rp45 é suficiente para induzir o aparecimento de estruturas do tipo mielina. O painel D mostra detalhes de mitocôndrias intumescidas nas células tratadas com 10 µM de Rp45. Os painéis E e F apresentam as alterações da parede celular e do citoplasma das células tratadas com 80 µM da proteína Rp45. Gly = partículas de glicogênio; CW = parede celular; M = membrana; M-L = estruturas do tipo-mielina; MT = mitocôndria; VAC = vacúolos. Bar = 1 µm.

A Figura 25 mostra um cromatograma da purificação parcial dos fatores solúveis associados ao envoltório protetor de ovos de *Rhodnius prolixus*. Três gramas de ovos postos de *Rhodnius prolixus* foram lavados com 6 mL de água Milli-Q sob agitação contínua e esta água de lavagem concentrada até um volume de 0,2 mL. Em seguida, esta amostra foi aplicada em uma coluna de filtração em gel, Superdex-75 (Amersham Pharmacia) acoplada a um aparelho de cromatografia líquida de alta "performance" (HPLC-Shimadzu LC-10AT). A coluna foi previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,075M, pH 7,4 sob um fluxo contínuo de 0,5 mL/min. A leitura dos valores de absorvância foi acompanhada utilizando o comprimento de onda de 214 nm. As setas indicam os picos que apresentaram atividade antifúngica.

A Figura 26 mostra uma fotomicrografia do teste de inibição do crescimento do fungo *A. niger* na presença de fatores solúveis, purificados na etapa anterior, associados ao envoltório protetor de ovos de *R. prolixus*. O ensaio foi realizado em lâminas seguindo o protocolo de Banzet (2002). O

5 fungo foi crescido na presença de 0,2 mL do lavado de ovos em meio líquido Saboraud utilizando  $3 \times 10^2$  esporos/mL. (aumento de 40x). Painei (A): controle (aumento 40x); Painei (B): controle (10x); Painei (C): fração tempo de retenção de 26 min; Painei (D): fração tempo de retenção de 27 min; Painei (E): fração com tempo de retenção de 28 min; Painei (F): fração com tempo de

10 retenção de 29 min; Painei (G): fração com tempo de retenção de 30 min; Painei (H): fração com tempo de retenção de 31 min; Painei (I): fração com tempo de retenção de 32 min. Painei (J): fração com tempo de retenção de 49 min; Painei (K): fração com tempo de retenção de 50 min; Painei (L): fração com tempo de retenção de 51 min; Painei (M): fração com tempo de retenção

15 de 52 min (aumento 40X). Observar o efeito nas frações 27 min, 29 min e 50 min.

A Figura 27 mostra a inibição do crescimento do fungo *Aspergillus niger* na presença do lavado dos ovos postos de *Rhodnius prolixus*. Painei (A): Microplacas contendo o fungo *A. niger* foram fotografadas após 48 horas de

20 incubação com o lavado dos ovos postos de *Rhodnius prolixus* e em seguida digitalizadas. Os resultados são expressos em gráfico como percentagem do controle. Painei (B): Fotomicrografia da cultura do fungo *A. niger* na presença de diferentes concentrações de proteínas do lavado dos ovos postos de *Rhodnius prolixus*.

25 A Figura 28 mostra uma foto de uma cultura de *Aspergillus niger* na presença de ovos postos de *Rhodnius prolixus*. Não existe a formação de halo de inibição na cultura crescida na presença de ovos íntegros de virgens (não fertilizados)- Painei (A), neste caso os fungos se desenvolvem integralmente. No painei (B), observa-se justo o contrário, na presença de ovos postos

30 fertilizados não há o desenvolvimento do fungo. Estes resultados sugerem que a espermateca seja responsável pela produção de um antifúngico que será

depositado sobre a superfície dos ovos durante o trajeto do mesmo pelo trato reprodutor da fêmea, além disso, sugere que a fertilização seja um evento chave que desencadeia mecanismos de proteção para o embrião.

5 A Figura 29 mostra a expressão do gene Rp45 em diferentes tecidos realizado através de um ensaio de northern-blot. Os resultados demonstraram que a expressão deste gene ocorre exclusivamente nos ovários. O marcador radioativo do gene Rp45 hibridizou com uma banda de 4,9 Kb. Um gene ribossomal foi amplificado para verificar a integridade do RNA (gel corado com brometo de etídeo). Para investigar o padrão de expressão do gene Rp45 nos  
10 ovários um outro ensaio de northern-blot foi realizado utilizando folículos ovarianos de diferentes tamanhos (Fig. 29B). Os ovários foram dissecados no terceiro dia após a alimentação sangüínea e armazenados em RNAlater (Ambion). A Figura 29B mostra em (1) ovário de fêmeas não alimentadas com sangue; em (2) trofários; em (3) folículos de tamanho de 0,5 mm; em (4)  
15 folículos de 1,0 mm; em (5) folículo de 2,0 mm; em (6) ovo posto (controle negativo); em (7) ovário total (controle positivo). A expressão do gene foi observada apenas nos folículos de 2,0 mm e no controle positivo (Figs. 29B (5) e 29B (7)). Este resultado sugere que a proteína Rp45 é exclusiva do envoltório protetor.

20

### **Descrição Detalhada da Invenção**

O conceito inventivo que fundamenta os objetos da invenção se baseia no desenvolvimento de elementos do envoltório protetor (casca) de ovos de insetos como fatores capazes de impedir o desenvolvimento de  
25 microorganismos.

Na presente invenção será descritos fatores antifúngicos presentes no envoltório protetor (cascas) de ovos e que são solúveis na água de postura de insetos da família Culicidae, em especial: *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* e *Culex sp*; além da descrição de fatores antifúngicos solúveis em água e da  
30 proteína antifúngica Rp45 do envoltório protetor de ovos de *Rhodnius prolixus*.



A partir dos estudos e desenvolvimentos feitos pelos inventores, esta invenção demonstra que os ovos de insetos apresentam, além das clássicas funções já descritas como (permitir que o embrião flutue quando em ambiente aquático, permitir as trocas gasosas, proteger de danos físicos e intempéries da natureza, permitir a fertilização) uma nova função: a de proteger o embrião contra ataque de microrganismos, em especial fungos. A proteção antimicrobiana deve ser geral entre os diferentes grupos, e isto inclusive pode ter sido um dos fatores que permitiram aos insetos o seu sucesso evolutivo.

Em experimentos prévios, é interessante observar que os mosquitos pertencentes à família *Culicidae* apresentam algumas peculiaridades no seu desenvolvimento. As fêmeas ovipõem em ambientes líquidos, ou seja, elas necessitam de coleções de águas para a oviposição. A presença de fatores solúveis em água no envoltório protetor (casca) dos ovos abre uma nova janela para a discussão do controle de populações de insetos vetores de doenças. Os fatores solúveis seriam liberados gradativamente no substrato de oviposição. Dos ovos, após um período embrionário de 72 horas, eclode uma larva. O período embrionário coincide exatamente com o tempo de desenvolvimento do fungo bloqueado pelos fatores solúveis presentes no envoltório protetor (casca do ovo). Na verdade, o embrião não necessariamente precisa matar o fungo e, sim apenas retardar o seu desenvolvimento, como observado em nossos resultados. Depois de formado, o embrião desenvolve sua própria maquinaria para se defender do ataque de microorganismo. As larvas que eclodem após 72 horas de embriogênese, estão aptas a desencadear a síntese, em série, de um grupo grande de peptídeos antimicrobianos como demonstrados em diversos trabalhos, o embrião não. A novidade da invenção parte da observação de que o ovo é capaz de proteger o embrião em desenvolvimento dos microrganismos presentes no ambiente de oviposição, para o desenvolvimento das composições e processos aqui descritos e reivindicados.

Em *Rhodnius prolixus*, o substrato de oviposição, onde vivem os adultos e ninfas é seco (os triatomíneos ovipõem em frestas presentes nas paredes de casas de pau-a-pique, nos galinheiros, em ninhos de aves), Estes ambientes

são propícios para o crescimento de uma série de microorganismos por serem extremamente úmidos e repletos de dejetos orgânicos. O desenvolvimento embrionário de *Rhodnius* é de 15 dias, portanto, tempo suficiente para ser atacado e destruído por microorganismos.

5 Os fatores antifúngicos desta invenção foram isolados de envoltório protetor de ovos e/ou água de postura de insetos preferencialmente de *Aedes aegypti* (Diptera-Culicidae-Aedini), *Anopheles gambiae* (Diptera-Culicidae-Anophelini), *Culex sp* (Diptera-Culicidae-Culicini) e *Rhodnius prolixus* (Hemiptera-Reduviidae). A seqüência de aminoácidos aqui descrita é deduzida  
10 a partir da seqüência de nucleotídeos da proteína Rp45 de *Rhodnius prolixus* e sua expressão em diferentes tecidos e esta proteína apresenta atividade antifúngica. Para a realização dos testes descritos na presente invenção, foram utilizados insetos que foram criados e mantidos em laboratório em condições padrões, de acordo com a Figura 1. A água de postura de *Anopheles gambiae*  
15 foi gentilmente cedida pelo Dr. J. M. Ribeiro, NIH-USA. Existem particularidades na postura dos ovos pelas fêmeas de mosquitos. As fêmeas de *Aedes* depositavam seus ovos isoladamente não diretamente sobre a água, mas um pouco acima da superfície líquida. As fêmeas de *Anopheles* depositam seus ovos isoladamente com flutuadores diretamente sobre a superfície líquida.  
20 Já as fêmeas de *Culex sp* depositam seus ovos agrupados, formando barcaças, diretamente sobre a superfície água. As fêmeas de *Rhodnius* ovipõem em substrato seco.

Através de um envoltório protetor, entende-se a formação de uma estrutura protéica rígida produzida pelas células do epitélio folicular, que  
25 envolvem o ovócito. Envoltório protetor constitui a casca do ovo. O ovo após a fertilização será depositado na natureza e dará origem a um embrião que eventualmente se desenvolverá. O embrião só se desenvolverá se estiver protegido por agentes antifúngicos associados ao envoltório protetor dos ovos.

Os fatores antifúngicos da invenção são obtidos do envoltório protetor e  
30 compreendem um ou mais peptídeos ou proteínas provavelmente presentes nos envoltórios protetores de todos os insetos. Devido a sua função de

proteção dos ovos, os agentes antifúngicos devem ter um amplo espectro de ação para preservar as espécies. Os peptídeos podem ser obtidos livres de proteínas por tratamento térmico, já que são termoestáveis a 100 °C por 5 min.

Os fatores antifúngicos associados ao envoltório protetor podem ser evidenciados através do cultivo de fungos na presença de extrato bruto de envoltório protetor de *Aedes aegypti*, *Culex sp* e *Rhodnius prolixus*. Os fatores que se solubilizam em água presentes no envoltório protetor de *Aedes aegypti*, *Anopheles gambiae* e *Rhodnius prolixus*, podem ser isolados na sua forma ativa por cromatografia líquida. As proteínas presentes no envoltório protetor de *Rhodnius prolixus* podem ser isoladas por eletroforese em condições desnaturantes. Desta maneira, os fatores solúveis podem ser isolados de forma conveniente através de cromatografia líquida de alta pressão utilizando uma coluna de filtração em gel, Superdex-75 (Amersham Pharmacia) na faixa de separação de 3.000 a 70.000 Da, acoplada a um aparelho de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC - Shimadzu LC-10AT). A coluna deve ser previamente equilibrada em tampão fosfato com 0,075 M NaCl, pH 7,4, sob um fluxo contínuo de 0,5 mL/min, à temperatura ambiente. A leitura das absorvâncias foi feita através de um diodo de detecção (modelo SPDM10A), usando quatro comprimentos de onda: 214, 220, 225 e 280 nm.

A preparação do extrato bruto de envoltório protetor (EBEP) dos ovos de *Aedes aegypti* e *Culex sp* foi feita após a eclosão das larvas. O envoltório protetor era macerado com gral e pistilo de porcelana em 0,3 mL de água destilada estéril. O EBEP era estocado em tubos de polipropileno a -4°C, sem a adição de inibidores de proteases, até o momento de sua utilização nos ensaio de inibição em lâmina de microscópio do crescimento de *Aspergillus niger* e/ou *Penicillium sp*.

Em *Rhodnius prolixus*, as proteínas do envoltório protetor dos ovos foram isoladas a partir de eletroforese em gel de poli(acrilamida) 10 % com SDS. As proteínas extraídas do envoltório protetor de *Rhodnius prolixus* foram solubilizadas em tampão de extração constituído de 8 M de uréia, 0,03 M de DTT, Tris/HCl 0,36 M, pH 8,4. Em seguida, as proteínas extraídas eram

aplicadas em um gel de poliacrilamida 10 % sob condições desnaturantes. Após a eletroforese, o gel era corado com uma solução 1 M KCl para visualização das proteínas. O isolamento e purificação da proteína de *Rhodnius prolixus* de 45 kDa (Rp45) foi feito cortando e eluindo a banda de interesse do gel, e em seguida transferindo a banda para tubos de polipropileno, em seguida a banda era macerada em 0,1-0,2 mL de tampão de eluição (50 mM bicarbonato de amônio pH 7,8 e 0,1 % SDS). A mistura era incubada a 37 ° C por um tempo mínimo de 60 min. Após a incubação os tubos eram centrifugados por 2 min a 12000 rpm. O sobrenadante era transferido para outro tubo. Uma nova extração era realizada adicionando-se mais 0,1 mL do tampão de eluição e, repetia-se a operação. A pureza da preparação era monitorada através de gel de poliacrilamida 10 % com SDS. Como controle, foi feito o mesmo procedimento com a proteína soro albumina bovina (BSA) dissolvida em água. A BSA foi utilizada como controle por ser uma proteína de alta massa molecular e por não apresentar atividade antifúngica. Ao final da purificação, as proteínas eram precipitadas com 80 % de acetona gelada em um banho a – 20 ° C durante 5 min para a retirada do SDS. Esta operação era repetida várias vezes para se ter certeza de que a amostra estava livre da presença de SDS. Em seguida, as amostras eram centrifugadas durante 2 min a 12000 rpm em uma microcentrífuga (Incibras).

A transferência da proteína Rp45 para seqüenciamento da região amino-terminal foi realizada através da corrida eletroforética. Primeiramente, transferiu-se a proteína para uma membrana de PVDF usando o tampão de transferência gelado (10 mM CAPES pH 11 com NaOH, 10 % metanol) durante 30 min a 0,5 A. A seguir ativou-se a membrana com 100 % metanol P.A. Após a transferência, lavou-se a membrana durante 5 min com água deionizada. Depois corou-se a membrana com 0,1 % azul de Coomassie brilhante R-250, 50 % metanol durante 5 min. Para o descoramento usou-se metanol 50 % e ácido acético 10 % durante 10 min em temperatura ambiente. A seguir lavou-se a membrana com água por 10 min, depois secou-se ao ar e armazenou-se em – 20 ° C para ser utilizado posteriormente.

Para o seqüenciamento da porção NH<sub>2</sub>-terminal foi utilizado a técnica de Edman. A proteína purificada e transferida para membrana de PVDF era aplicada diretamente no cartucho do sequenciador. Para sequenciamento foi utilizado o procedimento 40 do sequenciador automático Porton PI 2090  
5 acoplado a um HPLC HP-1090.

Para o isolamento do gene Rp45, um iniciador degenerado (Rp45 - 5' GGNCCNGCNTAYTAYGA 3' – proteína Rp45) foi sintetizado baseado na seqüência N-terminal da proteína obtida a partir da degradação de Edman. O RNA total (RNAt) do epitélio follicular foi purificado utilizando as instruções do  
10 “kit” de extração do reagente TRIzol (Invitrogen). A síntese da primeira fita de cDNA foi feita segundo as instruções do “kit” ‘Superscript pre-amplification system’ (Invitrogen) e o iniciador NotI-(dt)<sub>18</sub> (Amersham-Pharmacia). A utilização do iniciador degenerado e o iniciador NotI-(dt)<sub>18</sub> daria um produto com tamanho esperado de 1259 pb. As reações em cadeia da polimerase  
15 (PCR) foram realizadas com os iniciador degenerado, mais o NotI-(dt)<sub>18</sub>. As condições de amplificação incluíram 39 ciclos de 94 ° C por 30 seg, 51 ° C por 60 seg e 68 ° C por 180 seg. Um ciclo final de 68 ° C foi mantido por mais 6 min. Os produtos de PCR foram purificados por gel, clonados utilizando o Perfect Blunt™ clonig kit (Novagen) e os clones foram seqüenciados.

20 A procura de semelhanças entre as seqüências foi realizada utilizando o programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tools) utilizando parâmetros “default” do National Center For Biotechnology Information (NCBI). A seqüência ainda não foi depositada em banco de dados.

O RNA total foi isolado de diferentes tecidos. Para os ensaios de  
25 northern-blot os folículos de diferentes tamanhos foram dissecados e armazenados em RNAlater (Ambion) a 4 ° C. Os ovariolos foram dissecados e divididos em trofários e ovócitos de diferentes tamanhos. As amostras de RNA (30 µg / lane) foram separadas por eletroforese em 1,2 % gel de formaldeído-agarose, transferido para membrana de nylon Hybond-N+ (Amersham  
30 Pharmacia Biotech) e hidridizada com fragmento de cDNA marcado com <sup>32</sup>P (Random Primers labelling system –GIBCO BRL). A membrana era lavada em

condições de alta estringência: 3 X com 0,6 M citrato de sódio, 0,6 M NaCl e 0,5 % SDS - 15 min a temperatura ambiente, e 1 X com 0,3 M citrato de sódio, 0,3 M NaCl e 0,5 % SDS - 15 min a 60°C. Após as lavagens a membrana era exposta a um filme fotográfico Kodak X-OMAT a - 70 ° C com uma tela intensificadora. O tempo de exposição variou em torno de 1 a 7 dias, de acordo com a intensidade da marcação e a quantidade de sonda presente.

As cepas dos fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp utilizadas nesta invenção foram isoladas através de decantação espontânea em placas de Petri de esporos suspensos no ar em meio Sabouraud (dextrose 40 g, peptona 10 g, ágar 15 g, cloranfenicol 0,5 mg / mL ou tetraciclina 0,1 mg / mL e água 1000 mL) como pode ser observado na Figura 2. Esta placa era aberta sobre a bancada do laboratório por um período de 15 min. Após 72 horas de incubação a temperatura ambiente e 80 % de umidade, as colônias que se desenvolveram eram isoladas com auxílio de uma alça de platina em tubo de ensaio contendo o meio de cultivo Sabouraud e incubadas por mais 72 horas. Depois do desenvolvimento as colônias eram identificadas utilizando uma chave morfológica de identificação de espécies. As espécies isoladas foram *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. As colônias dos fungos eram mantidas, separadamente, em meio Sabouraud em tubos de vidro em temperatura e luz ambiente. Para manutenção das culturas isoladas foram feitos repiques a cada 30 dias.

Baseado na seqüência N°1 apresentada nesse relatório foi desenhado um iniciador degenerado utilizando 6 aminoácidos (indicado pelo sublinhado). Os ovários foram dissecados e o RNA extraído com TRIzol (Invitrogen). O RNA foi utilizado para a reação de síntese de cDNA com iniciadores NotI(dT)<sub>18</sub>. O iniciadores NotI(dT)<sub>18</sub> foram utilizados com o iniciador degenerado em reações em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar o cDNA da região codificante da proteína de interesse. O produto de PCR apresentou um tamanho de 1250 pb (Rp45), correspondendo ao tamanho esperado baseado na massa molecular da proteína Rp45. A seqüência da proteína Rp45 apresentou um motivo repetitivo Valina-Prolina-Valina (VPV) a cada 15 aminoácidos no seu

domínio central. A seqüência de aminoácidos da proteína Rp45 foi comparada com outras proteínas usando o programa BlastP 2.2.2. O alinhamento não mostrou similaridade com proteínas de envoltório protetor anteriormente descritas.

- 5 A Tabela 1 apresenta um quadro onde é resumida a atividade antifúngica apresentada pelo envoltório protetor das diferentes espécies testadas. (+) apresenta atividade antifúngica; (NT) não testada; (-) proteína não identificada nesta espécie.
- 10 Tabela 1 - Ação de fatores solúveis, extrato bruto e proteína Rp45, extraídos de envoltório protetor de diferentes insetos sobre o desenvolvimento de fungos filamentosos.

Inseto	Fungos	Ação de fatores solúveis do envoltório protetor	Ação extrato total envoltório protetor	Proteína Rp45
<i>Aedes aegypti</i>	<i>Aspergillus niger</i>	+	+	-
	<i>Penicillium sp</i>	+	+	-
<i>Culex sp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	+	+	-
	<i>Penicillium sp</i>	+	+	-
<i>Anopheles gambiae</i>	<i>Aspergillus niger</i>	+	+	-
	<i>Penicillium sp</i>	NT	NT	-
<i>Rhodnius prolixus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+
	<i>Penicillium sp</i>	NT	+	NT

- 15 Os versados na arte valorizarão imediatamente os benefícios decorrentes do uso da presente invenção como fatores capazes de impedir o desenvolvimento de microrganismos, bem como na praticidade de sua produção e na melhoria dos processos industriais nos quais são conduzidos cultivos celulares. Adicionalmente, o fato da presente invenção também se
- 20 constituir em uma alternativa aos demais microbicidas atualmente disponíveis, faz com que o uso da mesma tenha maior valor econômico e social. Variações na forma de concretizar o conceito inventivo aqui exemplificado devem ser compreendidas como dentro do espírito da invenção e das reivindicações anexas.

## Listagem de Sequências

**Dados do requerente:**

(a) Nome: Hatisaburo Masuda

(b) Endereço: Rua Ipiru, 217-bloco II-101 / Ilha do Governador - RJ

**Título da Invenção**: Composições Microbidas, Processos para sua Obtenção, Construções Gênicas, Processos para o Controle de Pestes

**Número de seqüências constantes do pedido**: 1



## Sequência N°1

A Sequência N°1 apresenta a seqüência de nucleotídeos e a seqüência deduzida de aminoácidos após a clonagem e seqüenciamento do gene *Rp45*. No seqüenciamento da porção amino terminal foram obtidos apenas os 23 primeiros aminoácidos: XGPXGLVGDAGYLTGPAYYDXFH.

```

1:                                     GGGCCGGCATACTATGA                               :17
1:   X G P X G L V G D A G Y L T G P A Y Y D                               :20
18:  TGGCTTTCATGCAGCAGATGGTACCCTAGTTGGTGGAGCTGTTGCTGGTGTCCACGCAG       :76
21:   G F H A A D G T L V G G A V A G V H A G                               :40
77:  GACCAGCTGTATCCACCCCTGTTCGATGGCCCTCACGTTGCTGGAACCGCATGGGCTGGC       :135
41:   P A V S T L V D G P H V A G T A W A G                               :60
136: CCCTACGGACATGGTCCTTGCTCCTGTCTCACTCATCACGTGGAAGCAATGTTCTGTC       :194
61:   P Y G H G P C S C L T H H V E S N V R P                               :80

195:  CGTAGTTGATGAATGTTGTGAGCCATGTACCAGTTGTCAGAAAAACCGTCAGACACCAAG       :253
81:   V V D E C V S H V P V V R K T V R H Q E                               :100
254: AAGAACAAGTCACCCGCCATGTTCCCGTCGTAGAAAAGACTGTTACTCAACAAGAAGAG       :312
101:  E Q V T R H V P V V E K T V T Q Q E E                               :120

313:  AAAATCGTCCGTCACGTTCCCGTCACCCAGAAATACACCAGGCCTGTTGTAGAATGCCG       :371
121:  K I V R H V P V T Q K Y T R P V V E C R                               :140

372:  TACTCGTCATGTACCCGTCACCAAACTCGTACCAGGACTGTTGTTGAACCTTACACCA       :430
141:  T R H V P V T K T R T R T V V E P Y T T                               :160

431:  CTCATGTACCAGTAACTGAGAAATACACCAGGCCTGTCGAAGAGACTGTTGTCCGTAAT       :489
161:  H V P V T E K Y T R P V E E T V V R N                               :180

490:  GTTCCTGTTGTAGAAAGACGTTGCAAGCCGTTGTACACCAACACGTTTCGTCACGTTCC       :548
181:  V P V V E R R C K P V V H Q H V R H V P                               :200

549:  AGTAACTGAAAGGAGATGCAGACCTGTTGTAGACACACATGTTGTCAAGTACCAGTCA       :607
201:  V T E R R C R P V V D T H V V S V P V K                               :220

608:  AACGACGTTTCGTCAGAAGACTGGTTGAACAAGAGTCCGTCGAAGTAGTTGGACCCCTGC       :666
221:  R R F V K N L V E Q R V R Q V V G P C                               :240

667:  GGAAATTGTGCTTGGGGAGGACATGTCGCTGGTCCCGTCGTCGATGGTGTAGCTCATGG       :725
241:  G N C A W G G H V A G P V V D G V A H G                               :260

726:  TGTTTACGGNGCTCCTGGATTTCGTCGATGGTGTAGCAACTCATGGTGTTTACCATGGT       :784
261:  V Y G A P G F V D G V A T H G V Y H G A                               :280

785:  CTGTAGCTCCTGGATTTCGTTGATGGTGTTTACCACNATGGTGTAGCTCCTGGATTTCGTC       :843
281:  V A P G F V D G V Y H X G V A P G F V                               :300

844:  GGTGGTGTAGCTCATGGATTTCGTCGATGGTGTAGCTCCTGGATTTCGTCGTTGGTGTAGG       :902
301:  G G V A H G F V D G V A P G F V G G V G                               :320

903:  GACCCGGGGTTACGTCGATGGAGTAGCCGCTCCTGCCGTTGTCGATGGTGCAGCAGCTC       :961
321:  T A G Y V D G V A A P A V V D G A A A P                               :340

962:  CTGCTGTCTACCATGATTCCGTTAGCTCCTGGTTATGTTGATGGTGTTTACCACGGTGGT       :1020
341:  A V Y H D S V A P G Y V D G V Y H G G                               :360

1021: GTAGTCCCGCTACGTCGATGGTGTATCTGCTGGCTATGTCGGAGGTGCCTGGCCCTG       :1079
361:  V A P A Y V D G V S A G Y V G G A W P C                               :380

1080: CCATTGCTAA                               :1089
381:   H C *

```

### Reivindicações

Composições Microbicidas, Processos para sua Obtenção, Construções  
Gênicas, Processos para o Controle de Pestes

- 5 1. Processo para obtenção de composições microbicidas **caracterizado por**  
compreender as etapas de:
- a) Isolamento e purificação de peptídeos e/ou proteínas presentes no envoltório protetor de ovos;
  - b) Isolamento dos fatores solúveis presentes no envoltório protetor de ovos;
- 10 c) Preparação do extrato bruto do envoltório protetor de ovos.
2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato** de que os referidos peptídeos e proteínas são provenientes do envoltório protetor de *Rhodnius prolixus*, *Aedes aegypti*, *Culex sp* e/ou *Anopheles gambiae*.
- 15 3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato** de que o referido isolamento das proteínas presentes no envoltório protetor de ovos é realizado através de eletroforese.
- 20 4. Processo, de acordo com as reivindicações 1 a 3, **caracterizado pelo fato** de que as proteínas extraídas são aplicadas em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes.
5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato** de que o referido isolamento dos peptídeos presentes no envoltório protetor de ovos é realizado através de tratamento térmico na faixa de 70°C a 150°C, e preferencialmente a 100°C.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato** de que o referido isolamento dos fatores solúveis presentes no envoltório protetor de ovos é realizado através de cromatografia líquida de alta pressão.
- 5 7. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo fato** de que a referida preparação do extrato bruto de envoltório protetor de ovos é realizada após a eclosão das larvas.
- 10 8. Processo, de acordo com as reivindicações 1 e 7, **caracterizado pelo fato** de que o envoltório protetor é macerado em água destilada estéril.
9. Processo, de acordo com as reivindicações 1 e 7, **caracterizado pelo fato** de que o extrato bruto de envoltório protetor é estocado em temperatura na faixa de -20°C a 10°C, e preferencialmente a -4°C.
- 15 10. Composição microbicida **caracterizada por** compreender pelo menos um peptídeo e/ou proteína obtida do envoltório protetor de ovos de insetos.
- 20 11. Composição, de acordo com a reivindicação 10, **caracterizada pelo fato** de que os referidos peptídeos e/ou proteínas são provenientes de envoltório protetor de *Rhodnius prolixus*, *Aedes aegypti*, *Culex sp* e/ou *Anopheles gambiae*, ou combinações dos mesmos.
- 25 12. Construção gênica **caracterizada por** compreender, ligada funcionalmente a um promotor funcional em eucariotos e/ou procariotos, de ao menos parte da seqüência codificante de ao menos parte substancialmente funcional como microbicida, de uma proteína do envoltório protetor de ovos de insetos.

13. Construção gênica, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizada pelo fato** de que a referida proteína é Rp45 de *Rodnius prolixus*.
- 5 14. Processo de controle de pestes **caracterizado por** compreender a aplicação, a um alvo que se deseja eliminar e/ou prevenir a presença de microrganismos, de uma composição compreendendo pelo menos um peptídeo e/ou proteína obtida do envoltório protetor de ovos de insetos.
- 10 15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado pelo fato** de que os referidos peptídeos e proteínas são provenientes de envoltório protetor de *Rhodnius prolixus*, *Aedes aegypti*, *Culex sp* e/ou *Anopheles gambiae* ou combinações dos mesmos.

FIGURAS

Figura 1

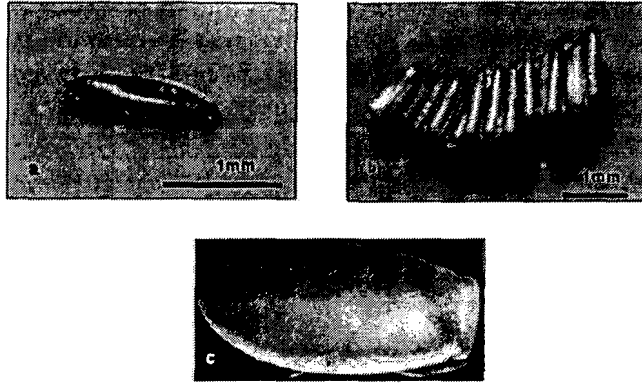


Figura 2

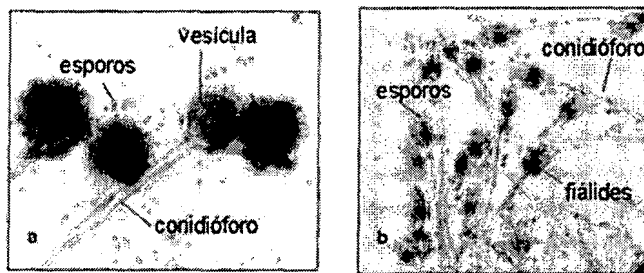


Figura 3

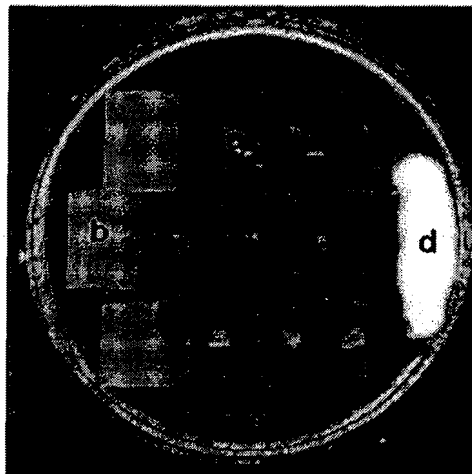


Figura 4

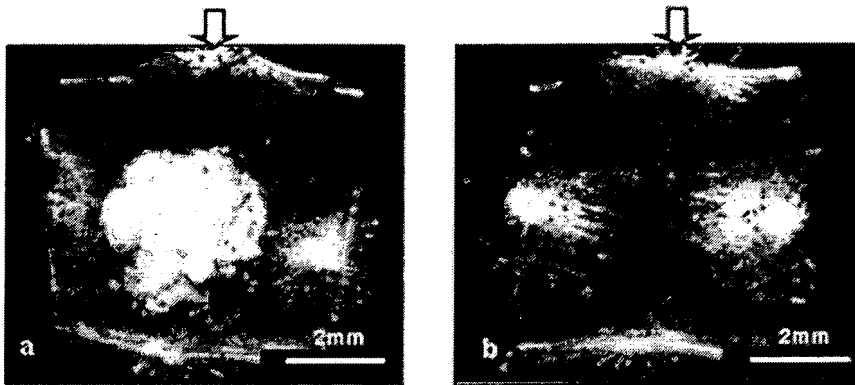


Figura 5

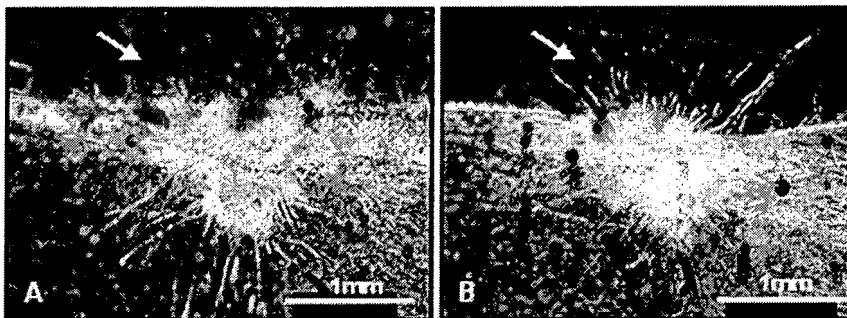


Figura 6

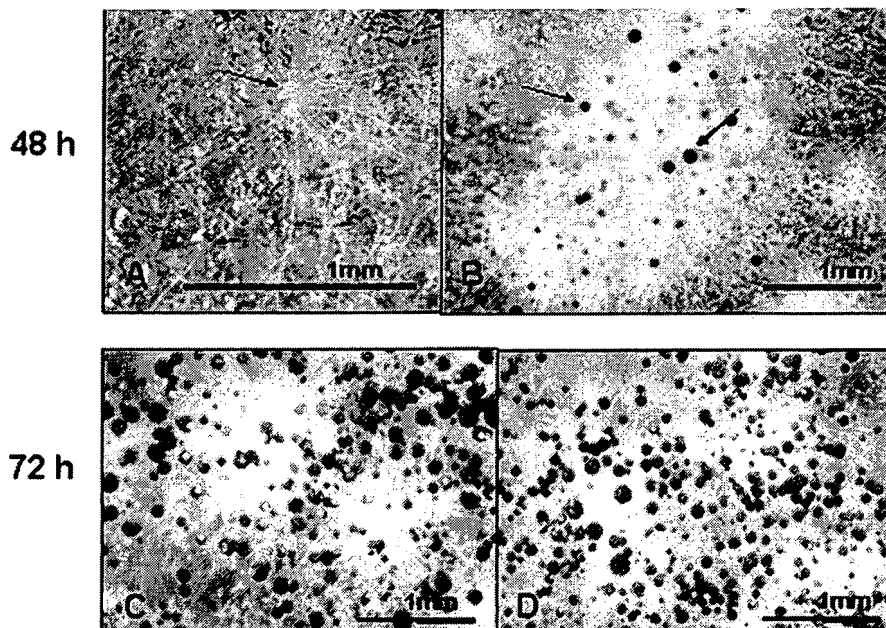


Figura 7

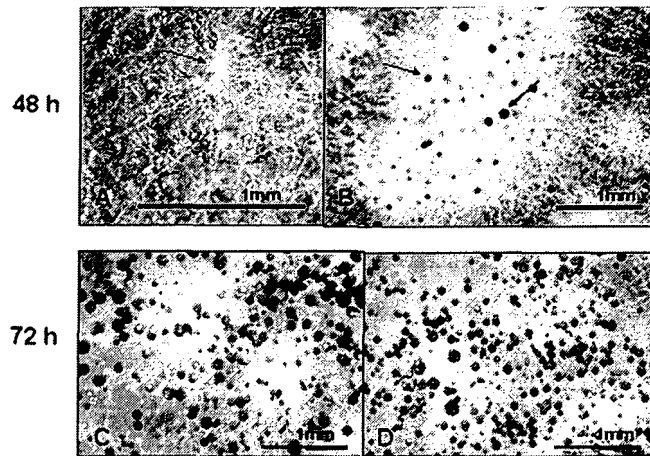


Figura 8

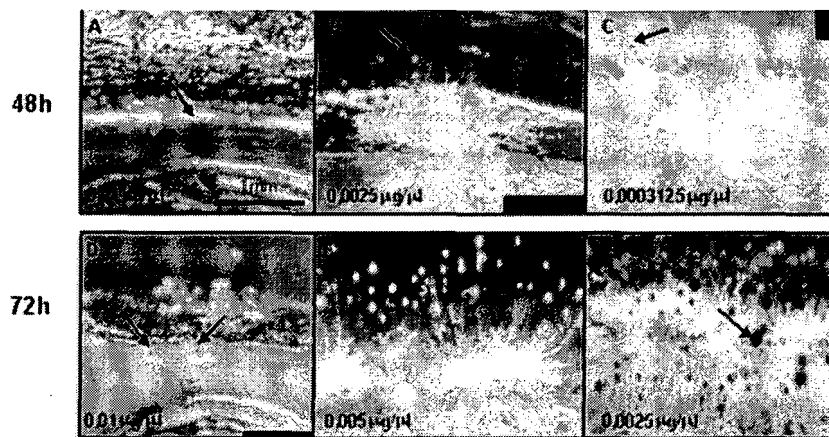


Figura 9

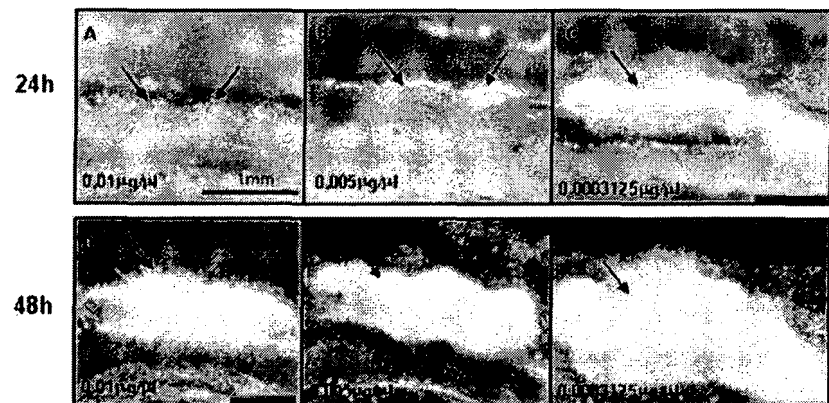


Figura 10

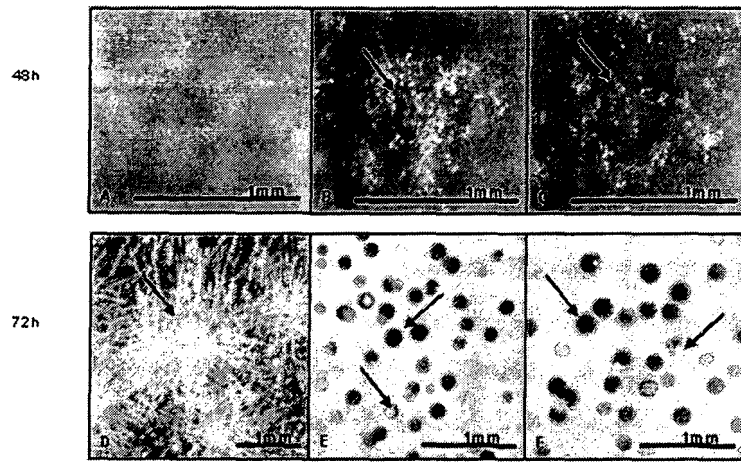


Figura 11

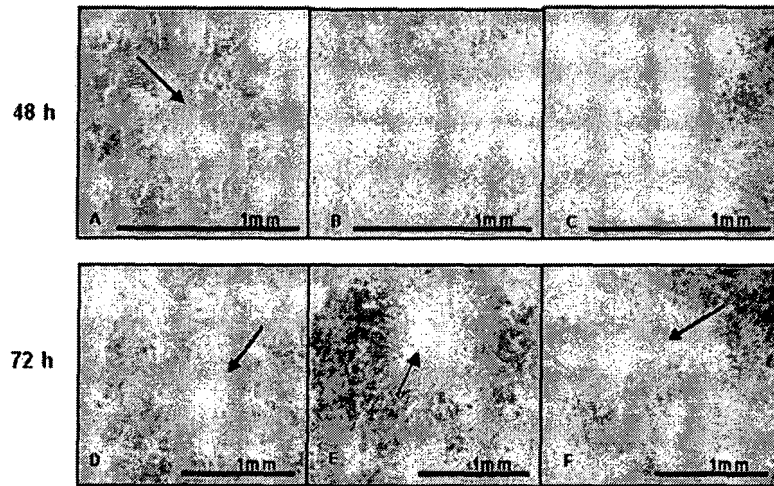


Figura 12

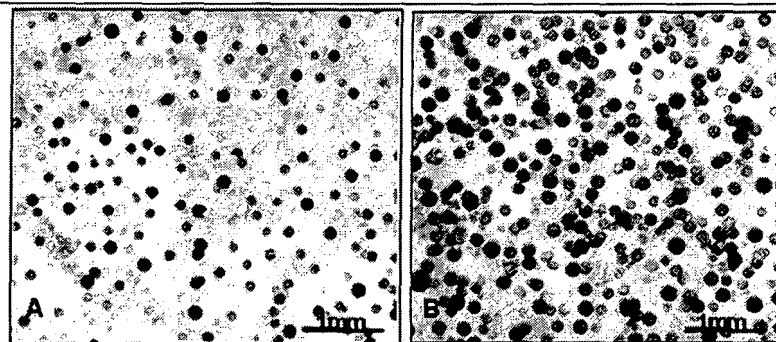




Figura 13

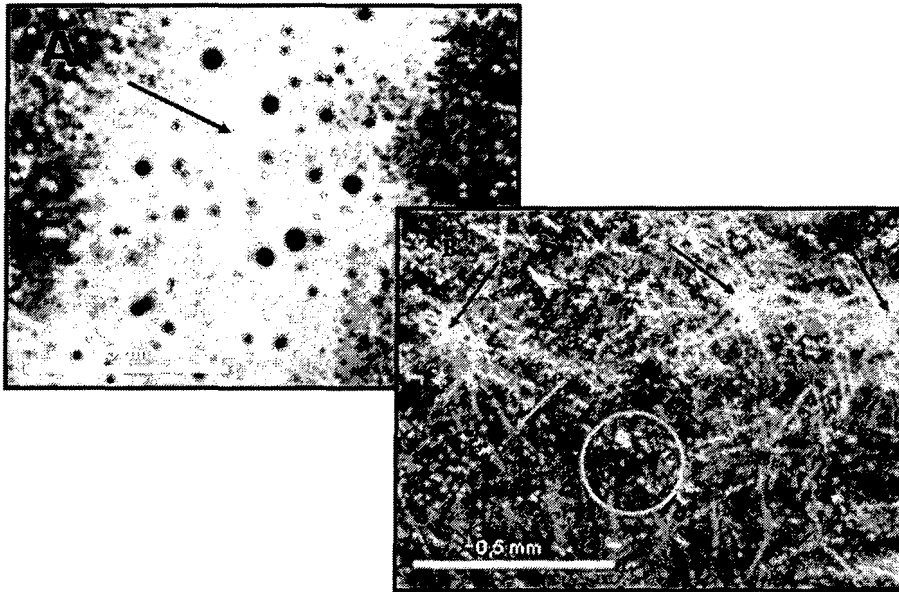


Figura 14

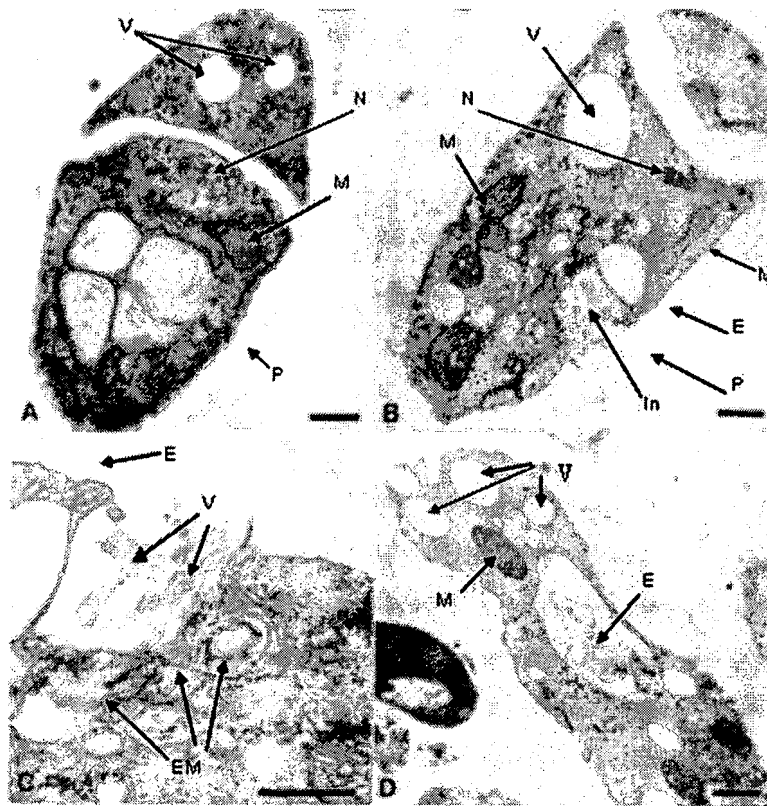


Figura 15

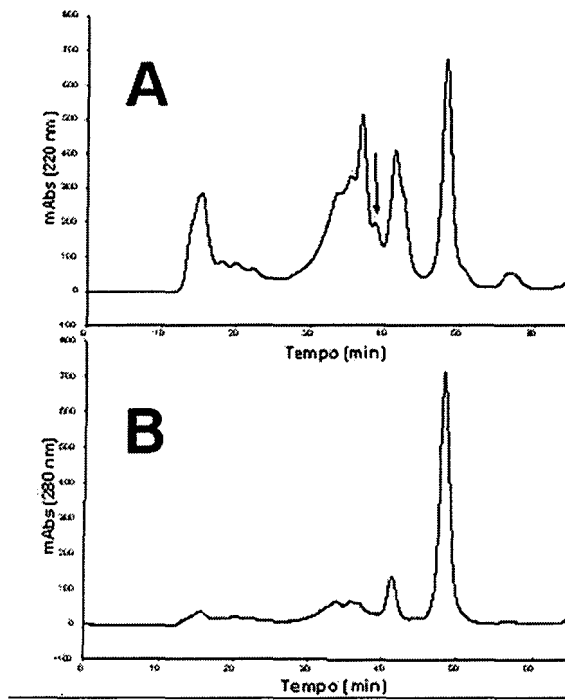


Figura 16

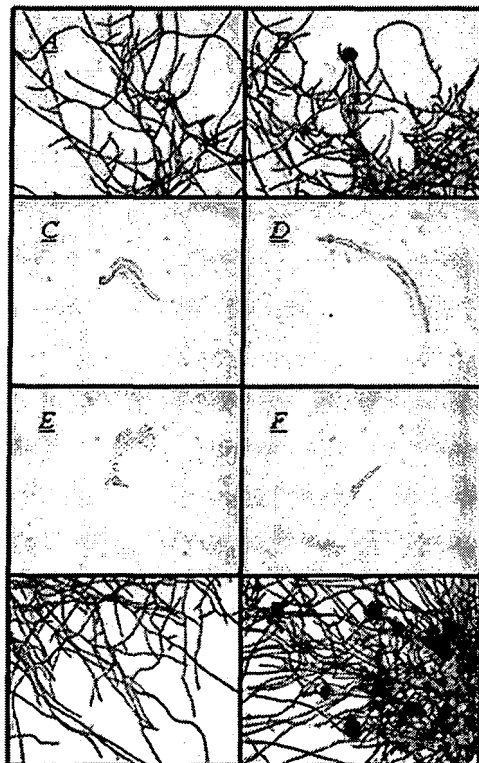


Figura 17

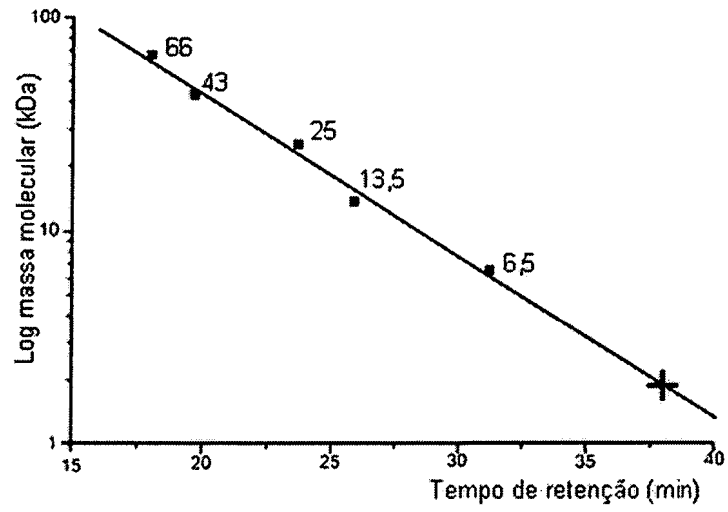


Figura 18

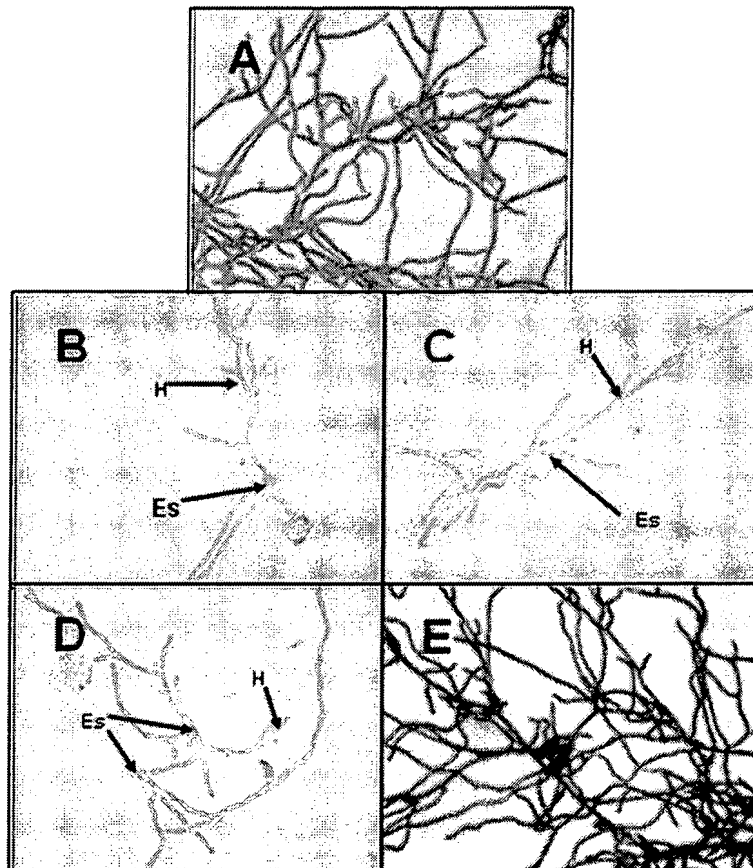


Figura 19

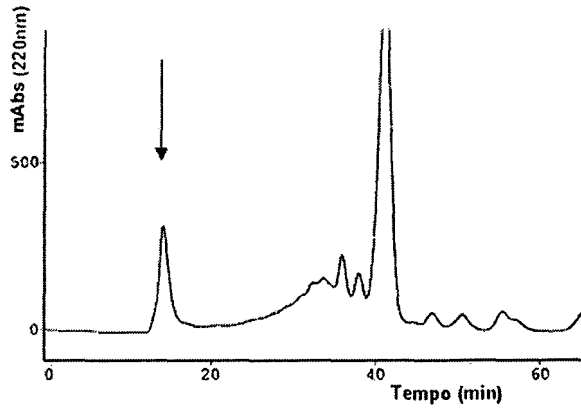


Figura 20

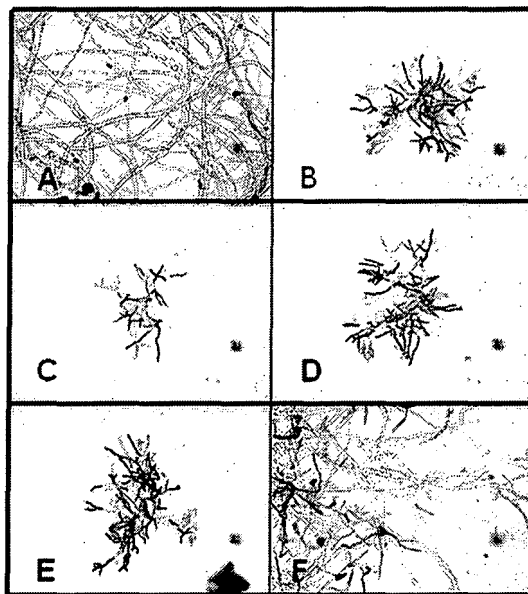


Figura 21

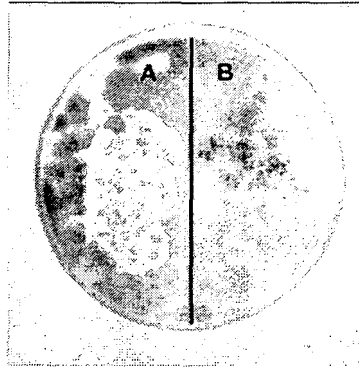


Figura 22

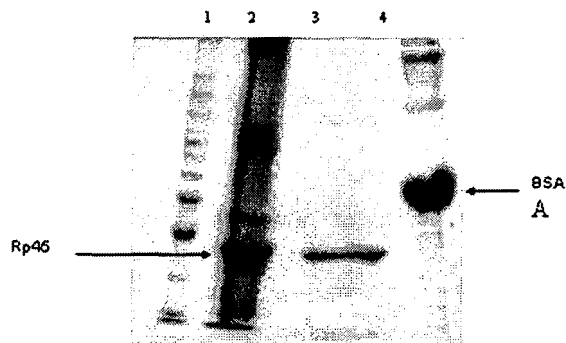


Figura 23

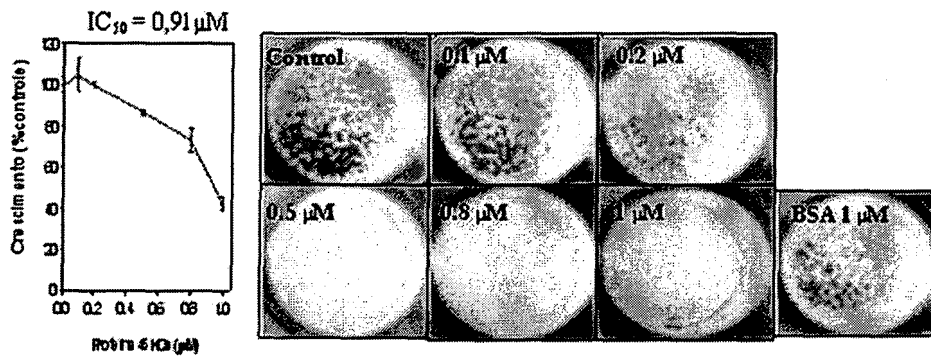


Figura 24

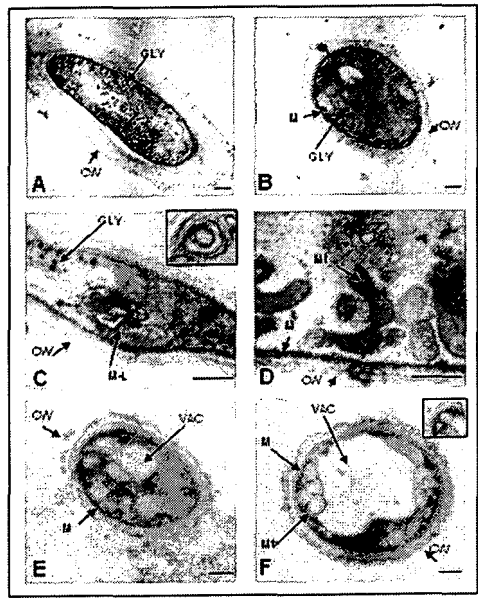


Figura 25

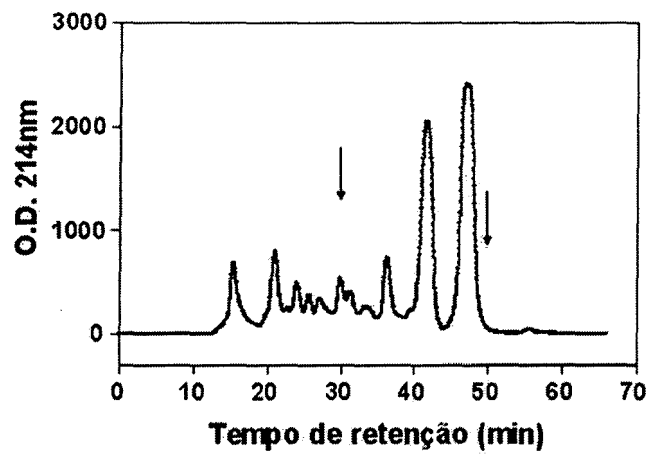


Figura 26

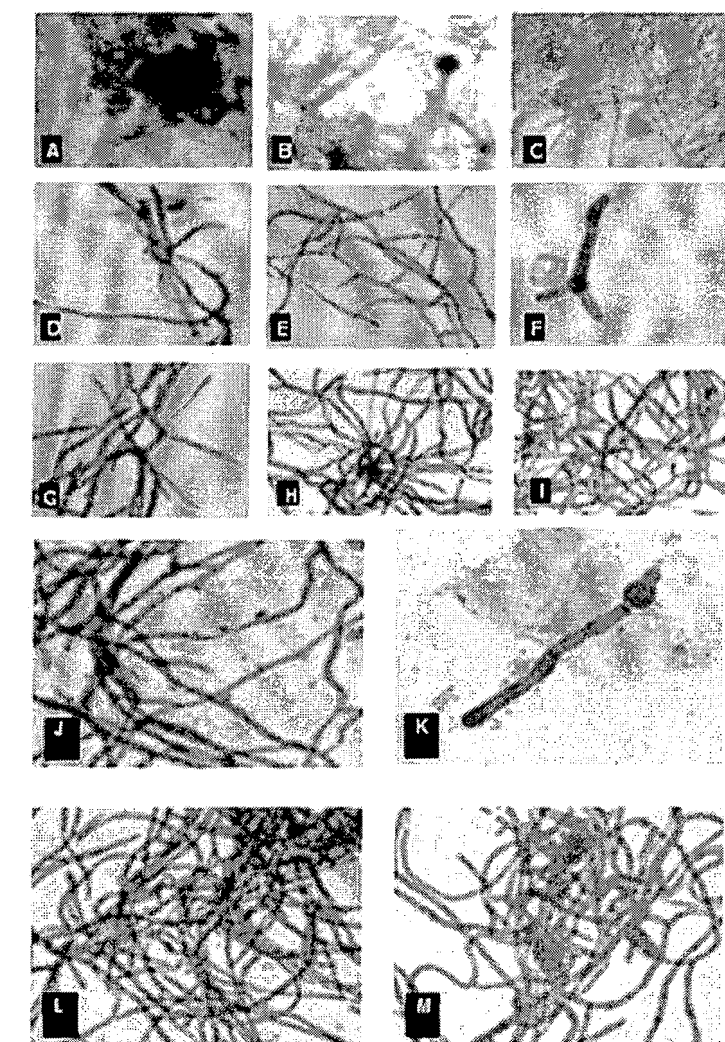


Figura 27

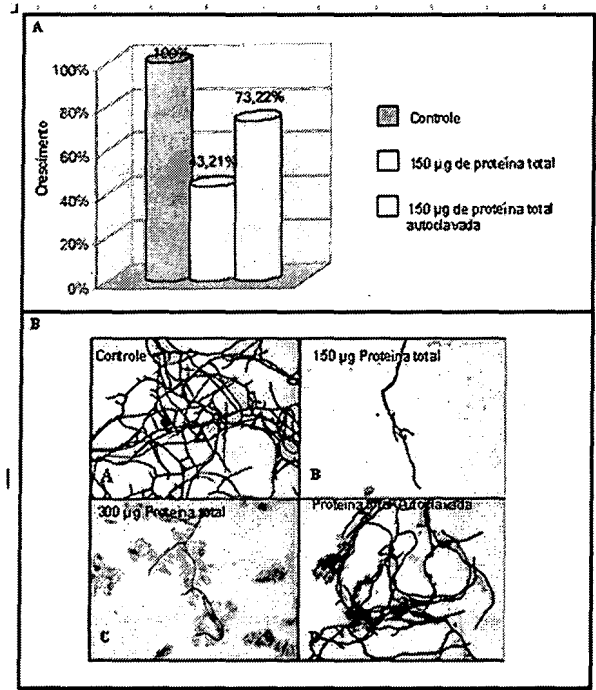


Figura 28

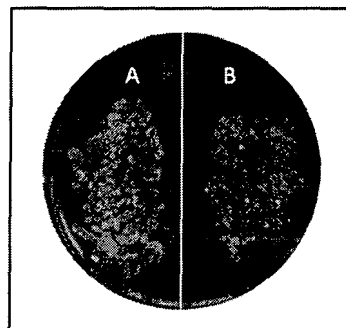
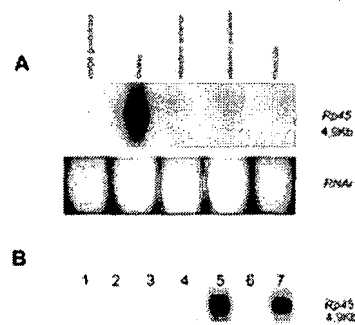


Figura 29





### Resumo

Composições Microbidas, Processos para sua Obtenção, Construções  
Gênicas, Processos para o Controle de Pestes

5 A presente invenção é relacionada a fatores antimicrobianos extraídos  
de envoltórios protetores (cascas) de ovos de insetos. A maioria destes fatores  
compreende peptídeos e/ou proteínas obtidas de tais envoltórios e/ou de seus  
respectivos genes codificantes, em construções gênicas artificiais. São  
descritas composições microbidas e processos para sua obtenção, bem como  
10 construções gênicas e processos para o controle de pestes.