

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

Inibidores protéicos e seu potencial uso no controle de insetos-praga de importância para a cultura do café e do feijão

RAILENE DE AZEVEDO PEREIRA

Brasília - 2005

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR**

Inibidores protéicos e seu potencial uso no controle de insetos-praga de importância para a cultura do café e do feijão

RAILENE DE AZEVEDO PEREIRA

Orientação: Dr^a. Maria Fátima Grossi de Sá

Tese apresentada ao Departamento de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do grau de doutor em Biologia Molecular

Brasília – 2005

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco – Universidade Católica de Brasília.

Dr. Thales Lima Rocha – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Prof^a. Dr^a. Ildinete Silva Pereira – Universidade de Brasília.

Prof^a. Dr^a. Maria Sueli Felipe – Universidade de Brasília.

Prof^a. Dr^a. Maria Fátima Grossi de Sá – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Dr^a. Liziane Maria de Lima – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Suplente).

*Ao meu esposo, Alexandre e ao
meu filho, Alexandre Filho, pela
compreensão e amor.*

Aos meus pais, Rainel Pereira e Francisca Marilene, pelo amor e pelos ensinamentos de vida.

Aos meus irmãos, Rainel e Raissa, pelo respeito, cumplicidade e carinho.

Ao meu sogro, José Luiz e a minha sogra, Socorro, que me acolheram como filha.

AGRADECIMENTOS

A Prof. Dra. Maria Fátima Grossi de Sá pela orientação, credibilidade e incentivo durante a realização deste trabalho.

Ao João Aguiar e ao Osmundo Brilhante pelos ensinamentos iniciais na Biologia molecular e pela grande amizade firmada. Vocês serão sempre lembrados.

A toda minha família, por acreditarem em mim e por estarem presentes no momento em que eu mais precisei. Em especial aos meus cunhados, Júnior, Elizabete e Artur, e aos meus sobrinhos Luis Felipe, Maria Júlia e Rafael.

A Liziane amiga, irmã, conselheira... Em fim, a você meu muitíssimo obrigado. Nada que eu fale será suficiente para mostrar a minha gratidão.

A amiga Ana, sua presença trouxe grandes alegrias.

Ao Claudinho e ao Edson, pela amizade e por todas as contribuições.

Aos amigos queridos, Fernanda, Janaína, Mariana e Rodriguinho, Edson, Simoni, Paula e Antônio, Rodrigo e Isabela, Karina e Bobó, pela amizade e companheirismo.

Aos amigos pesquisadores do lab. 5, Cristina, Thales, Marise e Norma, pelos ensinamentos.

Aos colegas do lab. 5, Marília, Luana, Luciane, Patrícia, Isabela, Charles, Francine, Rafael e Márcia, Cleiton, Djair, Brenner, Aulus, Fabíola, Maria, César, Gustavo, Keline, Kilvia, Raquel, Érico, Naiara, Priscila, Maíra e Helí.

A Sineide e a Lecir pelo apoio ao longo desses anos.

A Marta e aos seus filhos, Leo, Tatá e Nenên, por ter me acolhido com muito carinho.

A todos os colegas do Laboratório de Espectrometria de Massa. Em especial ao Dr. Carlos Bloch, pela confiança.

A Maura e ao Jorge, pelos ensinamentos e pela querida amizade.

Ao Arnubio, pela colaboração e amizade.

A todos os professores da Biomol pelos ensinamentos.

Aos amigos Prof. Maurício Sales e Adeliana.

Ao IAPAR juntamente a Ana Meneguim, colaboração.

Aos coordenadores da pós Prof. Renato, Prof. Ximenez e Prof. Bergmman nas suas gestões.

A Ana, secretária da pós, pela ajuda necessária.

E a todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES).
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
- Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília.
- Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen/EMBRAPA).

LISTA DE FIGURAS	
Figura 01: Produção do café.....	3
Figura 02: Exemplos de algumas pragas e patógenos que atacam o café.....	7
Figura 03: Diferentes estágios de maturação do café.....	8
Figura 04: Diferentes estágios de desenvolvimento da broca-do-café.....	9
Figura 05: Detalhes do ciclo biológico da broca-do-café nos frutos.....	10
Figura 06: (A) <i>C. maculatus</i> , (B) <i>A. obtectus</i> e (C) <i>Z. subfasciatus</i>	15
Figura 07: Processamento dos inibidores de α -amilases de feijão comum.....	22
Figura 08: Subclonagem do gene α AI-Pc1 em vetor de expressão pTA2.....	48
Figura 09: Introdução do fragmento de aproximadamente 1300 pb no vetor binário pCAMBIA 1390.....	49
Figura 10: Subclonagem do gene α AI-Pc1 em vetor de expressão p α AI1tocs.....	51
Figura 11: Introdução do fragmento de 1950 pb no vetor pCAMBIA 2300.....	52
Figura 12: Análise do produto da PCR em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1%.....	57
Figura 13: Seqüência nucleotídica e seqüência protéica predita do α AI-Pc1.....	60
Figura 14: Alinhamento protéico do inibidor α AI-Pc1 com outras seqüências de inibidores de α -amilases, arcelinas e fitohemaglutininas feijão.....	61
Figura 15: Dendrograma resultante do alinhamento protéico do inibidor α AI-Pc1 com os inibidores de α -amilases, arcelinas e fitohemaglutininas de feijão.....	62
Figura 16: Análise por PCR das plantas de fumo transformadas com gene α AI-Pc1.....	63
Figura 17: Análise da proteína recombinante por Western Blot do extrato protéico de semente de planta de fumo.....	64
Figura 18: Quantificação por ELISA da proteína recombinante α AI-Pc1 em sementes de plantas de fumo transformadas.....	66
Figura 19: Inibição das α -amilases de <i>H. hampei</i> pela proteína recombinante α AI-Pc1 expressa em sementes das 14 plantas de fumo transformada.....	68
Figura 20: Inibição das α -amilases de <i>H. hampei</i> pela proteína recombinante α AI-Pc1 expressa em sementes de um transformante com nível de expressão de 0,05%.....	69
Figura 21: Inibição da PPA pela proteína recombinante α AI-Pc1 expressa em sementes de um transformante com nível de expressão de 0,05%.....	70
Figura 22A: Perfil protéico da F ₀₋₆₀ submetida à cromatografia de troca iônica em DEAE-	

Celulose.....	85
Figura 22B: SDS-PAGE corado com <i>comassie brilliant blue</i> das frações eluídas da DEAE-Celulose.....	85
Figura 23A: Cromatografia de filtração molecular em Superdex 75 a partir da fração IIID.....	86
Figura 23B: SDS-PAGE corado com <i>comassie brilliant blue</i> da fração eluída da Superdex 75.....	86
Figura 24A: Perfil cromatográfico da fração IM em coluna líquida de alta pressão (Vydac C18).....	87
Figura 24B: Perfil cromatográfico da fração IIIC em coluna líquida de alta pressão (Source).....	87
Figura 25: Análise da massa molecular do inibidor purificado PcBBI1.....	89
Figura 26: Alinhamento do inibidor PcBBI1 com outros IBBs.....	91
Figura 27: Espectro de massa do inibidor PcBBI1 por Q-TOF.....	92
Figura 28: Atividade inibitória do inibidor PcBBI1 em diferentes pHs.....	95
Figura 29: Inativação térmica do inibidor PcBBI1.....	96
Figura 30: Inibição da atividade trípica das proteinases de larvas de <i>H. hampei</i> (HhP) pelo inibidor PcBBI1.....	97
Figura 31: Atividade anti-papainásica das frações protéicas ExB, F0-30, F30-60 e F60-90.....	110
Figura 32: Perfil de eluição de F30-60 em cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200.....	111
Figura 33: Percentual da atividade anti-papainásica das frações FI1, FI2 e FI3.....	112
Figura 34: Perfil de eluição de FI3 em coluna líquida de alta pressão (Vydac C18).....	113
Figura 35A: Análise eletroforética das frações obtidas nos vários passos de purificação do inibidor de proteinase.....	115
Figura 35B: Espectrometria de massa (MALDI-TOF) do inibidor Pj.....	115
Figura 36A: Ensaio inibitório do inibidor Pj em gel de poliacrilamida contendo gelatina a 0,1%.....	119
Figura 36B: Ensaio inibitório do inibidor Pj em gel de poliacrilamida sem gelatina.....	119
Figura 37: Inibição da atividade da papaína pelo Inibidor Pj.....	120
Figura 38: Determinação do valor de K_i do inibidor Pj contra a papaína.....	121

LISTA DE TABELAS	
Tabela 01: Café - Safra.....	4
Tabela 02: Purificação do inibidor de proteinase Bowman-Birk de <i>P. coccineus</i> - PcBBI1..	88
Tabela 03: Atividade inibitória do inibidor PcBBI1 para diferentes proteinases.....	94
Tabela 04: Purificação do inibidor tipo Kunitz ativo contra proteinases cisteínicas.....	114
Tabela 05: Sequência de aminoácidos da extremidade N-terminal do inibidor Pj	116
Tabela 06: Atividade inibitória do inibidor Pj contra diferentes proteinases.....	117

LISTA DE ABREVIATURAS	
Abs	Absorbância
Amp ^R	Gene de resistência a ampicilina
BSA	Albumina sérica bovina
BapNA	α -Benzil-DL-arginine- ρ -nitroanilide
°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
cm	Centímetro
C-terminal	Extremidade carboxi-terminal
Da	Daltons
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfato
DMSO	Dimethylsulfoxide
DO	Densidade ótica
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	Gramma
HCL	Ácido clorídrico
IP	Inibidor de proteinase
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
NaCl	Cloreto de sódio
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Litro
M	Molar
mL	Mililitros
mg	Miligramas
mM	Milimolar
Mw	Massa molecular
N	Normaol
ng	Nanograma
nm	Nanômetro

pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato de sódio
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomoles
p/v	Peso/volume
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida desnaturante com SDS
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Tri (hidroximetil) aminometano
UA	Unidade de atividade
UI	Unidade de inibição
α AI	Inibidor de α -amilase
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ M	Micromolar

SUMÁRIO	
1-INTRODUÇÃO.....	1
1.1-CAFÉ E FEIJÃO: CULTIVARES DE GRANDE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	2
1.1.1-A CULTURA DO CAFÉ.....	2
1.1.1.1-Café: Principais cultivares e características.....	5
1.1.1.2-Pragas e patógenos que infestam o café.....	6
1.1.1.3-Broca-do-café.....	7
1.1.1.4-Controle da broca-do-café.....	11
1.1.2-A CULTURA DO FEIJOEIRO.....	12
1.1.2.1- Principais insetos-praga de feijão armazenado.....	13
1.1.2.2-Métodos de controle de pragas de feijão.....	15
1.2-PROTEÍNAS VEGETAIS COM PODER INSETICIDA.....	17
1.2.1-INIBIDORES DE α -AMILASES.....	18
1.2.1.1- Inibidor de α -amilase tipo lectina.....	19
1.2.2-INIBIDORES DE PROTEINASES.....	22
1.2.2.1-Inibidores de proteínases serínicas.....	23
1.2.2.1.1-Inibidor do tipo Bowman-Birk.....	24
1.2.2.2 - Inibidores de proteinases cisteínicas.....	27
1.2.3-PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS EXPRESSANDO INIBIDORES.....	30
2-APRESENTAÇÃO.....	34
3-OBJETIVOS.....	36
3.1-OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
CAPÍTULO I	
1-ABSTRACT.....	37
2-RESUMO.....	38
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1-MATERIAIS.....	39
3.1.1-MATERIAL BIOLÓGICO.....	39

3.1.2-ENZIMAS.....	39
3.1.3-SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	39
3.1.4-REAGENTES.....	42
3.1.5-LINHAGEM BACTERIANA.....	43
3.1.6-PLASMÍDEOS.....	43
3.1.7-MEIOS DE CULTURA.....	43
3.1.8-ANTIBIÓTICOS.....	44
3.2-METODOLOGIA.....	45
3.1-CLONAGEM DO GENE αAI-Pc1.....	45
3.2.2-SEQÜENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE α AI-Pc1.....	45
3.2.3-INSERÇÃO DO GENE α AI-Pc1 EM VETORES DE EXPRESSÃO DE PLANTAS.	46
3.2.3.1-Vetor pCAMBIA 1390 para transformação de plantas de fumo.....	46
3.2.3.2-Vetor pCAMBIA 2300 para transformação de plantas de café.....	50
3.2.4-TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE FUMO.....	53
3.2.5-ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES.....	53
3.2.5.1-Análise por PCR	53
3.2.5.2-Análise da frequência de transformação.....	54
3.2.5.3-Extração protéica.....	54
3.2.5.4-Western blot.....	54
3.2.5.5-Ensaio Imuno Enzimático – ELISA.....	55
3.2.5.6-Atividade inibitória da proteína recombinante α AI-Pc1 e extração das enzimas digestivas da broca-do-café.....	56
4-RESULTADO E DISCUSSÃO.....	57
4.1-CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE αAI-Pc1.....	57
4.2-ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES.....	62
4.2.1-ANÁLISE POR PCR.....	62
4.2.2-WESTERN BLOT.....	63
4.2.3-ENSAIO IMUNO ENZIMÁTICO – ELISA.....	64
4.2.4-ENSAIO DE ATIVIDADE INIBITÓRIA DE α -AMILASE.....	66

CAPÍTULO II	
1-ABSTRACT	71
2-RESUMO	72
3-MATERIAIS E MÉTODOS	73
3.1-MATERIAIS	73
3.1.1-MATERIAL BIOLÓGICO.....	73
3.1.2-ENZIMAS.....	73
3.1.3-SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	73
3.1.4-REAGENTES.....	76
3.1.5-CROMATOGRAFIAS.....	76
3.2-METODOLOGIA	77
3.2.1-PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR DE TRIPSINA TIPO BOWMAN-BIRK DE <i>Phaseolus coccineus</i>	77
3.2.1.1-Obtenção do extrato protéico a partir de sementes de feijão.....	77
3.2.1.2-Cromatografia de troca iônica em DEAE-Cellulose.....	77
3.2.1.3-Cromatografia de filtração molecular em Superdex 75.....	77
3.2.1.4-Cromatografia líquida de alta pressão em Vydac C18 TP 54.....	78
3.2.1.5-Cromatografia líquida de alta pressão em Source 5RPC ST 4.6/150.....	78
3.2.2-DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	78
3.2.3-EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DE INSETOS.....	79
3.2.4-ENSAIO <i>in vitro</i> DO INIBIDOR PCBBI1.....	79
3.2.5-ENSAIO DE TERMOESTABILIDADE.....	80
3.2.6-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA EM DIFERENTES pHs.....	80
3.2.7-ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	80
3.2.7.1-Coramento com <i>comassie brilliant blue</i> do gel de poliacrilamida.....	81
3.2.7.2-Revelação com nitrato de prata do gel de poliacrilamida.....	81
3.2.8-REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DO INIBIDOR PcBBI1.....	81
3.2.9-ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	82
3.2.10-SEQÜENCIAMENTO DO N-TERMINAL PELO MÉTODO DE DEGRADAÇÃO DE EDMAN.....	83
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
4.1-PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR DE PROTEINASE TIPO BOWMAN-BIRK DE <i>Phaseolus coccineus</i>	84

4.1.1-CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA EM DEAE-CELLULOSE.....	84
4.1.2-CROMATOGRAFIA DE FILTRAÇÃO MOLECULAR EM SUPERDEX 75.....	84
4.1.3-CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO EM VYDAC C18 E EM SOURCE 5RPC.....	87
4.2-ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR DO INIBIDOR DE PROTEINASE PcBBI1.....	88
4.3-ANÁLISE DO SEQÜENCIAMENTO DO N-TERMINAL DO INIBIDOR PcBBI1.....	90
4.4-ATIVIDADE <i>in vitro</i> DO INIBIDOR PcBBI1.....	92
CAPÍTULO III	
1-ABSTRACT.....	98
2-RESUMO.....	99
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	100
3.1-MATERIAIS.....	100
3.1.1-MATERIAL BIOLÓGICO.....	100
3.1.2-ENZIMAS.....	100
3.1.3-SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	100
3.1.4-REAGENTES.....	102
3.1.5-CROMATOGRAFIAS.....	102
3.2-METODOLOGIA.....	103
3.2.1-PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR DE PAPAÍNA DE SEMENTES DE ALGAROBA.	103
3.2.1.1-Obtenção do extrato protéico a partir das sementes secas de algaroba.....	103
3.2.1.2-Cromatografia de filtração molecular em Sephacryl S-200.....	103
3.2.1.3- Cromatografia líquida de alta pressão em Vydac C18	104
3.2.2-DOSAGEM DE PROTEÍNAS.....	104
3.2.3-ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	104
3.2.4-ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA.....	104
3.2.5-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-PAPAINÁSICA.....	105
3.2.6-EXTRAÇÃO DAS PROTEINASES DAS LARVAS DE INSETOS E DOS NEMATÓIDES.....	106
3.2.7-ENSAIO <i>in vitro</i> DO INIBIDOR Pj CONTRA OS EXTRATOS PROTÉICOS DAS LARVAS DOS INSETOS E NEMATÓIDES.....	106

3.2.8-ENSAIO <i>in vitro</i> DA ATIVIDADE DO INIBITÓRIA DO INIBIDOR Pj CONTRA PROTEINASES SERÍNICAS.....	107
3.2.9-ENSAIO DA ATIVIDADE DA PAPAINA EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO 0,1% DE GELATINA.....	107
3.2.10-ENSAIO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS	108
3.2.11-ANÁLISE CINÉTICA DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DO INIBIDOR Pj.....	108
3.2.12-SEQÜENCIAMENTO DO N-TERMINAL PELO MÉTODO DE DEGRADAÇÃO DE EDMAN.....	109
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	110
4.1-PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR TIPO KUNITZ DE SEMENTE DE ALGAROBA ATIVO CONTRA PROTEINASES CISTEÍNICAS.....	110
4.1.1-OBTENÇÃO DO EXTRATO PROTÉICO COM ATIVIDADE INIBITÓRIA.....	110
4.1.2-CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO MOLECULAR EM SEPHACRYL S-200....	111
4.1.3-CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA PRESSÃO EM VYDAC C18.....	112
4.2-ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR DO INIBIDOR POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS (SDS-PAGE) E MALDI-TOF.....	114
4.3-ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO DO N-TERMINAL DO INIBIDOR Pj.....	116
4.4-ATIVIDADE INIBITÓRIA DO INIBIDOR Pj PARA VÁRIAS PROTEINASES.	116
4.5-ENSAIO DA ATIVIDADE ANTI-PAPAINÁSICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA.....	118
4.6-MECANISMO DE INIBIÇÃO DO INIBIDOR Pj.....	119
4-DISCUSSÃO.....	122
5-CONCLUSÃO.....	125
6-PESPECTIVA.....	126
7-REFERÊNCIAS.....	127
8-ANEXOS	

1-ABSTRACT

Plant α -amylase and proteinases inhibitors are extensively studied, in part due to their role as defense factors against insect pests. In this works, we have identified α -amylase and proteinase inhibitors, found in of *Phaseolus coccineus* bean and algaroba (*Prosopis juliflora*) seeds. Those molecules exhibit an insecticidal potential in the control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and pests from stored grains of beans *Acanthoscelides obtectus* and *Callosobruchus maculatus*

A gene encoding an α -amylase inhibitor protein of 223 amino acids residues, named α AI-Pc1, was isolated from an wild bean *P. coccineus*, acess 35590. α AI-Pc1 has 70-98% amino acid identity with other known bean α -amylase inhibitors. A construction with α AI-Pc1 gene driven by the PHA-L phytohemagglutinin promoter was introduced into tobacco plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. The presence and expression of the α AI-Pc1 gene in regenerated (T0) and progeny (T1) transformant plants were determined by PCR amplification, enzyme-liked immuno sorbent assay (ELISA) and immunoblot analysis. Seed protein extracts from selected transformant reacted positively with polyclonal antibody raised against α AI-1, while no reaction was observed with untransformed plants. Immunological assays showed that α AI-Pc1 represented up to 0.05% of the total soluble proteins in seeds of T0 plants. The recombinant inhibitor expressed in tobacco plants was biologically active and 125 ng α AI-Pc1 inhibited 65% of the *H. hampei* α -amylase activity.

A serine proteinase inhibitor belonging to the Bowman-Birk class was purified from *P. coccineus* seeds, acess 35619, using chromatographic techniques that include DEAE-Cellulose ionic exchange column, Superdex 75 gel filtration column and reverse phase high performance liquid chromatography column (Vydac C-18 and Source 5RPC). The inhibitor, nominated PcBBI1, is a protein cystein-rich and heat stable at alkaline pH MALDI-TOF/MS analysis showed that the inhibitor is present in the seeds from *P. coccineus* as a monomer of 8.689 Da or a dimmer of 17.378 Da. The inhibitory effect of PcBBI1 towards trypsin and chymotrypsin from bovine pancreas and digestive proteinases from *H. hampei* larvae was analyzed in vitro assay. The inhibitor was highly active against trypsin-like enzymes from *H. hampei*, inhibiting 80% of proteolytic activity.

Additionally, a proteinaceous inhibitor with high activity against papain was found in seeds of the xerophytic algaroba tree (*Prosopis juliflora*). The proteinase inhibitor Pj was purified using Sephacryl S-200 gel filtration followed by reverse-phase high-performance

liquid chromatography on a Vidac 18 TP. Inhibitor Pj showed a M_r of 20.000 on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and a M_r of 19.276 Da by mass spectrometry. The inhibition of papain by the Pj inhibitor was the noncompetitive type, with a K_i value of 0.59×10^{-9} M. The gelatinase activity of papain was strongly inhibited by Pj too. The N-terminal amino acid sequence of the Pj inhibitor showed homology with the N-terminal amino acid sequence of the Kunitz-proteinase inhibitor family. Pj was strongly effective against digestive proteinases from bean weevil *Acanthoscelides obtectus* and cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* and Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. The data shown here suggest that the protein present in algaroba seeds is involved with defense responses to insects and may be an important tool to be used in engineering plants resistant to bean weevils.

RESUMO

Os inibidores de α -amilase e de proteinases vegetais tem sido amplamente estudados, devido ao papel destes fatores de resistência contra insetos-praga. Este trabalho tem como objetivo identificar inibidores de α -amilase e de proteinases, presentes em sementes de *Phaseolus coccineus* e sementes de algaroba (*Prosopis juliflora*), com potencial inseticida no controle da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) e de pragas de grãos armazenados de feijão *Acanthoscelides obtectus* e *Callosobruchus maculatus*.

Um gene que codifica para o inibidor de α -amilase de 223 resíduos de aminoácidos, denominado α AI-Pc1 foi clonado de sementes de *Phaseolus coccineus*, acesso 35590. α AI-Pc1 tem 70 a 98% de identidade de aminoácidos com outros inibidores de α -amilases de feijão, já descritos. Uma construção contendo o gene α AI-Pc1, regulado pelo promotor da fitohemaglutinina PHA-L, foi introduzida em plantas de fumo, via *Agrobacterium tumefaciens*. A presença e expressão do gene α AI-Pc1 em plantas transformadas (parental T0 e geração T1) foi confirmada por reação de cadeia da polimerase (PCR), Western blot e ELISA. Extrato protéico das sementes de plantas transformadas reagiram positivamente com o anticorpo policlonal contra o anticorpo α AI-1, enquanto que nenhuma reação foi observada em plantas não transformadas. Ensaio imunológico mostraram que α AI-Pc1 representa cerca de 0,05% da proteína solúvel total de sementes de plantas (T0). A proteína recombinante expressa em plantas de fumo foi biologicamente ativa onde 125 ng de inibidor α AI-Pc1 inibe 65% da atividade da α -amilase de *H. hampei*.

Utilizando semente de *P. coccineus*, acesso 35619, um inibidor de proteinase serínica pertencente à classe Bowman-Birk foi purificado utilizando técnicas cromatográficas que incluem coluna de troca iônica DEAE-Cellulose, coluna de filtração molecular Superdex 75, coluna fase-reversa líquida de alta pressão Vydac C-18 e Source 5RPC. O inibidor, denominado de PcBBI1, é uma proteína rica em cisteína e estável ao calor em pH alcalino. Análises por MALDI-TOF/MS mostraram que o inibidor PcBBI1 esta presente em semente de *P. coccineus* na forma de um monômero de 8.689 Da ou de um dímero de 17.378 Da. O efeito inibitório de PcBBI1 foi analisado por ensaio *in vitro* para tripsina e quimotripsina pancreática bovina e para proteinases digestivas de larvas de *H. hampei*. O inibidor foi fortemente ativo contra as enzimas semelhantes à tripsina de *H. hampei*, inibindo 80% da atividade proteolítica.

Adicionalmente, um inibidor de proteinase cisteínica foi isolado das sementes de algaroba (*Prosopis juliflora*). Este inibidor, denominado de Pj, foi purificado usando uma coluna de filtração molecular Sephacryl S-200 seguido por uma coluna de fase-reversa líquida de alta pressão Vydac 18 TP. O inibidor Pj mostrou uma massa molecular de 20.000 Da por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e massa molecular de 19.276 Da por espectrometria de massa. A inibição da papaína pelo inibidor Pj foi do tipo não-competitivo, com um valor de K_i de 0.59×10^{-9} . A atividade gelatinásica da papaína também foi fortemente inibida pelo inibidor Pj. A seqüência de aminoácidos da extremidade N-terminal do inibidor Pj mostrou homologia com a seqüência de aminoácidos da extremidade N-terminal de inibidores de proteinase da família Kunitz. Pj foi fortemente efetivo contra proteinases digestivas do gorgulho do feijão *Acanthoscelides obtectus* e do gorgulho de caupi *Callosobruchus maculatus* e foi moderadamente ativo contra proteinases digestivas do gorgulho da vagem *Mimosestes mimosae* e do gorgulho do feijão comum *Zabrotes subfasciatus*.

Estes resultados sugerem que o inibidor α AI-Pc1 e PcBBI1 isolados de *P. coccineus* e o inibidor Pj purificado de sementes de *P. juliflora* são candidatos promissores para obter cultivares de plantas resistentes ao ataque destes insetos-praga.

1-INTRODUÇÃO

Os vegetais são importantes fontes de nutrientes, sendo considerados alimentos de qualidade para a maioria dos organismos, incluindo os seres humanos, diferentes espécies de animais e invertebrados, particularmente os insetos.

Nas últimas décadas, avanços vêm sendo feitos visando o aumento da produtividade agrícola mundial. Esta preocupação é decorrente do aumento populacional de aproximadamente 8,5 bilhões, previsto para 2025, sendo, assim, necessário um aumento de 50% da produção de alimentos para sustentar o crescimento da população (Mohan Babu *et al.*, 2003). Outro fator importante é a perda na produção agrícola devido ao ataque de pragas e patógenos, que chegam a 37%, sendo 13% desta perda causada principalmente pelo ataque de insetos-praga (Gatehouse *et al.*, 1992).

O manejo do controle de pragas de grãos armazenados envolve, principalmente, as boas condições de armazenamento e o uso de agentes químicos, que trazem benefícios mínimos com custo elevado, na ordem de bilhões de dólares. Estima-se que mais de 10 milhões de dólares sejam gastos todos os anos para o controle químico dos danos causados pelos insetos (Khush, 1999), resultando em redução de apenas 7% nas perdas causadas por estes nas culturas (Oerke *et al.*, 1994). Este tipo de controle vem gerando problemas ambientais graves, como a contaminação do solo e da água, a toxicidade sobre organismos não-alvo, o acúmulo em cadeias alimentares e problemas de saúde humana.

Uma das alternativas ao uso de agrotóxico são os biopesticidas, que compreendem o uso de predadores, parasitas e patógenos de insetos-praga. Formulações baseadas na bactéria *Bacillus thuringiensis*, uma bactéria gram-positiva que sintetiza cristais de proteínas inseticidas durante a esporulação, representa o bioinseticida mais vendido no mundo, sendo usado há mais de 50 anos no controle de insetos, principalmente lepdópteros (Musser e Shelton, 2003; Ferre e Van Rie, 2002).

A transferência gênica constitui outro método alternativo ao uso de agrotóxico para o controle de pragas e doenças, com vantagem adicional em termos de custos, bem-estar ambiental e da saúde humana. Com os avanços biotecnológicos, genes de diferentes origens e que conferem resistência a insetos podem ser introduzidos em plantas de interesse econômico para reduzir sua susceptibilidade. Os inibidores de α -amilases (α AI) e de proteinases (PI) apresentam grande potencial para serem utilizados no programa de melhoramento genético de planta. Estas proteínas, com efeito, inseticida devem ser ingeridas para tornarem efetivas, e o sítio alvo de muitas delas é o sistema digestivo do inseto. Sendo assim, estes inibidores

funcionam como substratos específicos das proteinases digestivas dos insetos, formando um complexo estável no qual a proteólise é limitada e extremamente lenta (Tiffin e Gaut, 2001), causando assim uma deficiência de resíduos de aminoácidos que influencia o crescimento e o desenvolvimento dos insetos, podendo eventualmente causar a sua morte devido à inibição das proteinases digestivas, ou devido à produção maciça destas enzimas, reduzindo a disponibilidade dos resíduos de aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas (Jongsma e Bolter, 1997; Pompermayer *et al.*, 2001). Ao tornarem mais lento o desenvolvimento dos herbívoros, estes inibidores prolongam o período em que predadores poderiam ser atraídos para as plantas atacadas por meios de compostos voláteis liberados por elas, contribuindo também, de forma indireta, no controle dos insetos (Baldwin, 2001).

1.1-CAFÉ E FEIJÃO: CULTIVARES DE GRANDE IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

1.1.1-A CULTURA DO CAFÉ

As primeiras mudas e sementes de café chegaram ao Brasil no século XVIII, por volta de 1730, vindas da América Central e Guiana. Porém, somente a partir do início do século XIX a cultura despertou interesse nos grandes proprietários. Esta se tornou rapidamente a principal atividade agrícola do país, sendo responsável por mais da metade da renda obtida com exportação. A importância econômica fez dos produtores de café, conhecidos por “Barões do café”, de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais o centro da elite do Império e da República.

Entre 1810 e 1820, os cafezais espalharam-se por todo Vale do Paraíba, primeiro na parte Fluminense, depois na parte Paulista e no Sul de Minas. Em meados do século XIX, ocuparam as terras das antigas lavouras de cana-de-açúcar e algodão e avançaram para o chamado Oeste Paulista, onde encontraram condições favoráveis de clima e solo.

No início do século XX, os cafezais cobriam extensa faixa que vai do Paraná ao Espírito Santo. A cafeicultura despontou entre as monoculturas exportadoras, desbancando a cana-de-açúcar e iniciando o ciclo econômico que foi sem dúvida a mola propulsora da urbanização e industrialização do país. Nas primeiras cinco décadas deste século o Brasil reinou no cenário mundial, respondendo, em média, por 70% da produção de café.

Nas décadas de 60, 70 e 80, o Brasil exportou entre 15 e 18 milhões de sacas de café por ano, com uma participação de 27% do volume exportado mundialmente. Na década de 90, as exportações brasileiras ficaram no mesmo patamar, porém a participação no mercado

mundial caiu, situando-se em 20% das exportações mundiais de café. Nos dez anos seguintes, o Brasil colheu, em média, cerca de 27 milhões de sacas de 60 kg por ano.

O café teve influência na cultura brasileira, e até hoje tem estimulado o desenvolvimento econômico. Juntos, Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rondônia, Bahia e Paraná produzem cerca de 85% do café brasileiro. Bahia e Rondônia vêm se destacando na produção de café com o passar dos anos. Minas Gerais é o estado maior produtor, com cerca de 47% do café brasileiro. Esta produção está concentrada principalmente no Sul do Estado. Em segundo lugar vem o Espírito Santo com 24,5% (maior produtor de café robusta), seguido por São Paulo com 9,7%. O estado de Rondônia, Bahia e Paraná, disputam a quarta posição do café nacional com 5,2, 5,1 e 4,3%. Outros estados como Mato Grosso, Pará e Rio de Janeiro, também se destacam na produção de café (**Figura 01**).

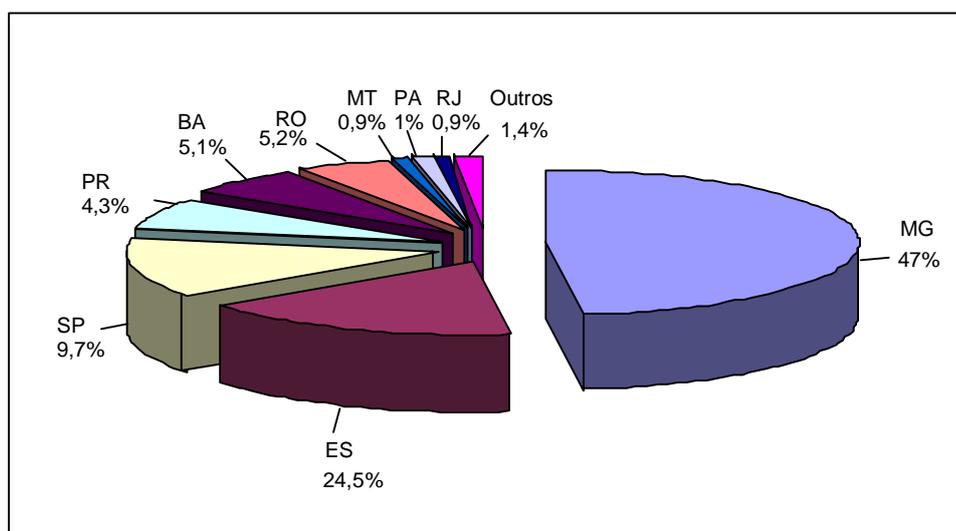


Figura 01: Produção do café. Safra 2004/2005. Participação % por U.F.
CONAB, 2005

Hoje, o Brasil é o maior produtor de café do mundo, maior exportador e segundo consumidor, com uma produção de café beneficiado de 39,272 milhões de sacas na safra 2004/2005 (**Tabela 01**). Este resultado representou um acréscimo de aproximadamente 30% ou 9,4 milhões de sacas superiores à safra de 28,820 milhões produzidas na safra anterior, o que resultou num saldo positivo na balança comercial do País de US\$ 1,7 bilhão e em negócios de US\$ 1,3 bilhão no mercado interno. O consumo mundial cresce cerca de 1,5% ao ano e no Brasil, alcançou 3,7% Kg/ano em 2003.

Para a safra de 2005/2006, segundo o levantamento feito em agosto de 2005, a produção de café beneficiado no País é de 33,3 milhões de sacas (**Tabela 01**). Este resultado representa uma redução de 15,1% ou 5,94 milhões de sacas em relação à safra anterior de 39,272 milhões de sacas. Nesta safra o café arábica, com produção de 24,25 milhões de sacas e participação de 78,2% na produção total do País, apresenta uma redução de 23,5% ou 7,47 milhões de sacas. Tal redução decorre não apenas em função da bienalidade da produção cafeeira, mas também ao clima desfavorável nas principais regiões produtoras, principalmente nos últimos meses de 2004, quando ocorreram chuvas excessivas. Já o café robusta (canilon), com produção de 9,07 milhões de sacas, apresenta acréscimo sobre a safra anterior de 20,1% ou 1,52 milhões de sacas. Esse resultado é creditado às condições climáticas favoráveis e à melhoria dos tratos culturais, envolvendo as adubações, podas, desbrota e controle fitossanitário, no Espírito Santo, maior Estado produtor nacional de café conilon.

Tabela 01: Café - Safra 2004/2005, produção final e safra 2005/2006, produção estimada.

UF/REGIÃO	PRODUÇÃO 2004/2005 (Mil sacas beneficiadas)			PRODUÇÃO 2005/2006 (Mil sacas beneficiadas)		
	Arábica	Robusta	Total			
Minas Gerais	18.747	30	18.777	15.628	30	15.658
Espírito Santo	2.295	4.500	6.795	2.159	6.023	8.182
São Paulo	5.870	-	5.870	3.223	-	3.223
Paraná	2.526	-	2.526	1.425	-	1.425
Bahia	1.877	402	2.270	1.307	379	1.686
Rondônia	-	1.760	1.760	-	1.741	1.741
Mato Grosso	30	280	310	40	270	310
Pará	-	220	220	-	330	330
Rio de Janeiro	250	10	260	288	10	298
Outros	120	355	475	180	295	475
BRASIL	31.715	7.557	39.272	24.250	9.078	33.328

CONVÊNIO: MAPA - S. P. A. E/ CONAB, 2005

A cafeicultura ocupa um espaço de suma importância em nível internacional, ante a receita gerada no setor cambial dos países produtores, como formador de empregos e renda, o que lhe garante incalculável função social. No Brasil, o café confirma essa afirmativa com criação de mais de 7 milhões de empregos, respondendo por 5,5% da balança comercial, recolhendo impostos e movimentando diversos setores da economia.

1.1.1.1-Café: Principais cultivares e características

As plantas de café pertencem à classe das dicotiledôneas e ao grupo das fanerogâmicas. O gênero *Coffea*, da família Rubiaceae, abarca uma grande variedade de espécies selvagens. Das espécies cultivadas, *Coffea arabica* L (café arábica) e *Coffea canephora* Pierre et Froenher (café robusta) são as mais importantes economicamente, sendo *C. arabica* responsável por 70% da produção mundial, e 99% da produção da América Latina, enquanto que o *C. canephora* é responsável por apenas 30% da produção mundial. No Brasil a quase totalidade dos cafeeiros é de variedade arábica, apenas em regiões restritas cultiva-se o café robusta. O cultivo de *C. arabica* no Brasil é responsável por cerca de 70% da produção de café, sendo o cultivo de *C. canephora* responsável por 30% (Fazuoli, 1986, Aguiar *et al.*, 2004), valores estes semelhantes aos dados mundiais.

O café arábica possui aroma intenso e vários sabores com variações de corpo e acidez. É considerado o café de melhor qualidade, mais fino e requintado. Originário da África Oriental, seu cultivo encontra excelentes resultados em regiões montanhosas com altitude entre 1.000 e 2.000 metros. É adaptado ao clima úmido com temperaturas amenas e seu cultivo é mais adequado em regiões de temperatura médias entre 18°C e 23°C. Em regiões mais quentes e com elevada umidade atmosférica, durante o florescimento, poderá apresentar boa frutificação desde que não haja deficiência hídrica. Existem inúmeras variedades de café arábica, tais como o Amarelo do Botucatu, o Maragogipe Vermelho, o Maragogipe Amarelo, o Caturra Vermelho, o Caturra Amarelo, o Bourbon Amarelo, o Mundo Novo, o Catuaí Vermelho, o Catuaí Amarelo, entre outros.

O café robusta tem seu teor de cafeína dobrado em relação ao café arábica, tem um trato mais rude não possuindo sabores variados nem refinados. Sua acidez é mais baixa e, por ter mais sólidos solúveis, é bastante utilizado na industrialização dos cafés solúveis. É reconhecido por ter um “sabor típico e único”. Originário da África Central é capaz de se adaptar às mais variadas condições climáticas e pode ser cultivado ao nível do mar numa altitude inferior a 400 metros. Apresenta desenvolvimento inicial mais lento que o café

arábica, porém pode atingir até 10 metros de altura nas regiões quentes e úmidas. É uma planta oriunda de regiões equatoriais baixas, quentes e úmidas, estando adaptado a condições de temperatura bem elevadas, com médias anuais entre 22°C e 26°C. Praticamente não sofre problemas de frutificação em função de temperaturas mais altas. As lavouras são bastante produtivas, apresentando variedades quanto ao tamanho, formato e maturação dos frutos (Ormond *et al.*, 1999).

1.1.1.2-Pragas e patógenos que infestam o café

O cafeeiro é atacado por diferentes pragas e patógenos, que, se não combatidas devidamente, ocasionam grandes prejuízos e em muitos casos limitam a produção (**Figura 02**). As pragas e patógenos possuem um grau de importância que varia com as diferentes regiões cafeeiras do país havendo flutuações na predominância de uma espécie em relação à outra. Um dos problemas encontrado entre as regiões onde se cultiva o café são os danos causados à produção pela presença da broca-do-café (*H. hampei*) (Souza e Reis, 1997), do bicho mineiro (*Perileuoptera coffeella*) (Souza *et al.*, 1998), das cochilhas (*Coccus viridis*, *Planococcus citri*, *Dysmicoccus cryptos* e *Orthezia praelonga*) (Llorens, 1990), do ácaro vermelho (*Oligonychus illicis*) e ácaro branco (*Polyphagotarsonemus latus*) (Flechtmann, 1985), dos nematóides de galhas (*Meloidogyne* spp.), principalmente o *Meloidogyne incognita*, *M. paranaensis*, *M. exigua* e *M. coffeicola* (Souza *et al.*, 1999; Portz *et al.*, 2000; Carneiro e Almeida, 2000; Castro *et al.*, 2003; Castro *et al.*, 2004) entre outros.

Em relação a doenças destacam-se as fúngicas, tais como: ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastratrix*), rizoctoniose (*Rhizoctonia solani*), mal-dos-quatros-anos (*Roselinea* sp), cercosporiose (*Cercospora coffeicola*), kolerosa (*Cotycium kolerogue*) e antracnose (*Colletotrichum coffeanum*) (Zambolim *et al.*, 1985; Dorizzoto e Abreu, 1993; Godoy *et al.*, 1997). As plantas de café também são atacadas por bactérias como a *Xylella fastidiosa* que provoca a conhecida doença do amarelinho. A maior ou menor intensidade dessas doenças está associada ao ambiente, ao patógeno, ao hospedeiro, ao manejo da cultura e ao desequilíbrio nutricional (Fernandez-Barreto *et al.*, 1966; Siddigi, 1970).

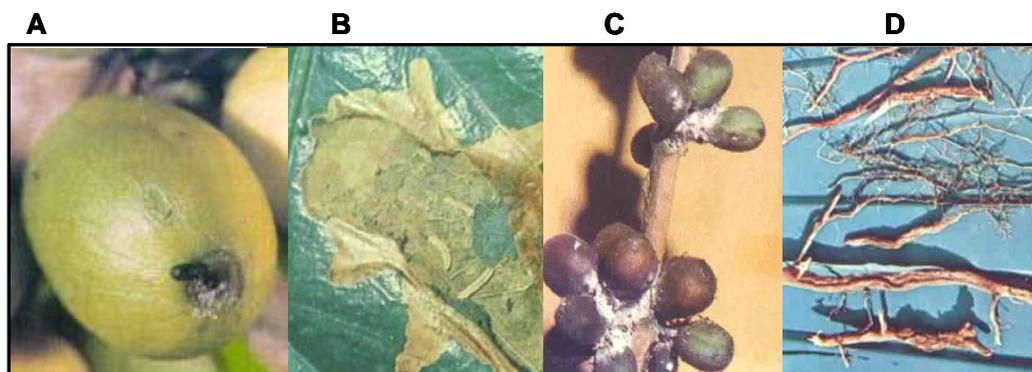


Figura 02: Exemplos de algumas pragas e patógenos que atacam o café: A- Broca-do-café (*H. hampei*), B- Bicho Mineiro (*P. coffeella*), C- Cochinilha branca (*P. citri*), D- Nematóide (*M. incognita*). Estas fotos foram retiradas da página <http://www.agrobyte.com.br/cafe.htm>

1.1.1.3-Broca-do-café

A broca-do-café, *H. hampei*, (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) é considerada uma das principais pragas do cafeeiro no Mundo (Baker, 1999; Baker, 2002). Originária da África Equatorial, onde foi referida como praga em 1901 no Congo, foi introduzido no município de Campinas, estado de São Paulo, por volta de 1913, em sementes de café importadas da África e de Java. A partir daí, o inseto disseminou-se por todos os Estados produtores de café do país, inclusive Minas Gerais, maior produtor brasileiro de café da atualidade, causando vultosos prejuízos quantitativos, qualitativos e econômicos ao café brasileiro, com reflexos negativos sobre a economia nacional (Souza e Reis, 1997).

A broca-do-café é uma praga monófaga, tendo como hospedeiro somente o cafeeiro. O inseto ataca os frutos de todas as espécies de café dos diferentes estágios de maturação (**Figura 03**), desde verdes (chumbinhos) até maduros (cerejas) ou secos.

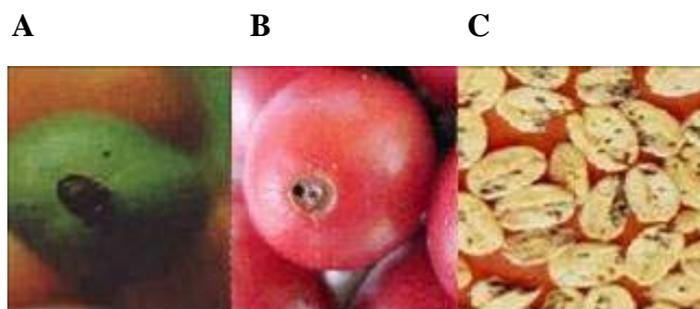


Figura 03: Diferentes estágios de maturação do café: A- verde, B- maduro e C- seco.

Fotos foram retiradas da página <http://www.agrobyte.com.br/cafe.htm>

A broca sofre metamorfose completa (holometabolía), passando pelas fases de ovo, larva, pupa e adulta (**Figura 04**). Os ovos são pequenos, variando de 0,44 a 0,84mm de comprimento, e de 0,23 a 0,35mm de largura; são brancos, leitosos, elípticos e lúzidos. A fêmea põe dois ovos por dia, em média. O número de ovos por câmara dificilmente ultrapassa 20, porém uma fêmea, durante toda sua vida ativa, coloca, em média, 75 ovos. A longevidade do adulto macho é de 40 a 50 dias. A vida média da fêmea adulta é de 156 dias, durante a qual ela tem um período ativo de postura de, aproximadamente, 130 dias, compreendendo intervalos, em que não põe ovos. Assim, a mesma fêmea produz várias descendências consecutivas durante toda a safra de café do mesmo ano. Após ovopositar numa semente, a fêmea suspende as posturas, e volta para a galeria anteriormente construída, permanecendo no local enquanto durar a evolução de seus descendentes, para depois abandonar o fruto e reiniciar, em outro, as posturas interrompidas (Souza e Reis, 1997).

Após 4 a 10 dias de postura, nascem as larvas, com comprimento entre 0,72 e 0,84mm, as quais começam a alimentar-se de pequenas partículas da câmara em que nasceram. Decorridos alguns dias, a semente perde quase totalmente o peso. O período larval dura, em média, 14 dias, quando atinge o crescimento máximo, medindo de 1,88 a 2,3mm de comprimento; a larva é ápoda, recurvada, de cor branca, com a cabeça e as peças bucais pardacentas. O corpo é provido de pêlos esparsos, longos, dirigidos para trás. Bergamin (1943) cita que as larvas mudam de tegumento a partir do quarto dia após o nascimento, e que a duração da muda ou ecdise varia de três a dez minutos. Espinosa (1986) menciona três instares para as fêmeas e dois para os machos, já que estes emergem primeiro para copular aquelas, razão por que elas apresentam um ciclo menor.

Após a fase larval, que dura, em média, 14 dias, a larva transforma-se em pupa no interior da semente, fase do ciclo em que não mais se alimenta. Mede, em média, 1,75mm de comprimento, com cor branca, tendo a cabeça encoberta pelo pronoto. A extremidade posterior do abdome é provida de dois apêndices curtos, pontiagudos e ligeiramente curvos. A fase pupal é de 7 dias, em média, da qual emerge em seguida, o adulto de coloração preta. Segundo Souza e Reis (1997) os machos medem 1,12mm de comprimento e as fêmeas medem 1,65mm. Os machos possuem as mesmas características da fêmea, porém têm as asas membranosas rudimentares, sendo, pois, incapazes de voar, o que, por conseguinte, não lhes permite deixar o fruto em que tiveram origem.

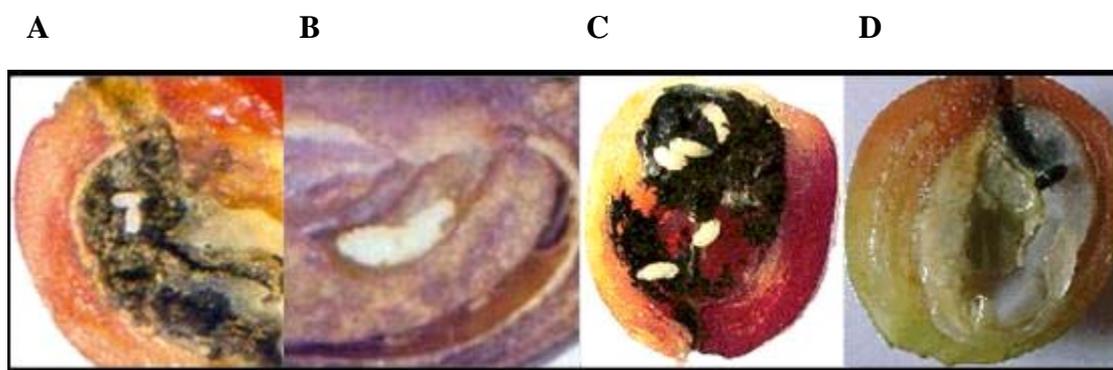


Figura 04: Diferentes estágios de desenvolvimento da broca-do-café: A- ovo, B- larva, C- pupa e D- inseto. Fotos foram retiradas da página <http://www.agrobyte.com.br/cafe.htm>

Devido ao seu ciclo biológico relativamente curto e à grande capacidade de proliferação, a broca constitui-se num importante problema fitossanitário em quase todos os países produtores de café. Segundo Gallo e colaboradores (1978), o ciclo evolutivo da broca, desde a postura até a emergência do adulto completa-se de 27 a 30 dias, em média, durando as fases de ovo, larva e pupa, respectivamente, 4 a 10, 14 e 7 dias (**Figura 05**). Nas condições do Brasil, pode-se verificar até sete gerações anuais. No Brasil, Bergamin (1943), encontrou uma duração do ciclo da broca de 24 a 28 dias e Oliveira Filho (1927), encontrou de 34 a 61 dias. O ciclo evolutivo, determinado por Leefmans em 1923, em Java, citado por Bergamin (1943), foi de 20 a 35 dias. Gowdey citado por Bergamin (1943) apresenta, para a África Central, as seguintes durações para as fases do ciclo da broca: ovo, 8 a 12 dias; larva, 21 a 28 dias e pupa, 15 a 18 dias. O ciclo completo variou de 44 a 58 dias.

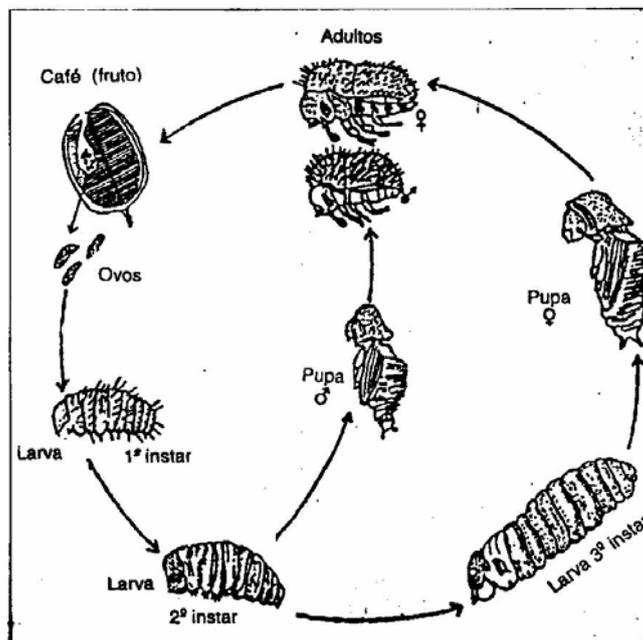


Figura 05: Detalhes do ciclo biológico da broca-do-café nos frutos.

Fonte: Espinosa (1986).

Diversos fatores podem influenciar as infestações da broca-do-café, destacando-se clima (chuvas, temperatura e umidade relativa do ar), colheita, sombreamento, espaçamento, as datas das floradas, alguns tratos culturais, como podas etc. e altitude. A infestação varia de ano para ano, de região para região e nas lavouras de uma mesma região.

Os danos ocasionados pelo ataque das larvas da broca-do-café atingem atualmente, perdas de cerca de R\$40 milhões por ano (De Muner *et al.*, 2000) em consequência dos prejuízos à qualidade do café produzido. Dependendo do nível de infestação, os prejuízos podem chegar a 21%, somente pela perda de peso, ou seja, mais de 12 quilos por saca de 60 quilos (Souza e Reis, 1997). A diminuição na percentagem de grãos perfeitos, o aumento de grãos quebrados a perda de peso, a interferência no tipo do café, a queda de frutos brocados, ainda no campo, e a infestação por microorganismos são danos diretos ocasionados pela broca-do-café, no processo de produção do café (Toledo, 1947; Nakano *et al.*, 1976; Chalfoun *et al.*, 1984; Reis e Souza, 1984,1986). A importância dos prejuízos causados pelos danos indiretos é devido ao fato do seu ataque proporcionar uma porta de entrada para microorganismos que se desenvolvem quando as condições são favoráveis, atingindo os grãos e alterando a qualidade do café (Chalfoun *et al.*, 1984). Benassi e Carvalho (1989) verificaram a preferência de ataque da broca em *C. arabica* em relação a *C. canephora*, em especial o café

Conilon, porém, segundo Reis e Souza (1986), os fatores climáticos, principalmente as temperaturas mais elevadas, propiciam maior desenvolvimento populacional e, portanto, maior incidência da broca em café Conilon. A previsão da infestação de campo tem sido realizada para a região sul do Estado de Minas Gerais, podendo-se estimar as perdas quantitativas de produtividade de acordo com o grau de infestação da broca por ocasião da colheita (Souza e Reis, 1997).

1.1.1.4-Controle da broca-do-café

No controle da broca-do-café têm sido aplicados os métodos cultural, biológico e químico (Souza e Reis, 1997). Atualmente, o controle da praga no café convencional é feito, basicamente, por meio de produtos químicos. O controle químico da broca visa matar os adultos (fêmeas) que estão penetrando nos frutos, antes que ponham ovos nas sementes e as larvas eclodidas causem prejuízos ao se alimentarem delas. O endossulfan é um inseticida químico que atua matando a broca adulta pelas ações de contato e fumigação. Por contato, mata a broca na entrada ou no interior da galeria. O endossulfan não mata a descendência da broca dentro do fruto, razão pela qual é recomendado para ser aplicado na época de trânsito, na qual a broca se desloca de um fruto para o outro. Este produto não deve ser aplicado em toda a lavoura e sim em alguns talhões, já que a broca apresenta infestação desuniforme, não generalizada (Souza e Reis, 1997). Os gastos obtidos com o uso de inseticidas químicos resultam em 30% de lucro obtido com a produção de café. Além dos altos custos e ao surgimento de resistência ao endossulfan (Brun *et al.*, 1989), têm-se buscado novas alternativas para o seu combate, como o controle biológico.

O uso de controle biológico de pragas no Brasil é recente, quando comparado a outros países. Este controle é o principal método de regulação de populações de pragas utilizado nos Programas de Manejo Integrado. Este método visa o controle da broca-do-café, principalmente nas lavouras adensadas, as quais não permitem um controle químico eficiente e seguro para o aplicador. Arthur Neiva em 1928 desenvolveu trabalho de controle biológico utilizando a vespa de Uganda (*Propropis nasuta*), parasita de larvas e pupas da broca-do-café, para controlar a praga. Porém, a espécie não conseguiu se estabelecer em território brasileiro. Mais recentemente, a utilização de outros controles biológicos da broca-do-café foram introduzidos no Brasil, como os parasitóides *Cephalonomia stephanoderis* que ataca as larvas e pupa e o *Phymastichus coffeae* que ataca apenas os insetos adultos (Infante *et al.*, 1992; Benassi, 1995). O fungo *Beauveria bassiana* vem sendo utilizado em algumas lavouras de

café, principalmente na agricultura familiar, em pequenas propriedades de cultivo orgânico ou convencional. Além dos benefícios ecológicos, energéticos e econômicos, esta tecnologia pode agregar valor à produção nas pequenas propriedades, contribuindo para a produção ecologicamente correta. No entanto, deve ser levado em consideração que o fungo é um organismo vivo e que pode morrer ou perder a sua viabilidade na lavoura ou quando aplicado de forma incorreta e ou armazenado em ambiente não propício à manutenção da sua viabilidade (Pedro, 2004).

No entanto, novos métodos biotecnológicos de controle genético estão sendo empregados na cultura do café para introduzir genes de diferentes origens que confirmam resistência a broca-do-café. Pesquisas vêm sendo desenvolvidas com os genes que codificam inibidores de α -amilase e proteinases como uma ferramenta promissora para o controle desta praga. Estas pesquisas, envolvendo inibidores protéicos, tiveram início diante dos resultados obtidos por Valencia e colaboradores (1994), ao mostrar a presença da atividade proteolítica do tipo tripsina e quimotripsina no intestino de larvas *H. hampei* e por Valencia e colaboradores (2000), ao mostrar a presença da atividade do tipo α -amilase na larva e inseto adulto de *H. hampei*. Como descrito anteriormente, estas proteínas com poder inseticida atuam sobre as enzimas proteolíticas causando danos ao desenvolvimento da larva podendo ocasionar a morte.

Além da utilização dos diferentes métodos de controle, o produtor pode controlar a ação da praga tendo alguns cuidados. É necessário que a colheita e limpeza sejam bem feitas, de maneira que frutos não permaneçam na árvore e no chão. Isso evita que a broca sobreviva na entressafra para infestar posteriormente a nova frutificação. Outro detalhe importante é iniciar a colheita pelos talhões mais afetados, pois a praga tem grande poder de infestação. Mesmo depois de armazenado, o café brocado pode contaminar os cafés sadios.

Para a consolidação destas tecnologias, e sua utilização da forma mais eficiente, é importante o investimento em pesquisa e difusão de tecnologia, visando seu aprimoramento constante, considerando o aspecto dinâmico da cafeicultura.

1.1.2-A CULTURA DO FEJJOEIRO

O gênero *Phaseolus* é constituído pela família Fabaceae e possui cerca de 55 espécies destacando cinco espécies cultivadas: o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*); o feijão de lima (*P. lunatus* L.); o feijão ayocote (*P. coccineus*); o feijão tepari (*P. acutifolius* A. Gray) e o *P. polyanthus* Geeernman.

O feijão é uma das mais importantes leguminosas cultivadas para a alimentação humana. A importância dessa cultura deve-se a que o feijão, além de se constituir um dos alimentos básicos da população brasileira é um dos principais produtos fornecedores de proteína na dieta alimentar das camadas sociais economicamente menos favorecidas. Nutricionistas caracterizam o feijão como um alimento quase perfeito, pois além do alto conteúdo de proteína, este contém fibras, carboidratos complexos e outros componentes da dieta como ácido fólico (fonte de vitamina B), ferro, zinco, magnésio e potássio (CIAT, 2002). Outra característica importante é que o feijão tem uma ampla adaptação edafoclimática o que permite seu cultivo, durante todo o ano, em quase todos os estados brasileiros, possibilitando constante oferta do produto no mercado. A produção do feijão ocorre em diversos ecossistemas tropicais e temperados, em monocultivo e/ou consorciado nos mais variados arranjos de plantas inter e intraespecíficos, o que favorece a diversificação na produção, mas limita uma maior integração na sua cadeia produtiva.

O feijão é a segunda cultura em área plantada do mundo, sendo superado apenas pelo milho. A produção anual é superior a 12 milhões de toneladas, sendo a metade produzida na América Latina. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de feijão em se tratando de todos os gêneros e espécies, sendo o maior produtor mundial do gênero *Phaseolus* (Vieira *et al.*, 1998).

A produção no Brasil de grãos de feijão de uma maneira geral para a safra de 2004/2005, levantamento feito em agosto de 2005 pela CONAB (<http://www.conab.gov.br>), foi de 3.044,4 toneladas.

No entanto, perdas expressivas na produção de feijão são ocasionadas por doenças causadas por fungos, vírus, bactérias e nematóides (Sobrinho *et al.*, 2000), assim como pela infestação por insetos (Dendy e Credland, 1991, P; Farione *et al.*, 1995). Nas condições tropicais, os insetos têm maior importância, pois provocam perda de peso e redução do poder germinativo das sementes, contaminação da massa por dejetos, e conseqüentemente, a desvalorização do produto.

1.1.2.1- Principais insetos-praga de feijão armazenado

As pragas mais importantes para a cultura do feijão, em armazenamento pertencem à Ordem Coleóptera e à família Bruchidae, destacando os insetos *C. maculatus*, *A. obtectus* e *Z. subfasciatus* (Coutinho *et al.*, 2000).

Estes insetos-praga atacam os feijões de todas as variedades em condições de armazenamento destruindo os cotilédones, comprometendo a qualidade do produto pela presença de dejetos e insetos mortos (Oliveira *et al.*, 1984; Hohmann e Carvalho, 1989).

Os insetos *C. maculatus*, *A. obtectus* e *Z. subfasciatus* (**Figura 06**) apresentam características físicas e ciclo de vida bem semelhantes, podendo ser identificados pelas características apresentadas nas pernas posteriores dos adultos. O fêmur posterior de *A. obtectus* tem três estruturas como dentes em fileira, *Z. subfasciatus* tem dois esporos móveis sobre a extremidade da tíbia posterior, enquanto que na espécie de *C. maculatus* há um dente brusco externo e um pontiagudo interno sobre o ápice do fêmur posterior. Esses dentes podem variar de acordo com as espécies. Os ovos são colocados sobre as vagens ou diretamente sobre as sementes das leguminosas. *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* aderem seus ovos firmemente sobre a vagem ou semente, enquanto *A. obtectus* coloca seus ovos livremente nas trincas e rachaduras das sementes ou vagens.

A duração completa do ciclo de vida para *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* é de 26 dias a 30°C. Os ovos são colocados em um líquido claro e pegajoso expelido pela fêmea servindo de apoio para a penetração da larva no interior do grão. As larvas são do tipo curculioniforme, passando diretamente do ovo para o interior da semente. As pupas apresentam coloração branco leitosa e medem cerca de 3mm de comprimento. Os adultos são besouros pequenos, com 1,8 a 2,5mm de comprimento e coloração castanho escura. As fêmeas são maiores que os machos e apresentam quatro manchas claras bem definidas no pronoto, contrastando com a cor escura brilhante do corpo (Coutinho *et al.*, 2000).

No caso de *A. obtectus*, o ciclo de vida completo é de 30 a 45 dias. Os ovos são postos soltos ou aderidos aos grãos e apresentam coloração branca translúcida, tornando-se leitosos após algum tempo. As larvas medem de 3 a 4mm de comprimento e possuem coloração branco leitosa. As pupas são brancas e medem cerca de 4mm de comprimento. A fase pupal tem a duração de 10 a 12 dias. Os adultos são besouros de forma ovóide e medem de 3 a 3,5mm de comprimento. Possuem coloração pardo escura e são cobertos por pulverência cinzenta. Os élitros são canelados com manchas castanho escuras e a cabeça é cinzenta com base avermelhada. As fêmeas são maiores que os machos. Os adultos não se alimentam dos grãos, mas de detritos e apresentam uma longevidade média de 13 dias (Coutinho *et al.*, 2000).



Figura 06: (A) *C. maculatus*, (B) *A. obtectus* e (C) *Z. subfasciatus*

Fonte: <http://insects.tamu.edu/images/insects/common/images/b-txt/bimg179.html>

1.1.2.2-Métodos de controle de pragas de feijão

As estratégias de controle de campo e de armazém para pragas de grãos em geral são similares e dentre elas destacam-se os controles mecânico, físico, químico e biológico. No Brasil os métodos de controle mais utilizados são os físicos e os químicos. Os métodos físicos envolvem a manipulação dos fatores físicos para reduzir a população da praga a um nível tolerável ou eliminá-lo, como controle da temperatura, da umidade relativa, luz entre outros, os quais podem ser utilizados isoladamente ou combinados. O uso de inseticida é um dos métodos de controle mais empregado na atualidade. O controle químico pode ser aplicado de forma preventiva ou curativa. Este tratamento tem sido eficaz no controle dos carunchos, porém, sua utilização é dificultada pelo custo dos produtos e por problemas de toxicidade decorrentes da utilização dos inseticidas. Com relação ao controle químico, também há o problema do surgimento de resistência aos inseticidas (Lorini, 2001).

Devido os custos dos produtos químicos, pequenos agricultores tem utilizado várias práticas, como: mistura dos grãos de feijão com areia, cal, cinza de madeira, resíduos de trilha da colheita (munha), terra de formigueiro, pimenta-do-reino ou óleos (Gutierrez e Schoonhoven, 1981; Don-Pedro, 1989). Barreto e colaboradores observaram que houve interferência na biologia de *A. obtectus* e redução de sua população quando grãos de caupi foram misturados com calcário. O efeito repelente do óleo de sementes de nim (*Azadirachta indica* A. Juss.) sobre *Z. subfasciatus* foi mostrado por Oliveira e Vendramim (1999). Hall e Harman (1991) constataram que o tratamento de sementes de *P. vulgaris* com o óleo de soja (*Glycine max* Merrill) resultou em redução da oviposição e da emergência de adultos de

Z. subfasciatus. Uvah e Ishaya (1992) relatam que o efeito do óleo sobre as sementes é devido ao bloqueio do oxigênio para a respiração dos insetos e também o efeito inseticida de algum componente.

Outra forma bastante promissora de controlar os insetos-praga que infestam o feijão é a obtenção de variantes resistente através de processos de melhoramento genético e de técnicas de biologia molecular sem riscos de danos à saúde humana.

As plantas possuem fatores intrínsecos de defesa que são capazes de proteger suas sementes do ataque de insetos e esses fatores podem ser não protéicos, como os antibióticos, alcalóides e terpenos, ou protéicos, como as quitinases, lectinas, arcelinas e inibidores de enzimas. Esses fatores podem ser incorporados a novos cultivares. Dentre estas proteínas, o inibidor de α -amilase de trigo 0.53 é de interesse especial por ser uma proteína com atividade inibitória contra α -amilase de *A. obtectus* (Franco *et al.*, 2002). Em genótipos silvestres de *P. vulgaris*, de origem mexicana, detectaram-se altos níveis de resistência aos carunchos (Schoonhoven *et al.*, 1983), a qual é atribuída à proteína arcelina (Cardona *et al.*, 1989).

Embora exista uma busca incessante em localizar fatores que possam ser utilizados para conferir resistência contra os carunchos, a transformação genética de leguminosas como feijão comum (*P. vulgaris*), caupi (*Vigna unguiculata*) e feijão azuki (*Vigna angularis*) ainda é demorada e ineficiente (Finer e Nagasawa, 1988). McClean e colaboradores (1991) mostraram que a dificuldade em obter plantas de feijão transgênicas é devido à inexistência de um sistema eficiente de transferência de DNA e de regeneração de plantas de feijão. O Bombardeamento de partículas ou biobalística vem sendo utilizado para transformar leguminosas (Aragão *et al.*, 1999). O sucesso deste método depende da habilidade do tecido alvo de se regenerar e dar origem a uma planta fértil.

A qualidade final do feijão é influenciada pelas condições de armazenamento e pelas condições iniciais dos grãos. Os cuidados devem começar na lavoura, com providências contra danos mecânicos, ataques de insetos e reumedecimento e germinação na vagem. Caso necessário, deve-se fazer a pré-secagem do produto ainda na rama, bem como limpar os equipamentos de trilha, de transporte e o local de armazenamento, para eliminar focos de contaminação.

1.2-PROTEÍNAS VEGETAIS COM PODER INSETICIDA

Existe um grande número de estratégias de defesa natural que são utilizadas pelas plantas quando atacadas por patógenos herbívoros ou quando submetidas a condições ambientais adversas. Estas estratégias conferem as plantas um variado grau de resistência e por muitos anos tem se estudado a biossíntese e a regulação de compostos químicos associados com estas defesas. A resistência é o termo usado para descrever a capacidade das plantas em prevenir, restringir ou retardar a penetração do patógeno no tecido hospedeiro (Bell, 1981). De um modo geral, os mecanismos de defesa das plantas superiores contra uma variedade de agentes bióticos e abióticos podem ser agrupados em duas categorias: constitutivos, se sua ação faz-se dentro do programa de desenvolvimento normal da planta; e induzida, quando estão envolvidas diretamente na resposta a alguma agressão ou infecção (Chesin e Zipf, 1990). Por exemplo, os níveis dos inibidores de proteinases (PI) em folhas são normalmente baixos podendo ser rapidamente induzidos a níveis elevados quando as plantas são atacadas por insetos, sofrem danos mecânicos ou são expostas a fitohormônios (Rakwal *et al.*, 2001). Além da síntese de PI induzida no local do ataque, foi demonstrado que sinais específicos originários dos tecidos danificados são transportados via floema e estimulam a síntese de PI por toda a planta (Jongsma e Bolter, 1997), sendo este processo denominado imunização sistêmica (Dean e Kuc, 1986; Gottstein e Kuc, 1989).

Existem inúmeras proteínas envolvidas em complexos mecanismos de defesa de plantas. Entre elas podemos citar: os inibidores protéicos, como, os inibidores de α -amilases e os de proteinases (Chrispeels *et al.*, 1998; Bode e Huber, 2000; Franco *et al.*, 2000; Sales *et al.*, 2000; Carline e Grossi de Sá, 2002), bem como as quitinases, proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), arcelinas, vicilinas, leguminas, lectinas, defensinas, tioninas, proteínas de transferência de lipídeos (LTPs) (Cardona *et al.*, 1990; Block Jr. e Richardson, 1991; Meins *et al.*, 1994; Dempsey *et al.*, 1998; Sales *et al.*, 2000; Santanu *et al.*, 2001; Wijaya *et al.*, 2000) entre outras. Além da indução destas proteínas de defesa, as plantas liberam para o ambiente compostos voláteis que atraem predadores dos insetos herbívoros (Birkett *et al.*, 2000), promove a síntese de metabólitos secundários (Baldwin, 2001; Kliebenstein *et al.*, 2001) e o aumento da densidade de tricomonas em folhas e caule (Fordyce e Agrawal, 2001).

1.2.1-INIBIDORES DE α -AMILASES

As α -amilases (α -1,4-glicanohidrolases) são enzimas abundantes encontradas em animais, plantas e microrganismos que catalisam a hidrólise inicial de polissacarídeos com ligações do tipo α -1,4, como amido e glicogênio, produzindo oligossacarídeos menores, que serão posteriormente transformados em carboidratos simples assimiláveis pelos organismos. Em insetos que se alimentam de sementes durante a fase adulta e/ou larval, essas estão entre as enzimas mais importantes (Grossi de Sa e Chrispeels, 1997a; Strobl *et al.*, 1998).

Os inibidores de α -amilases são proteínas que inibem direto ou indiretamente a ação catalítica destas enzimas. A inibição direta ocorre quando o inibidor interage com os resíduos presentes no centro catalítico da enzima bloqueando o acesso do substrato. Estudos de cristalização do inibidor de *Amaranthus* (AAI) complexado com a α -amilase TMA (Pereira *et al.*, 1999) mostra claramente este tipo de inibição. No entanto, a inibição indireta foi demonstrada a partir de estudos da estrutura molecular do complexo formado entre o inibidor BASI de cevada e a α -amilase de cevada AMY2, onde o inibidor se liga a um sítio próximo ao sítio catalítico da enzima criando uma cavidade na superfície da proteína que acomoda um íon de cálcio extra, o qual contribui para a atividade inibitória do BASI (Rodenburg *et al.*, 1995).

O primeiro inibidor de α -amilase foi descrito no trigo e cevada em 1933 e 1934, respectivamente (Chrzaszcz e Janicki, 1934). O próximo relato, ocorrido somente em 1943, determinou a natureza protéica e solubilidade dos inibidores de α -amilase de trigo, centeio e determinadas variedades de cevada (Kneen e Sandstede, 1943).

Os inibidores de α -amilases podem ser divididos em 2 classes: os inibidores proteínicos e não proteínicos (Franco *et al.*, 2002). Os inibidores de α -amilases proteínicos compreendem um grande número de biomoléculas, que além de serem encontrados em plantas, também são encontrados em microrganismos e animais (Svenson *et al.*, 2004).

Em plantas, os inibidores de α -amilases constituem uma importante família de proteína, os quais podem ser encontrados em cereais como o trigo (Garcia-Maroto *et al.*, 1991; Feng *et al.*, 1996), cevada (Abe *et al.*, 1993) e centeio (Garcia-Casado *et al.*, 1995), em leguminosas como o feijão comum (Marshall e Lauda, 1975; Ishimoto *et al.*, 1996; Grossi de Sá *et al.*, 1997) e o feijão-de-corda (Melo *et al.*, 1999), além de outras famílias de vegetais. Estas proteínas podem apresentar diferente massa molecular de: 5kDa (Bloch Jr. e

Richardson, 1991), 9kDa (Melo *et al.*, 1999), 13kDa, 26kDa (Feng *et al.*, 1996) e 50kDa (Kasahara *et al.*, 1996), e uma notável variedade estrutural apresentando diferentes tipos de inibição, assim como, diferentes espectros de especificidade contra diversas α -amilases presentes em diferentes espécies (da Silva *et al.*, 2000; Oliveira-Neto *et al.*, 2003). Estas proteínas podem se apresentar na forma de monômeros, dímeros e tetrâmeros.

De acordo com Richardson (1991), os inibidores proteínáceos de α -amilase foram classificados baseados na sua estrutura terciária em seis classes: tipo lectina, knotina, cereal, Kunitz, γ -puritionina e taumantina.

1.2.1.1 - Inibidor de α -amilase tipo lectina

Em sementes de feijão *Phaseolus* sp. os inibidores de α -amilases fazem parte de uma família de proteínas de defesa que inclui as fitohemaglutininas (PHAE e PHAL) e as arcelinas (Chrispeels e Raikhel, 1991). Os inibidores de α -amilases em feijão, *P. vulgaris*, foram isolados pela primeira vez em 1945 por Bowman. Estes inibidores têm sido purificados e caracterizados a partir de diferentes acessos e variedades de feijão comum (*P. vulgaris*). Os inibidores denominados α AI-1 e α AI-2, isoformas presentes em acesso cultivado e selvagem de feijão comum, respectivamente, diferem quanto ao seu perfil eletroforético, composição de subunidades, estabilidade térmica (Iguti e Lajolo, 1990) e em sua especificidade contra α -amilases de fontes distintas. Por exemplo, enquanto o inibidor α AI-1 inibe a α -amilase pancreática de porco (PPA), α -amilase de *C. maculatus* (ACM), *C. chinensis* (ACC) (Kasahara *et al.*, 1996) e α -amilase de *H. hampei* (Valencia *et al.*, 2000), o inibidor α AI-2 atua somente contra a α -amilase do *Z. subfasciatus* (ZSA) (Grossi de Sá *et al.*, 1997b; Da Silva *et al.*, 2000). Nenhum desses inibidores apresenta efeito inibitório contra α -amilase do *A. obtectus* (AAO) (Melo *et al.*, 1999). Uma terceira isoforma, α A1-L, também conhecida como α AI-3, isolado de *P. vulgaris*, cultivar Rico 23 apresenta-se na forma de cadeia única sendo inativa contra todas α -amilases testadas (Finardi-Filho *et al.*, 1996). Esta proteína tem sido considerada um intermediário entre as fitohemaglutininas, arcelinas e inibidores de α -amilases (Wato *et al.*, 2000).

O mecanismo de interação e especificidade entre inibidor e α -amilase ainda não foi completamente elucidado, mas alguns avanços têm sido demonstrados nos últimos anos e estudos envolvendo estruturas moleculares vem sendo realizados por diferentes grupos. De

acordo com Grossi de Sá e colaboradores (1997b), a inibição de ZSA causada pelo α AI-2 é dependente tanto do tempo, quanto do pH. Apesar de La Jolo e colaboradores (1991) proporem uma proporção estequiométrica 1:1 (inibidor- α -amilase), estudos recentes demonstraram que alguns inibidores diferem desse tipo de interação. Kasahara e colaboradores (1996) sugeriram uma proporção estequiométrica de 2:1, onde uma única molécula de α AI-1 de feijão comum, por meio de dois sítios de ligação independentes, se liga e inibe duas moléculas de amilase de pâncreas de porco. A interação entre α AI-1 com PPA apresenta uma modificação conformacional do sítio ativo de α -amilase. Neste caso, a cadeia principal da alça flexível da α -amilase (resíduos 304-310) que forma a margem superficial do sítio de ligação com o substrato é empurrada pelo inibidor. O inibidor então toma o lugar da alça, bloqueando o sítio catalítico ao formar o complexo enzima-inibidor (Bompard-Gilles *et al.*, 1996). Muitos autores têm observado que alguns aminoácidos dos inibidores são essenciais para a interação com as α -amilases. Billeter e colaboradores (1989) por meio de análise de ressonância magnética nuclear (RMN) e difração de raio X, determinaram a estrutura do inibidor *Tendamistad* bacteriano mostrando que o sítio reativo consiste no segmento Trp¹⁸-Arg¹⁹-Tyr²⁰, o qual se encontra em uma alça exposta na proteína. No inibidor α AI-1, esta seqüência corresponde a Trp¹⁸⁸-Ser¹⁸⁹-Tyr¹⁹⁰. Mutação destes resíduos do tripeptídeo próximo ao C-terminal por Gly-Asn-Val (resíduos de aminoácidos presentes em fitohemaglutinina) produziram inibidores inativos (Mirkov *et al.*, 1995). A similaridade dos sítios reativos entre α AI-1 e *Tendamistad* sugere que ambos podem se ligar ao sítio catalítico da α -amilase de pâncreas de porco da mesma maneira. O resíduo de serina do inibidor α AI-1 pode interagir com o ácido aspártico catalítico (Qian *et al.*, 1993), enquanto o Trp¹⁸⁸ lateral e a Tyr¹⁹⁰ podem se ligar aos sítios vizinhos. Além destes resíduos, nove aminoácidos de α AI-1 formam contato direto com PPA por pontes de hidrogênio para a formação do complexo (Bompard-Gilles *et al.*, 1996).

Para melhor entender a especificidade de interação entre as α -amilases e os inibidores, estudos envolvendo estruturas moleculares tridimensionais vêm sendo realizados por diferentes grupos. Utilizando dados de cristalografia do complexo α AI-1/PPA (Bompard-Gilles *et al.*, 1996) e da TMA, foi possível a construção de modelos computacionais que simulam a formação do complexo encontrado na natureza, como por exemplo, o complexo do inibidor α AI-2 e α -amilase de *Z. subfasciatus* (α AI-2/ZSA), assim como a simulação de complexos artificiais (α AI-2/PPA e α AI-1/ZSA) (Da Silva *et al.*, 2000; Lê Berre-Antonon *et al.*, 2000). Esses modelos estruturais foram analisados comparativamente, os quais oferecem

informações úteis para o desenho de experimentos que objetivem a produção de inibidores mutantes com a especificidade desejada.

Segundo Da Silva e colaboradores (2000), a sobreposição das moléculas de α AI-1 (estrutura 3D obtida através de difração de raios-x) e α AI-2 (produto de modelagem molecular) mostraram uma homologia estrutural entre as duas alças principais (N-terminal e C-terminal) envolvidas nas interações com as α -amilases. A alça N-terminal no α AI-2 apresentou um tamanho reduzido e uma orientação espacial oposta, quando comparada, a mesma alça no α AI-1, sugerindo uma possível função dos aminoácidos envolvidos na especificidade da interação (Grossi de Sá e Chrispeels, 1997a; Da Silva *et al.*, 2000). Também foi observada a ausência dos resíduos Ser³⁴ e Tyr³⁵ no inibidor α AI-2. A falta destes resíduos poderia reduzir a formação da rede de pontes de hidrogênio na complexação do inibidor α AI-2 com a enzima PPA. Além das pontes de hidrogênio, outros parâmetros envolvidos na energia de ligação, como o potencial eletrostático e a complementaridade das cargas e da área de superfície, foram analisados, demonstrando que a atividade específica entre α AI-1/PPA e α AI-2/ZSA é multifatorial e dependente de vários fatores responsáveis pela formação do complexo (Da Silva *et al.*, 2000).

Os inibidores de α -amilases encontrados em feijão comum só se tornam ativos após sofrerem processamento e isto pode ocorrer em um único passo ou em passos múltiplos. Os inibidores α AI são sintetizados como uma pró-proteína que sofre ação proteolítica para se tornar ativo (maduro). A clivagem proteolítica ocorre no resíduo Arg⁷⁷ (Santino *et al.*, 1992), resultando na formação de duas subunidades glicosiladas com massas moleculares estimadas em 10 e 14,6 kDa, originando as cadeias α e β , respectivamente (Moreno e Chrispeels, 1989; Yamaguchi, 1993). Estudos utilizando espectrometria de massa mostraram que os inibidores α AI-1 e α AI-2 necessitam dessa clivagem para ativação (Yong *et al.*, 1999). A dimerização da proteína ocorre no retículo endoplasmático, sendo então transportada para o complexo de Golgi onde um dos três glicanos é modificado pela remoção da manose. Após a chegada da proteína aos vacúolos, o inibidor é então clivado em duas cadeias α e β e sete aminoácidos terminais são removidos (**Figura 07**). A proteína madura contém glicanos ligados à Asn⁶³ e por espectrometria de massa foi observado que existem dois glicanos por cadeia (Chrispeels *et al.*, 1998; Yong *et al.*, 1999).

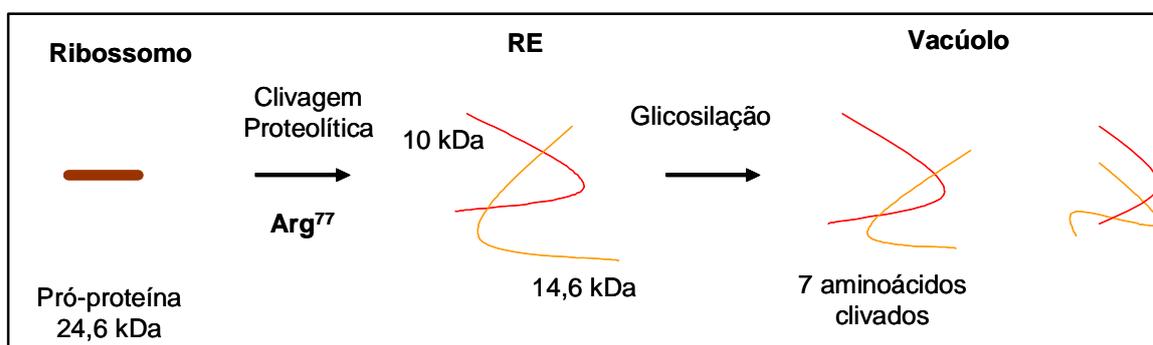


Figura 07: Processamento dos inibidores de α -amilases de feijão comum (*P. vulgaris*).

Fonte: Melo *et al.*, 1999.

A maioria das pesquisas concentra-se nos inibidores de α -amilases de mamíferos e insetos predadores, sendo ainda insipiente os estudos em relação aos fungos (Figueira *et al.*, 2003).

1.2.2-INIBIDORES DE PROTEINASES

As proteases (peptidil hidrolases, EC 3.4) são enzimas que clivam ligações peptídicas e estão classificadas em dois grupos de acordo com o local de clivagem. As proteases que hidrolisam ligações peptídicas internas são denominadas endopeptidases (EC 3.4.21-24), também conhecidas como proteinases, e as proteases que clivam as ligações N-terminais ou C-terminais, são denominadas de exopeptidases (EC 3.2.4.11-19) (Ryan e Walker-Simmons, 1981).

As proteinases estão amplamente distribuídas na natureza sendo encontradas em vírus, bactérias, mamíferos, insetos e plantas, realizando distintas funções (Bode e Huber, 2000). Nos insetos estas enzimas exercem vital importância no processo digestivo e na metamorfose, possuindo diferentes locais de síntese e mecanismos de ação.

Baseado no mecanismo catalítico, as proteinases estão divididas em quatro classes: serino proteinases, cisteino proteinases, aspartil proteinases e metalo proteinases.

As proteinases têm sua função catalítica bloqueada pela ação dos inibidores presente em plantas, os quais são classificados de acordo com a sua especificidade em relação às mesmas: inibidores de proteinases serínicas; cisteínicas; aspárticas e metalo-proteinases. (Ritonja *et al.*, 1990; Baudys *et al.*, 1991).

Embora a função metabólica dos inibidores ainda não esteja totalmente elucidada, diversas funções são sugeridas para os inibidores de proteinases nas plantas, como regulação da atividade proteolítica endógena durante a dormência das sementes (Ryan, 1990), participação em vários processos do desenvolvimento, incluindo morte celular programada (Solomon *et al.*, 1999), como simples proteína de reserva (Xavier-Filho, 1992) e como componentes associados à resistência de plantas frente a insetos e patógenos (Lu *et al.*, 1998; Pernas *et al.*, 1999).

O mecanismo de ação dos inibidores de proteinases, assim com os inibidores de α -amilases, em insetos está relacionado com o processo digestivo. O inibidor por meio da sua ligação específica a enzimas proteolíticas do intestino dos insetos provoca uma diminuição da assimilação de nutrientes, impedindo que estas executem suas funções primordiais no processo de digestão protéica (Ryan, 1991).

Todos os inibidores de proteinases são biossintetizados como precursores inativos conhecidos como pró-proteína ou zimogênio, os quais são armazenados e, em seguida, ativados quando necessário. A ativação envolve proteólise decorrente da ligação do sítio catalítico da enzima ao peptídeo, mais especificamente, a região do N-terminal (Laskowski e Qasim, 2000).

Os inibidores de proteinases serínicas constituem o grupo dos inibidores que apresentam melhor caracterização (Ryan e Walker-Simmons, 1981). Nos últimos anos, entretanto, muitos inibidores de proteinases cisteínicas também foram caracterizados (Koiwa *et al.*, 2000, Rigden *et al.*, 2001). Os inibidores de metalo-proteinases e de proteinases aspárticas de plantas estão sendo estudados ainda em menor escala (Barret, 1986; Turk e Bode, 1991).

1.2.2.1-Inibidores de proteínases serínicas.

Os inibidores de proteinases serínicas além de serem encontrados em tecidos de reservas vegetais, tais como sementes, tubérculos, folhas e frutos, também são encontrados em tecidos animais e em microorganismos (Richardson, 1991; Xavier-Filho, 1992; Shewry e Lucas, 1997; Melo *et al.*, 2002). Estes estão agrupados em oito famílias de acordo com a classe da enzima inibida, com o tamanho da molécula e homologia com a seqüência primária (Laskowski e Kato, 1980): Bowman-Birk, Kunitz, Batata I e II, Abóbora, a superfamília de Cereais, família Ragi proveniente do milheto indiano e a família do tipo Taumatina.

A maioria dos inibidores de proteinases serínicas atua diretamente bloqueando o acesso do substrato ao centro catalítico das proteinases. Estes inibidores reagem com suas enzimas cognatas por meio de um mecanismo semelhante ao que ocorre na ligação entre enzima e substrato (Laskowski e Kato, 1980; Grutter *et al.*, 1990). As proteinases serínicas em geral apresentam um sítio ativo em forma de “canyon” (garganta) circundado por duas alças flexíveis. Desta maneira, somente substratos macromoleculares com formas semelhantes ou inibidores tem acesso ao sítio ativo.

Os inibidores de proteinase serínicas mais estudados representam a família Kunitz e os de Bowman-Birk, ambos de soja (Ritonja *et al.*, 1990; Baudys *et al.*, 1991), que se ligam diretamente ao sítio ativo, bloqueando a entrada de moléculas de substrato concretizando uma inibição do tipo canônica. Uma exceção acontece às trombinas, que se ligam a um sítio adjacente ou a um exosítio, desestabilizando a molécula de protease e impedindo que esta tenha atividade enzimática (Bode e Huber, 1992).

Kunitz e Northrop (1936) isolaram e cristalizaram o inibidor de tripsina pancreático de porco (BPTI) e em 1945, Kunitz cristalizou o inibidor de tripsina de soja (STI). Estes inibidores foram bem caracterizados, mostrando formar complexo com a tripsina em uma proporção estequiométrica de 1:1. A formação do complexo se dá em pH neutro, e quando este valor de pH é reduzido, o complexo é desfeito voltando a se estabilizar com o aumento do pH (Laskowski e Qasim, 2000, see review). Koide e Ikenaka (1973) estabeleceram a seqüência completa de aminoácidos do inibidor de Kunitz de soja.

Bowman (1946) isolou pela primeira vez um inibidor tipo Bowman-Birk que foi posteriormente bem caracterizado por Birk e colaboradores (1946).

A estabilidade térmica dos inibidores de proteinase depende de seu peso molecular e do grau de estabilização da conformação ativa por pontes dissulfeto (Belitz e Grosch, 1988). O inibidor de Bowman-Birk de soja é mais estável ao calor e às variações do pH do que o inibidor de Kunitz, devido às diferenças de tamanho e números de ligações dissulfeto (Sgarbieri e Whitaker, 1982).

1.2.2.1.1-Inibidor do tipo Bowman-Birk.

Inicialmente acreditava-se que os inibidores da família Bowman-Birk (BBI) expressavam-se apenas em sementes (Hammond *et al.*, 1984). Entretanto, estudos com milho, alfafa e arroz mostraram que além de estarem presentes nas sementes, estes inibidores se

expressavam em folhas e caules submetidos à injúria (Rohrmeier e Lehle, 1993; McGurl *et al.*, 1995; Rakwal *et al.*, 2001).

Os BBIs são proteínas globulares que estão presentes em monocotiledôneas e dicotiledôneas. Em dicotiledôneas são caracterizados por suas pequenas massas moleculares, que variam de 7 a 10 kDa, podendo apresentar em torno de 70 a 90 resíduos de aminoácidos e 14 cisteínas que formam 7 pontes dissulfeto, as quais permitem a formação de uma estrutura assimétrica composta por dois domínios independentes localizados em extremos opostos da molécula (Birk, 1985; Werner and Wemmer, 1991; Prakash *et al.*, 1996; Gariani e Leatherbarrow, 1997). Nas monocotiledôneas estes inibidores apresentam uma variação de peso molecular de 8 a 20 kDa e o número de cisteínas numa mesma molécula pode chegar a 26 (Odani e Ikenaka, 1978).

Em geral, os sítios de inibição dos BBIs são “loops” (alças) localizados na superfície da molécula, os quais são formados por pontes dissulfeto e compostos por nove resíduos de aminoácidos característicos. A especificidade de inibição está relacionada ao terceiro resíduo de aminoácido presente no “loop” (N→C) que é denominada de posição P1 (Rahbé *et al.*, 2003).

O primeiro sítio ativo da maioria dos inibidores de Bowman-Birk de dicotiledôneas inibe tripsina, enquanto que o segundo sítio ativo inibe tripsina, quimotripsina e elastase (Qi *et al.*, 2005). Nestes inibidores a inibição de tripsina está relacionada à presença de lisina ou de arginina na posição P1, exceto no inibidor de soja C-II (SOYBN2) e no inibidor de feijão de porco PHAVU onde a posição P1 é ocupada pela alanina. No entanto a presença da alanina no segundo sítio ativo é específica para elastase. O resíduo P1 no segundo sítio ativo é bem variável podendo ser arginina (Arg), tirosina (Try), leucina (Leu), fenilalanina (Phe) ou alanina (Ala) sendo que a inibição da quimotripsina está relacionada principalmente pela presença de Phe (Odani e Ono, 1980; Campos *et al.*, 2004). Se o resíduo for uma arginina, a capacidade de inibir ou não uma quimotripsina depende da hidrofobicidade do resíduo P2'. Quando em P2' estiver presente um aminoácido hidrofóbico como a metionina, uma quimotripsina pode se ligar à alça, porém se nesta posição estiver presente um aminoácido hidrofílico como a glutamina, a afinidade desta alça por quimotripsina diminui. A posição P2' também é importante para a estabilidade do inibidor quanto à hidrólise, por exemplo, a isoleucina em P2' aumenta a estabilidade da molécula quando comparada a presença da asparagina. A atividade inibitória dos BBIs, segundo Maeder e colaboradores (1992), é o resultado de uma conformação inflexível da alça de inibição a qual é conferida pelo seu

tamanho reduzido, a ocorrência de uma ou mais prolinas na alça, uma treonina β -ramificada na posição P2 e pontes de hidrogênio entre P5' (Gln) e P2 (Thr) e P1' (Ser).

Estes inibidores são constituídos de uma única cadeia polipeptídica com duas ou mais regiões homólogas internas repetidas (Birk, 1985; Xavier-Filho, 1992). Uma característica marcante destas proteínas é a tendência a formarem dímeros (Laskowski e Kato, 1980; Birk, 1985).

Os BBIs se apresentam em várias isoformas, com seqüência de resíduos aminoácidos bastante idêntica. As isoformas, vindas de cisões nas regiões N e C terminais, que ocorrem durante a maturação, quiescência e germinação de sementes, podem também ser resultantes da expressão de genes distintos (Odani e Ikenaka, 1973; Tan-Wilson *et al.*, 1986). Tanto nas monocotiledôneas como nas dicotiledôneas, a porção N-terminal dos genes varia bastante, o que sugere que esta região seja menos importante na interação entre o inibidor e a proteinase (Suzuki *et al.*, 1987; Rakwal *et al.*, 2001).

Grande número desses inibidores tem sido isolados e caracterizados, e diferentes estudos vêm sendo desenvolvidos com os BBIs enfatizando seu efeito *in vitro* e *in vivo* sobre as proteinases digestivas, crescimento e desenvolvimento de insetos de diferentes ordens, dando destaque para os insetos da ordem lepdóptera, os quais possuem uma grande quantidade de proteinases serínicas em seus tratos digestivos (Applebaum, 1985). O inibidor de soja SBBI se mostrou bastante efetivo quando testado *in vitro* contra as proteinases das larvas de *Helicoverpa armigera* e quando incorporado à dieta afetaram o crescimento deste inseto (Johnston *et al.*, 1993).

Os insetos da ordem coleóptera, na maioria dos casos, apresentam como principal enzima digestiva às proteinases cisteínicas (Murdock *et al.*, 1987), alguns relatos mostraram que proteinases serínicas são detectadas em algumas espécies (Purcell *et al.*, 1992; Valencia *et al.*, 1994; Franco *et al.*, 2003). Esses estudos contribuíram para a busca de inibidores de proteinases contra coleópteros. Ortego e colaboradores (1998) mostraram que larvas de *Aubeonymus mariaefranciaca* quando alimentadas com dieta artificial contendo os inibidores SBBI, STI, TEI (inibidores de tripsina da clara do ovo) e LBI (inibidor de tripsina de feijão lima), os quais foram avaliados separados ou em combinação de dois ou três, apresentaram uma baixa taxa de sobrevivência, além de um retardo no tempo de desenvolvimento pupal e surgimento do inseto. Com relação ao ensaio *in vitro* o SBBI apresentou uma maior taxa de inibição para quimotripsina e elastase e uma taxa de inibição para tripsina semelhante aos demais inibidores. Franco e colaboradores (2003) foram os primeiros a relatar o efeito inibitório *in vitro* e *in vivo* de um BBI, purificado de semente de *V. unguiculata* denominado

BTCl, contra a atividade proteolítica de tripsina, presente no intestino de larvas do coleóptero *Anthonomus grandis*.

Estudos recentes demonstraram que esta família de inibidores possui toxicidade também para hemíptera. Rahbé e colaboradores (2003) revelaram que isoformas de BBIs de ervilha são tóxicas para o anfídeo *Acysthosiphon pisum* por retardar o desenvolvimento das ninfas. Estes autores determinaram ainda que esta atividade está atribuída ao sítio ativo de inibição para quimotripsina.

Além de serem estudados quanto à importância no controle de insetos-praga, os inibidores de proteinases vêm, também, sendo bastante estudados ao longo dos últimos anos por apresentarem atividade anticarcinogênica (Kennedy, 1998). Segundo Chen e colaboradores (1992b) neste aspecto, os BBIs são particularmente interessantes, pois são relativamente estáveis aos ácidos presentes no trato digestivo de humanos e animais. Estes autores concluíram que populações que consomem em sua dieta altos níveis de BBI têm baixas taxas de câncer de cólon, seio, próstata e pele.

1.2.2.2 - Inibidores de proteinases cisteínicas

O termo cistatina refere-se a todos os membros da família dos inibidores de proteinases cisteínicas, comprovadamente relacionado a nível evolutivo e estrutural da cistatina de galinha (Barrett, 1987; Krizaj *et al.*, 1993), elas apresentam um grande intervalo de peso molecular que vai de 5 kDa, para o inibidor de *V. unguiculata* subsp. *cylíndrica* (Rele *et al.*, 1980) até 80 kDa, para o inibidor isolado de tubérculo de batata (Waldron *et al.*, 1993). Todos os inibidores estudados possuem uma seqüência consenso central constituída pelos resíduos de aminoácidos Gln-Val-Val-Ala-Gly ou homólogos (Gln-X-Val-Y-Gly), que é essencial para a sua interação com a proteinase cisteínica alvo (Abrahanson *et al.*, 1987; Stubbs *et al.*, 1990; Auerswald *et al.*, 1992). Um resíduo de Gly também é encontrado na extremidade aminoterminal (Bode *et al.*, 1988; Machleidt *et al.*, 1989) bem como a seqüência Phe-Ala-Val-Asn-Glu-His-Asp e a seqüência Pro-Trp próximo a extremidade carboxiterminal (Fernandes *et al.*, 1993). As análises da estrutura por raios-x das cistatinas, mostraram a existência de dois dobramentos ou alças na estrutura primária destas proteínas, ambos do tipo grampo; um na região consenso central, citada anteriormente, e um segundo na extremidade carboxiterminal que são considerados essenciais para sua atividade inibitória (Abe *et al.*, 1988, Abe e Whitaker, 1988; Arai *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 1996).

Os membros da superfamília cistatina estão agrupados em quatro famílias, três de origem animal (Barrett, 1987) e uma de origem vegetal (Turk e Bode, 1991), de acordo com a similaridade da seqüência primária, presença ou não de pontes dissulfeto e peso molecular. As cistatinas de origem animal estão classificadas em três diferentes famílias: a família 1, chamada de estefinas; a família 2, conhecida como cistatina; a família 3, denominada de cininogênio (Barrett, 1987).

A quarta família denominada de fitocistatina compreende os inibidores de proteinases cisteínicas de origem vegetal (Lim *et al.*, 1996; Ojima *et al.*, 1997) que estão relacionados geneticamente a orizacistatina. Elas têm seqüências similares àquelas das estefinas e cistatinas, mas em geral não contém resíduos de cisteína e nem pontes dissulfeto (Abe *et al.*, 1987; Kondo *et al.*, 1990; Abe e Arai, 1991). Estas proteínas geralmente apresentam a seqüência Phe-Ala-Val-Asn-Glu-His-Asp, próximo a extremidade aminoterminal, que é característica bastante conservada nas cistatinas da família 1 e 2 (Kondo *et al.*, 1990, 1991; Turk e Bode, 1991; Abe *et al.*, 1992; Fernandes *et al.*, 1993). As fitocistatinas podem ser ainda subdivididas em dois grupos com base no número de domínios presentes em sua estrutura; um grupo que possui as cistatinas com cadeia polipeptídica constituída por um único domínio, onde se encontram a maioria das cistatinas vegetais, e um outro grupo que compreende as cistatinas constituídas de múltiplas cadeias polipeptídicas (Botella *et al.*, 1996) denominado de multicistatinas, que possui dois representantes, a multicistatina do tubérculo de batata (Waldron *et al.*, 1993), com oito domínios e uma multicistatina identificada no tomate (Boulter, 1993).

As especulações, na tentativa de elucidar o verdadeiro papel fisiológico das fitocistatinas, têm levado os pesquisadores a estudar mais intensamente essa classe de proteínas. Estas proteínas vêm sendo purificadas de diferentes fontes vegetais como: de arroz (Abe *et al.*, 1987; Kondo *et al.*, 1990); de sementes de feijão orelha-de-negro, *Enterolobium contortisiliquum* (Oliva *et al.*, 1987); do milho (Abe e Whitaker, 1988; Abe e Arai, 1991; Abe *et al.*, 1992); do talo de abacaxi (Lenarcic *et al.*, 1992); do tubérculo de batata (Krizaj *et al.*, 1993; Waldron *et al.*, 1993); sementes de soja (Misaka *et al.*, 1996) entre outras e também estão sendo caracterizadas.

Várias hipóteses relacionadas ao sítio reativo das cistatinas foram propostas e em estudos cristalográficos foram definidos a (as) região (ões) de contato entre as cistatinas e suas proteinases cisteínicas específicas (Matsumoto *et al.*, 1997).

Barrett em 1987 propôs um modelo de interação entre as proteinases cisteínicas e as cistatinas. Segundo o modelo, o sítio reativo das cistatinas estaria próximo à ligação peptídica do resíduo de Gly próximo à extremidade aminoterminal, que até então é conservado nas cistatinas, seja de origem animal ou vegetal. Uma segunda área de contato seria a região da seqüência consenso central altamente conservada (Gln-Val-Val-Ala-Gly) entre as cistatinas.

A cistatina de arroz e seus derivados truncados na extremidade N- e C-terminal foram estudados na tentativa de elucidar quais regiões eram responsáveis pela atividade inibitória contra a papaína mostrando que os 21 resíduos de aminoácidos aminoterminais não são necessários para a atividade inibitória da orizacistatina e nem o resíduo de Gly⁵, mas a segunda região conservada constituída por Gln⁵³-Val-Val-Ala-Gly⁵⁷ foi essencial para essa atividade. Nenhuma hipótese foi descartada de que outras regiões poderiam contribuir para a inibição da atividade da papaína (Abe *et al.*, 1988).

De acordo com um esquema proposto para a interação entre a cistatina de ovo de galinha e papaína, um resíduo de Gly⁹ próximo à extremidade aminoterminal, a seqüência consenso central constituída por Gln-Val-Val-Ala-Gly ou seus derivados e uma seqüência Pro-Trp próximo a extremidade carboxiterminal, foram considerados importantes no mecanismo de interação entre as duas proteínas (Machleid *et al.*, 1989).

Arai e colaboradores (1991), em uma investigação utilizando mutagênese sítio dirigida na região central conservada (Gln⁵³-Val-Val-Ala-Gly⁵⁷), observaram que a região da seqüência consenso central era a região primária de interação da cistatina com a papaína e responsável pela atividade inibitória. A seqüência Pro⁸³-Trp⁸⁴, próxima à extremidade carboxiterminal, atuaria como um co-fator contribuindo para o sítio ativo da papaína e que a extremidade aminoterminal que contém o resíduo de Gly⁵, não contribuía significativamente para a atividade inibitória da orizacistatina.

Zhao e colaboradores (1996) observaram que as cistatinas de soja, denominadas de N2 e R1, tinham substancialmente maior atividade inibitória contra a papaína que a forma L1. A diferença na atividade inibitória da papaína, entre as três isoformas, indicava que outros resíduos além da seqüência consenso central (Gln-X-Val-Y-Gly) e o Trp no primeiro e segundo dobramento do tipo grampo na estrutura primária da proteína, mediavam a atividade do inibidor. Todas as três isoformas apresentavam em sua seqüência primária o resíduo de Trp¹²⁷ próximo à extremidade carboxiterminal, um resíduo de Gly próximo à extremidade aminoterminal. Na região central, L1 e R1 apresentavam as seguintes seqüências, Gln-Val-Val-Ser-Gly enquanto que N2 apresentava Gln-Val-Val-Ala-Gly. Os dados cristalográficos

não mostraram um envolvimento funcional das pontes dissulfeto na interação entre cistatinas e papaína (Bode *et al.*, 1988; Stubbs *et al.*, 1990; Turk e Bode, 1991).

Os relatos encontrados na literatura científica mostram que os efeitos dos inibidores de proteinases cisteínicas quando incorporados à dieta dos insetos podem resultar em uma maior taxa de mortalidade, diminuição do ganho de peso e fecundidade reduzida. Wolfson e Murdock (1987) relataram que o consumo de folhas de batatas tratadas com E-64, um potente inibidor de proteinase cisteínica, retardou o crescimento e desenvolvimento do besouro da batata do Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*. Larvas de gorgulho do feijão-de-corda, *C. maculatus*, tratadas com dietas artificiais contendo E-64 em concentrações de 0,01-0,25% por peso, prolongou o tempo de desenvolvimento do inseto e níveis de 0,09% de E-64 aumentou a mortalidade em 50% e reduziu a fecundidade das fêmeas (Murdock *et al.*, 1988). Larvas neonatas de *Diabrotica undecimpunctata* e *L. decemlineata*, ambos coleópteros, alimentados com dietas artificiais contendo E-64, tiveram suas atividades proteolíticas intestinais do tipo cisteínicas, inibidas em 69% e 100%, respectivamente (Purcell *et al.*, 1992). Orr e colaboradores (1994) observaram a ocorrência de 75% e 92% de inibição homogenato intestinal de larvas de *D. undecimpunctata* e *D. virgifera*, respectivamente, por ação do E-64, enquanto que a multicistatina de tubérculo de batata (PMC) mostrou-se 38% menos efetiva para ambos as espécies de coleópteros. O PMC, introduzido em dietas artificiais, reduziu em 50% o crescimento de larvas neonatas de *D. undecimpunctata* e 70% em larvas neonatas de *D. virgifera*. Michaud e colaboradores (1996) mostraram que as proteinases cisteínicas digestivas de *L. decemlineata* e *Otiorhynchus sulcatus* foram inibidas significativamente por ação da orizacistatina-I quando usada em doses excessivas.

1.2.3-PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS EXPRESSANDO INIBIDORES

Plantas geneticamente modificadas expressando inibidores estão sendo utilizadas como uma alternativa ao uso de pesticidas e inseticidas químicos. A busca de fatores aplicados à resistência de plantas a insetos-praga e patógenos tem recebido considerável importância, e neste sentido, a engenharia genética oferece a possibilidade da introdução de genes que podem tornar as plantas menos susceptíveis a insetos. Ênfase vem sendo dada a utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas com atividade inseticida, devido seu poder de reduzir e/ou provocar a morte dos insetos.

A síntese e o acúmulo destas proteínas ocorrem em diferentes estágios de desenvolvimento das plantas, sendo normalmente encontradas em tecidos de armazenamento como sementes e tubérculos. Existem evidências de que o aumento destes compostos nos tecidos vegetais está relacionado com ferimentos ou alimentação de insetos ou danos mecânicos menores (Ryan, 1990). Diante disto, é esperado que estas proteínas, independente de sua origem, desempenhe sua função biológica em resposta ao ataque do inseto alvo na planta geneticamente modificada.

Um aspecto bastante importante, quanto ao uso de genes codificadores de inibidores de enzimas em transformação de planta, com o intuito de controlar o ataque de insetos, é a seleção destes inibidores a partir de estudos detalhados, levando em consideração a fisiologia e a bioquímica de sua digestão pelo inseto.

O primeiro relato de plantas transgênicas expressando inibidores protéicos se deu em 1987, quando Hilder e colaboradores introduziram em plantas de fumo, via *Agrobacterium tumefaciens*, um gene que codifica um inibidor de proteinase serínica do tipo Bowman-Birk de feijão de corda (*V. unguiculata*), denominado de CpTI. A expressão deste gene foi controlada pelo promotor 35S de expressão constitutiva do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). Os transformantes revelaram índices de expressão do CpTI de aproximadamente 1% da proteína total solúvel. Este extrato foi utilizado para a realização de bioensaios contra larvas de *Heliothis virescens*, mostrando que houve uma diminuição da sobrevivência e biomassa do inseto, além de uma redução de aproximadamente 50% de danos quando comparadas com as plantas controle. Este efeito também foi observado quando testado contra outros lepidópteros como *Helicoverpa zea*, *Spodoptera littoralis* e *Manduca sexta*. Este mesmo gene foi transferido para outras culturas como o arroz, demonstrando em campo, um aumento significativo de resistência contra duas de suas pragas, *Sesamia inferens* e *Chilo suppressalis* (Xu *et al.*, 1996).

Desde então, muitas outras plantas de interesse comercial como cereais, batata, feijão e ervilha foram transformados com genes codificadores de inibidores de proteinases serínicas e passaram a apresentar resistência a pragas oferecendo proteção efetiva contra, por exemplo, a insetos-praga (Ishimoto *et al.*, 1996; Gatehouse *et al.* 1999; Duan *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996; Morton *et al.*, 2000), entretanto poucos são os casos da utilização de inibidores de proteinase serínica contra coleópteros (De Leo *et al.*, 2001).

Muitos desses inibidores tais como o inibidor de tripsina de soja e o de feijão-de-corda, afetam o desenvolvimento de vários insetos lepidópteros (Broadway e Duffey, 1986), os

quais possuem uma grande quantidade de proteinases serínicas em seus tratos digestivos (Applebaum, 1985).

O inibidor MTI-2 de mostarda foi eficiente contra larvas de *Plutella xylostella*, quando expresso em plantas de *Arabidopsis thaliana*, causando altos níveis de mortalidade e uma acentuada redução no desenvolvimento, sendo também eficiente contra *Mamestra brassicae* (L.), quando expresso em folhas de fumo transgênicos e contra *S. litoralis*, quando expresso em sementes de granola (De Leo *et al.*, 2001).

Falco e colaboradores (2003) mostraram que o inibidor de Bowman-Birk SBBI e o inibidor tipo Kunitz SKTI, ambos de plantas de soja, quando expressos individualmente em plantas de cana-de-açúcar transgênicas retardaram significativamente o desenvolvimento das larvas da *Diatraea saccharalis*.

Os inibidores de proteinases cisteínicas também vêm sendo utilizados para transformação de plantas visando o controle dos insetos pertencentes principalmente à ordem coleóptera. A maioria dos genes que codificam para estes inibidores mostrou efeitos deletérios contra coleópteros quando incorporados em dieta artificial (Chen *et al.*, 1991a; Orr *et al.*, 1994; Edmonds *et al.*, 1996; Koiwa *et al.*, 1998) e poucos são os relatos que mostram o efeito destes, quando introduzidos em plantas transgênicas. A atividade inibitória da cistatina-I do milho purificada das sementes de arroz transgênicos foi avaliada inibindo 50% das proteinases digestivas de *Sitophilus zeamais*, inseto que infesta as sementes do arroz (Irie *et al.*, 1996). Relatos mostraram que cistatinas também oferecem resistência a nematóides quando expressados em plantas geneticamente modificadas. A orizacistatina – I (OC-I) e uma forma variante, contendo deleção em um resíduo de Asp86, denominada de OC-I D86, quando expressadas em raízes de fumo tiveram suas atividades avaliadas contra papaína e proteínase digestiva de *Caenorhabditis elegans* e de *Globodera pallida* e quando incorporadas na dieta estas proteínas foram efetivas em reduzir o tamanho e a fecundidade de ambas as espécies (Urwin *et al.*, 1995). Urwin e colaboradores (1997) mostraram que a cistatina de arroz expressada e regenerada de *A. thaliana* provocou efeitos significativos na atividade das proteinases digestivas de fêmeas de *H. schachtii* e *M. incognita* causando redução no tamanho e na fecundidade.

Os primeiros relatos de plantas transgênicas utilizando inibidores de α -amilases dizem respeito à produção de ervilhas transgênicas expressando o gene de α AI-1 em níveis suficientes para tornar as sementes resistentes aos bruquídeos *C. maculatus*, *C. chinensis* e *Bruchus pisorum* (Shade *et al.*, 1994; Chrispeels, 1996). Posteriormente, Ishimoto e colaboradores (1989) demonstraram o efeito inseticida deste mesmo inibidor em plantas de

feijão azuki completamente resistente ao caruncho, *C. maculatus*. Em experimentos recentes, Morton e colaboradores (2000), mostraram que ervilhas transgênicas expressando α AI-2 mostraram-se menos protegidas ao ataque de caruncho, *B. pisorum*, quando comparada com as ervilhas que expressão o α AI-1.

2-APRESENTAÇÃO

A elaboração do projeto que deu origem a este trabalho de tese teve como base os resultados obtidos nos trabalhos desenvolvidos pelo pesquisador Arnubio Valencia da Universidade de Caldas, Manizales-Colombia e colaboradores. Em 1994 este pesquisador mostrou a presença da atividade proteolítica da tripsina e quimotripsina no intestino de larvas da broca-do-café e em 2000 mostrou a presença da atividade proteolítica da α -amilase em larva e inseto adulto da broca-do-café e a ação de inibidores sobre estas atividades enzimáticas. Posteriormente, utilizando extratos protéicos de semente de feijão selvagem *P. coccineus*, Valencia detectou atividade inibitória de inibidores de α -amilases contra α -amilases da broca-do-café (resultados não publicados). Diante destes resultados, e em colaboração com o pesquisador, acima mencionado, sementes de *P. coccineus* acesso 35590 e 35619 foram utilizadas como material biológico para o desenvolvimento deste trabalho de tese, cujos resultados foram divididos em dois capítulos, I e II. Ainda como parte deste trabalho foi feita a purificação e caracterização bioquímica de um inibidor de proteinase cisteínica de sementes de algaroba que se mostrou bastante ativo contra as proteinases digestivas de insetos-praga de grãos armazenados de feijão, cujos resultados estão mostrados no capítulo III.

Primeiro capítulo:

Os estudos relatados neste capítulo envolveram: a identificação de moléculas de inibidores bioativas para o inseto-praga, *H. hampei*, presentes em sementes de *P. coccineus* acesso 35590; a clonagem do gene para inibidor α AI-Pc1 via técnica de PCR; expressão do gene α AI-Pc1 em plantas de fumo e a confirmação da atividade anti-metabólica sobre as α -amilases de *H. hampei*.

Segundo capítulo:

Utilizando sementes de *P. coccineus* acesso 35619, cujo extrato protéico, apresenta atividade de inibição para α -amilases e proteinases de *H. hampei*, foi purificado um inibidor de Bowman-Birk, denominado de PcBBI1, com massa molecular de 8.689 Da, por meio de técnicas cromatográficas. O inibidor PcBBI1 apresenta alta eficiência em inibir as proteinases séricas de *H. hampei* indicando seu uso promissor na obtenção de plantas de café resistente à broca-do-café.

Terceiro capítulo:

Os resultados relatados neste capítulo mostram a purificação de um inibidor de proteinase cisteínica, isolado de algaroba por meios cromatográficos. Este inibidor é do tipo Kunitz com massa molecular de 20.000 Da e apresenta atividade inibitória para proteinases cisteínicas de pragas de feijão armazenado, como: *A. obtectus*, *C. maculatus* e *Z. subfasciatus* e contra; e para proteinases cisteínicas de *M. mimosae*, coleóptera que infesta semente de algaroba.

3-OBJETIVOS

- ❖ Identificar moléculas bioativas de sementes de *P. coccineus* com potencial inseticida para o controle da broca-do-café e viabilizar sua utilização via engenharia genética.
- ❖ Isolar inibidores de algaroba (*P. juliflora*) com poder inseticida para o controle de insetos-praga que infestam grãos de feijão armazenados,

3.1- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Caracterizar as moléculas protéicas (inibidores de α -amilase e de proteinases) oriundas de sementes de *P. coccineus* e *P. juliflora*.
- ❖ Isolar o gene para o inibidor α AI-Pc1 presente em *P. coccineus*.
- ❖ Construir vetores de expressão com o gene α AI-Pc1 para introdução em plantas de fumo e café.
- ❖ Transformar plantas de fumo, via *Agrobacterium*, para validar a ação inseticida da proteína recombinante α AI-Pc1.

1-ABSTRACT

Plant α -amylase inhibitors are proteins found naturally in a wide range of plants with a significant role in the natural defense system of those against insect-pests. A new gene encoding for an α -amylase inhibitor protein of 223 amino acids residues, named α AI-Pc1, was isolated from a wild bean *Phaseolus coccineus*. This inhibitor has 70-98% amino acid identity with the other known bean α -amylase inhibitors. The α AI-Pc1 gene driven by the PHA-L phytohemagglutinin promoter was introduced into tobacco plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. The presence and expression of the α AI-Pc1 gene in regenerated (T0) and progeny (T1) transformant plants were determined by PCR amplification, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblot analysis. Seed protein extracts from selected transformant reacted positively with polyclonal antibody raised against α AI-1, while no reaction was observed with untransformed plants. Immunological assays showed that α AI-Pc1 represented up to 0.05% of the total soluble proteins in seeds of T0 plants. The recombinant inhibitor expressed in tobacco plants was highly efficient, inhibiting 65% of the *H. hampei* α -amylase activity at 125 ng. The data presented suggest the potential use of α AI-Pc1 gene as a candidate to be introduced in coffee plants aiming resistance to coffee berry borer.

2-RESUMO

Inibidores de α -amilases vegetais são proteínas encontradas naturalmente em variantes selvagens de plantas com papel significativamente no sistema de defesa natural destas contra insetos-praga. Um gene que codifica um inibidor de α -amilase de 223 resíduos de aminoácidos, denominado $\alpha AI-Pc1$ foi isolado de sementes de feijão silvestre *Phaseolus coccineus*. Este inibidor apresenta de 70 a 98% de identidade de aminoácidos com outros inibidores de α -amilases de feijão, já descritos. O gene $\alpha AI-Pc1$ regulado pelo promotor da fitohemaglutinina PHA-L foi introduzido na transformação de plantas de fumo, via *Agrobacterium tumefaciens*. A presença e expressão do gene $\alpha AI-Pc1$ em plantas transformadas (parental T0 e geração T1) foi determinada por PCR, Western blot e ELISA. Extrato protéico das sementes de plantas transformadas selecionadas reagiram positivamente com o anticorpo policlonal contra o anticorpo $\alpha AI-1$, enquanto que nenhuma reação foi observada em plantas não transformadas. Ensaio imunológico mostraram que $\alpha AI-Pc1$ representa cerca de 0,05% da proteína solúvel total de sementes de plantas (T0). A proteína recombinante expressa em plantas de fumo foi biologicamente ativa, cerca de 125 ng de inibidor $\alpha AI-Pc1$ mostrou inibir 65% da atividade da α -amilase de *H. hampei*. Estes resultados sugerem que o inibidor $\alpha AI-Pc1$ pode ser um candidato promissor para a obtenção de plantas de café resistentes à broca-do-café.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-MATERIAIS

3.1.1-Material Biológico

Feijão - Sementes de feijão não cultivado da espécie *P. coccineus* acesso 35590 foi fornecido pelo Departamento de Química da Universidade de Caldas em Manizales na Colombia.

Insetos - Colônias de *H. hampei* (broca-do-café) foram doadas pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), Londrina, Paraná, Brasil.

3.1.2-Enzimas

α -Amilase pancreática de porco – Sigma (St. Louis, MO)

Enzima utilizada nos ensaios de detecção enzimática e de inibição

BSA (Albumina Sérica Bovina) – Sigma (St. Louis, MO)

Utilizada nos experimentos de imunoreação e quantificação protéica

Taq DNA polimerase – Gibco-BRL (5 U/ μ L)

Fornecida com o seu tampão 10X e utilizada nas reações de PCR

T4 DNA Ligase – Gibco-BRL (1 U/ μ L)

Fornecida com o seu tampão 5X e utilizada nas reações de ligação

BsmI - BioLabs (10 U/ μ L)

EcoRI - Promega (10 U/ μ L)

HindIII - Promega (10 U/ μ L)

XbaI - Invitrogen (10 U/ μ L)

Enzimas de restrição utilizadas na clonagem

3.1.3-Soluções e tampões

Acrilamida/ Bis-acrilamida

Acrilamida 29,2 g

Bisacrilamida 0,8 g

q.s.p. 100 mL de H₂O destilada

CTAB pH 8,0

Tris 0,1 M (pH 8,0)
CTAB 2%
EDTA 20 mM
NaCl 1,4 M
PVP 1%
HCL para ajustar o pH
q.s.p. 100 mL de H₂O destilada

Gelatina 3%

Gelatina 0,3 g
q.s.p. 10 mL de TBS pH 7,5 (Tris 50 mM, NaCl 150 mM)

HCl 0,1M, NaCl 0,15M

NaCl 4,16 g
HCl 3,3 mL
q.s.p. 500 mL de H₂O destilada

PBS pH 7,4

Na₂HPO₄ 1 M 68,4 mL
NaH₂PO₄ 1 M 31,6 mL
NaCl 2,5 M 58 mL
q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

Persulfato de amônio 10%

Persulfato de amônio 10 g
q.s.p. 100 mL de H₂O destilada

SDS 10%

SDS 10 g
q.s.p. 100 mL de H₂O destilada

Solução descorante para gel de poliacrilamida

Etanol 400 mL
Ácido acético 100 mL
q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

Solução corante para gel de poliacrilamida

Coomassie brilliant blue R250 1 g
Metanol 400 mL
Ácido acético 100 mL
q.s.p. 500 mL de H₂O destilada

Solução reveladora (Western blot)

Solução A: 50 mL de TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM)
 30µL de H₂O₂ (água axigenada)

Solução B: 30 mg de HRP
 10mL de metanol gelado

Juntar as soluções A e B, apenas na hora da revelação.

Tris 0,1 M pH 8,0

Tris 12,12g
HCl para ajustar o pH
q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

Tris 1 M pH 7,5

Tris 121,14g
HCl para ajustar o pH
q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

TBS pH 7,5 (Tris 50 mM, NaCl 150 mM)

Tris 1 M 25 mL
NaCl 5 M 15 mL
q.s.p. 500 mL de H₂O destilada

TBS/Tween 0,02%

TBS (Tris 50 (mM), NaCl 150 mM)	48 mL
Tween	12 µL

Tampão de corrida para eletroforese

Tris	3 g
SDS	1 g
Glicina	14,4 g

q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

Tampão de amostra para gel de agarose (TEB) 10X

Glicerol	50% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (v/v)
Xileno cianol	0,1% (v/v)

Os reagentes foram dissolvidos em TEB 10X

Tampão de extração protéica de sementes de fumo (pH 8,0)

Tris 1 M	500 µL
NaCl 5 M	60µL
β-mercaptoetanol	100µL
Triton X-100	10µL

q.s.p. 10 mL de H₂O destilada

Tampão de transferência

Glicina 192 mM	1,4 g
Tris 25mM	3,03 g
Metanol	20 mL

q.s.p. 100 mL de H₂O destilada

3.1.4-Reagentes

Anticorpos – Anti-inibidor αAI-1 de coelho, cabra anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase e cabra anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina.

Marcador de massa molecular – Para DNA, 1Kb Ladder (Gibco) e 1Kb Plus Ladder (Gibco) e para proteína BenchMark Prestained Protein Ladder (Gibco)

TEMED – Sigma (St. Louis, MO)

Mistura de dNTP – 100 mM/cada - Eppendorf

IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo 1M – 0,238 g de IPTG/mL de água mili Q

A solução foi esterilizada utilizando filtro Milipore 0,2 μm e estocada a -20°C.

3.1.5- Linhagem bacteriana

Escherichia coli – XL1-Blue

Agrobacterium tumefaciens – EHA 105

3.1.6-Plasmídeos

pTA2 – (3960 pb) Possui o promotor da fitohemaglutinina (PHA)

pCAMBIA 1390 – (9278 pb) Vetor utilizado na transformação de plantas de fumo via *A. tumefaciens*.

pCAMBIA 2300 – (10400 pb) Vetor utilizado na transformação de plantas de café via bombardeamento.

3.1.7-Meios de cultura

Meio LB, pH 7,0

Peptona de caseína	1,0% (p/v)
Extrato de levedura	0,5% (p/v)
NaCl	1,0% (p/v)

Meio LB agar

Meio LB adicionado à ágar bacteriológico para uma concentração final de 1,4% (p/v)

3.1.8-Antibióticos

Solução estoque:

Ampicilina 100 mg/mL

Canamicina 50 mg/mL

Cefotaxima 250 mg/mL

Higromicina 50 mg/mL

Estas soluções foram preparadas em água mili Q, esterilizadas em filtro Milipore 0,2 μm e estocadas a -20°C .

3.2-METODOLOGIA

3.1-CLONAGEM DO GENE α AI-*Pc1*

Folhas jovens de acesso selvagem de feijão *P. coccineus* foram coletadas e maceradas com nitrogênio líquido. Em seguida, o DNA genômico foi extraído utilizando o DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen) obtendo-se uma concentração de 59 ng de DNA/ μ L.

Por intermédio da técnica de PCR, o DNA genômico foi utilizado como molde para a amplificação de genes que codificam inibidores de α -amilase. Devido à alta homologia entre os inibidores de feijão, a amplificação destes genes foi realizada utilizando iniciadores específicos das extremidades 5' e 3' da seqüência gênica do α AI-1 (*P. vulgaris*), SFIAI1F 5' CCCGGCCCAGGCGGCCGCCACCGAAACCTC 3' e SFIAI1R 5' CCGGCCGGCCTGGCCGAGGATCTTGTTGAGACT 3', respectivamente. Já disponíveis no laboratório, estes iniciadores vem sendo utilizados na seleção de fagos da biblioteca de inibidores de α -amilase, os quais contêm um sítio de restrição de Sfi. Reação de PCR com um volume final de 25 μ L foi realizada nas seguintes condições: 200 μ m dNTP's, 0,5 μ m iniciadores SFIAI1F e SFIAI1R, tampão da enzima 1X, 2U de Taq DNA polimerase e 354 ng de DNA molde. A técnica de PCR foi feita em duas etapas, sendo a segunda com 1 μ L proveniente da primeira. Cada etapa consistiu de 30 ciclos. O termociclador foi ajustado para as seguintes condições de tempo e temperatura: 94°C, 30 s para desnaturação; 55°C, 45 s para anelamento e 72°C, 1 min e 30 s para alongação. Os genes, após serem amplificados, foram visualizados em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo 0,1%. Os fragmentos com aproximadamente 669 pb foram purificadas utilizando o kit GeneClean (Q.Biogene). Após a purificação, o gene foi clonado no vetor pGEMt-easy (Promega) o qual possui o gene de resistência a ampicilina. O vetor modificado foi inserido em células de *E. coli* (linhagem XL1-BLUE) por eletroporação. O DNA plasmidial das colônias positivas foi extraído com o kit QIAprep Spin MiniPrep (Quiagen) e clivados com *Eco*RI a 37°C por 2 horas. De um total de 28 clones analisados, 20 apresentaram fragmentos de aproximadamente 669 pb.

3.2.2-SEQÜENCIAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO GENE α AI-*Pc1*

Os 20 clones acima citados foram seqüenciados no seqüenciador automático ABI. Para cada clone foi utilizando 400 ng de DNA (100 ng/ μ L) e 5 pmoles dos iniciadores T7 e SP6 (2,5 pmoles/ μ L). As seqüências obtidas foram submetidas ao banco de dados do GeneBank

pelos programas BLASTp, BLASTn e BLASTx no endereço eletrônico do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Entre estes clones, 6 apresentaram homologia com inibidores de α -amilase. A seqüência gênica final correspondente ao inibidor foi obtida a partir do consenso destes clones após serem rigorosamente analisados. A seqüência protéica foi obtida utilizando o programa Translate (ExPASy molecular Biology Server). O grau de identidade e similaridade entre a seqüência protéica com as seqüências dos inibidores contida no banco de dados, foi verificado. O alinhamento das seqüências foi adquirido utilizando o programa CLUSTALW e o dendrograma resultante do alinhamento editado no programa TreeView. A massa molecular e o pI da proteína foi calculado utilizando o programa Protein Machine no ExPASy Molecular Biology Server (<http://bo.expasy.org>). A seqüência protéica também foi analisada quanto aos possíveis sítios de glicosilação N-oligossacarídeos, os quais podem ocorrer durante as modificações pós-traducionais. Esta análise foi realizada através do ExPASy Molecular Biology Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) para as N-Glicosilações.

3.2.3-INSERÇÃO DO GENE α AI-Pc1 EM VETORES DE EXPRESSÃO DE PLANTAS.

3.2.3.1-Vetor pCAMBIA 1390 para transformação de plantas de fumo

A região codante do gene α AI-Pc1 foi amplificada por PCR utilizando iniciadores construídos de forma a adicionar na extremidade 5' um sítio de restrição para *Bsm* I seguido do peptídeo sinal do inibidor α AI-1 de *P. vulgaris* (α AI-PCF 5' CCCGAATGCATGGCTTCCTCCAAGTTACTCTCCCTAGCCCTCTTCCTTGCGCTTCTCAGCCACGCAAACCTCAGCCACCGAAACCTCCTTC 3') e na extremidade 3' um sítio de restrição para *Xba*I e códon de terminação (α AI-PCR 5' CCCTCTAGACTATCAGAGGATGTTGTTGAG 3'). O produto de PCR de 750 pb, composto pelo gene estrutural α AI-Pc1 e peptídeo sinal, foi clonado no vetor pTA2-LLP (Grossi-de-Sá *et al.*, 1997b) contendo o promotor semente específico da fitohemaglutinina PHA-L de 550 pb. Este vetor foi inicialmente digerido com *Bsm*I e *Xba*I, e ligado ao produto de PCR, originando a construção pTA2- α AI-Pc1 (**Figura 08**). O fragmento de DNA de 1300 pb formado pelo PHA-L, gene α AI-Pc1 e peptídeo sinal presente no vetor pTA2- α AI-Pc1 foi obtido por digestão com *Hind*III e *Eco*RI e em seguida clonado no vetor pCAMBIA 1390 que contém o gene *npt II* para seleção em canamicina e *hpt II* para seleção

em higromicina, originando a construção denominada pCAMBIA 1390/ α AI-*Pc1* (**Figura 09**) utilizada na transformação de plantas de fumo via *A. tumefaciens*.

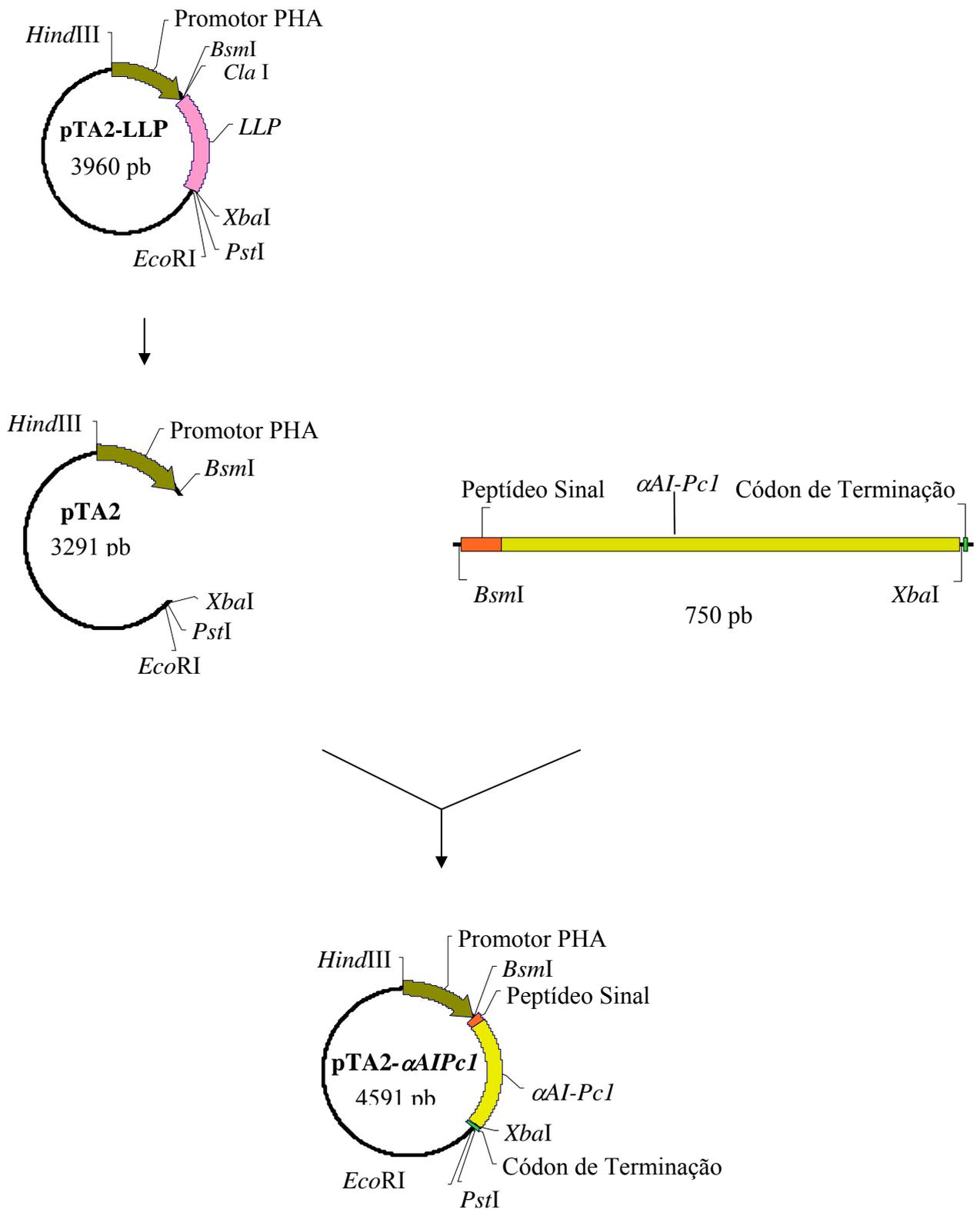


Figura 08: Subclonagem do gene $\alpha AI-PcI$ em vetor de expressão pTA2

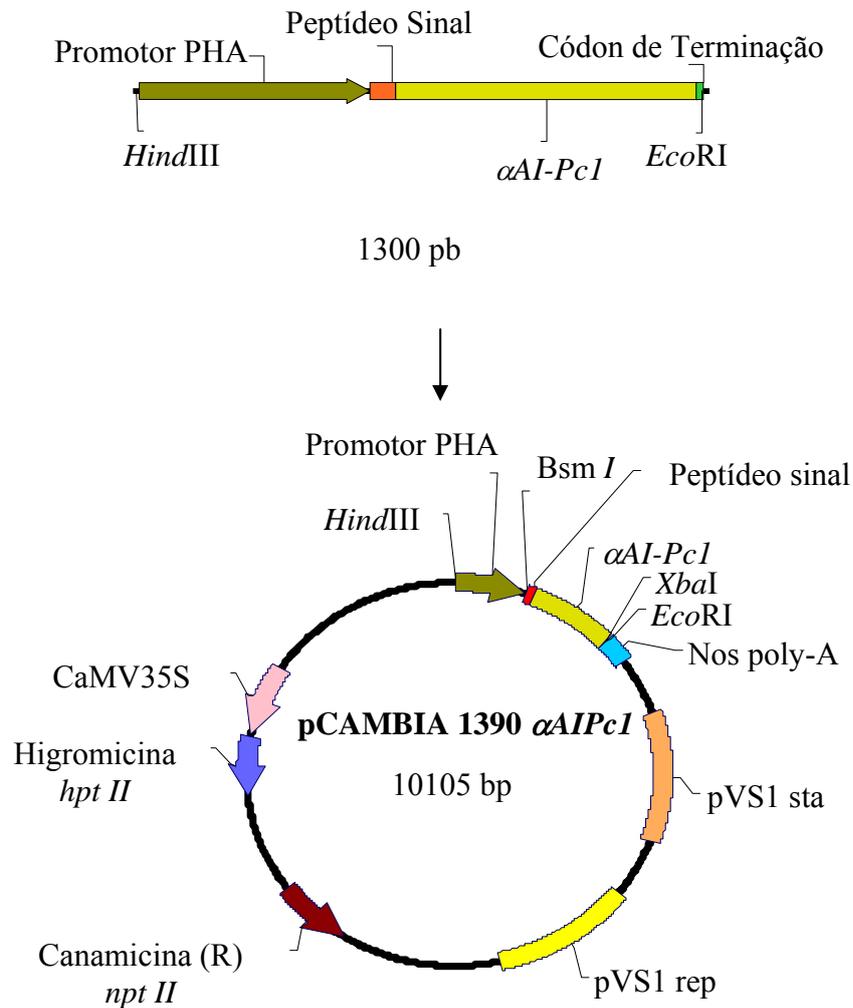


Figura 09: Introdução do fragmento de aproximadamente 1300 pb no vetor binário pCAMBIA 1390.

Promotor PHA: promotor semente específico da fitohemagutina

CaMV35s: promotor do vírus do mosaico branco da couve-flor

$\alpha AI-Pc1$: gene clonado de semente de *P. coccineus*

Nos poly-A: terminador da Nopalina Sintase

***hpt II*:** gene de resistência a higromicina

***npt II*:** gene de resistência a canamicina

pVS1 rep: origem de replicação em *A. tumefaciens*

pVS1 sta: estabilidade (divisão)

3.2.3.2-Vetor pCAMBIA 2300 para transformação de plantas de café

O Laboratório de Transformação Genética de Plantas da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia estabeleceu o protocolo de transformação de plantas de café via bombardeamento utilizando o vetor pCAMBIA 2300 que contém o gene *npt II* para seleção a canamicina, o qual será utilizado para transformar plantas de café com o gene *α AI-PcI*.

Inicialmente o fragmento de DNA de 1300 pb contendo o promotor PHA-L, gene *α AI-PcI* e peptídeo sinal foi subclonado no vetor p α AI1tocs, que contém o terminador da octopina sintase (650 pb), originando a construção determinada de pTA2- *α AI-PcI/tocs* (**Figura 10**). O vetor p α AI1tocs após ser digerido com *HindIII* e *EcoRI*, liberou um fragmento de aproximadamente 1950 pb que foi, então, introduzido no vetor pCAMBIA 2300, originando a construção pCAMBIA 2300/ *α AI-PcI* (**Figura 11**), a qual vem sendo utilizada nos experimentos de transformação de plantas de café, via bombardeamento.

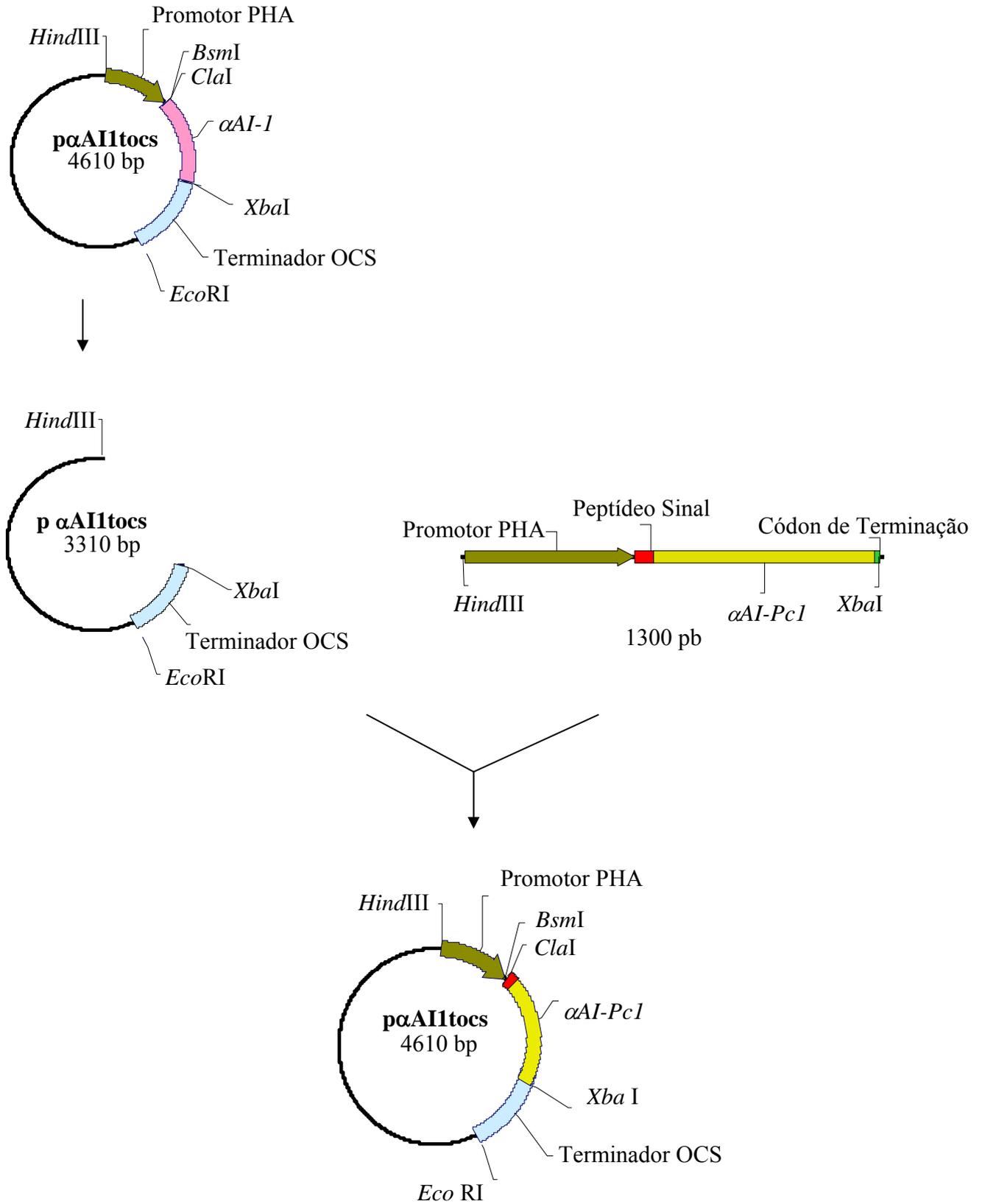


Figura 10: Subclonagem do gene $\alpha AI-Pc1$ em vetor de expressão $p\alpha AI1tocs$ (vetor pTA2 contendo o promotor da PHA-L e terminador da octopina sintase).

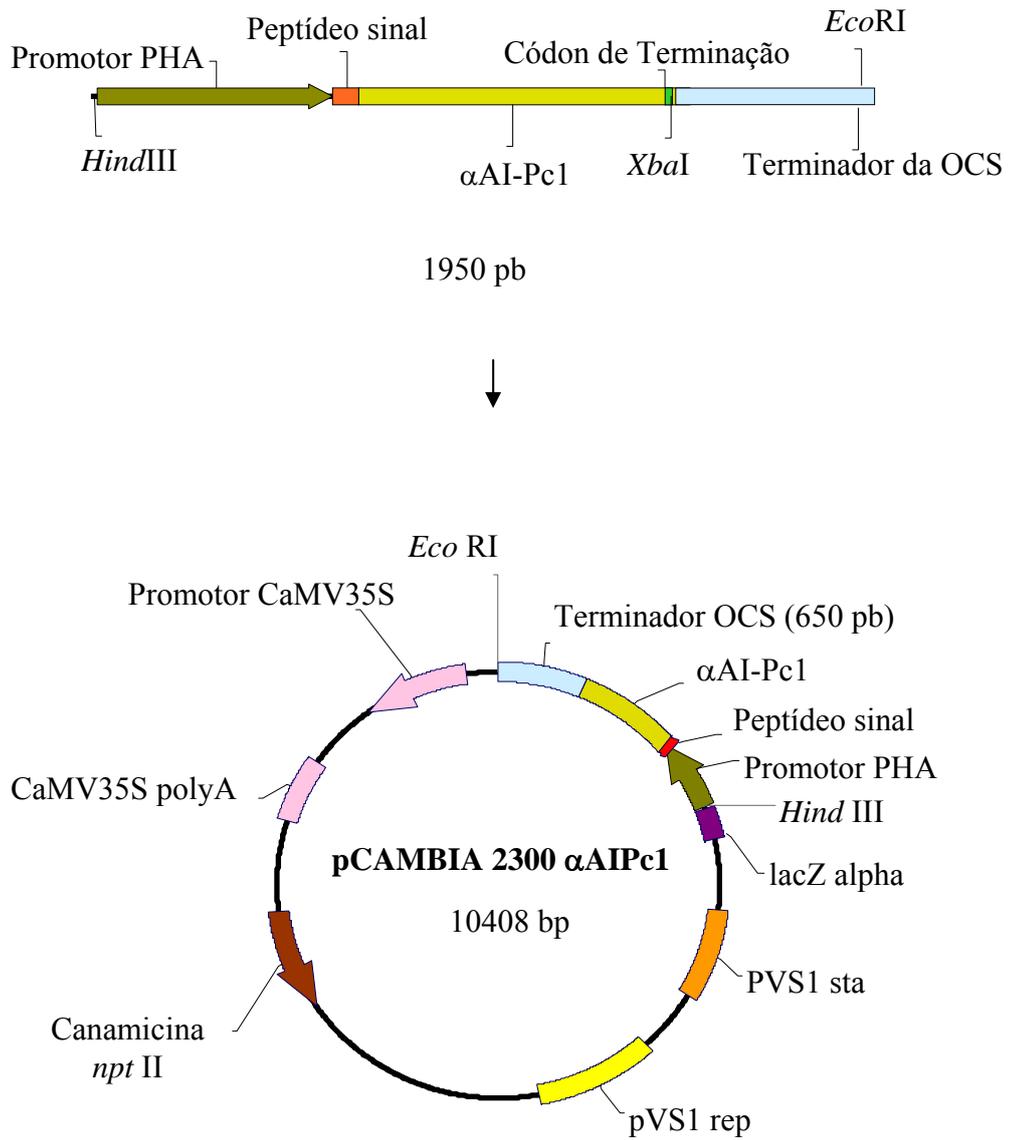


Figura 11: Introdução do fragmento de 1950 pb no vetor pCAMBIA 2300

3.2.4-TRANSFORMAÇÃO DE PLANTAS DE FUMO

O vetor pCAMBIA 1390/ α AI-*Pc1* foi introduzido em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* cv Xanthi) via *A. tumefaciens* cepa EHA 105. O vetor binário foi transferido para *Agrobacterium* por eletroporação. Folhas jovens de planta de fumo, após desinfecção com hipoclorito, foram transformadas utilizando o método descrito por Horsh e colaboradores (1985). Cinco diferentes colônias contendo a construção foi crescida em 5 mL de meio YEB (Verviliet *et al.*, 1975) contendo rifampicina (100 μ g/mL) e canamicina (100 μ g/mL) por 16 horas a 28(+/-)°C. A suspensão bacteriana após atingir a D.O._{600nm} desejada foi centrifugada a 6000 rpm por 5 minutos e o precipitado foi ressuspenso com 800 μ L de MgSO₄. Para os experimentos de co-transformação, vinte explantes foliares, distribuídos em placa de Petri contendo 20 ml de meio MS líquido (Murashige *et al.*, 1962), foram incubados com os 800 μ L da cultura por 20 minutos a temperatura ambiente e na ausência da luz. Em seguida, os explantes foram transferidos para meio MS sólido (0,7% agar) e mantidos em câmara de crescimento 28±2°C por 2 dias. Para regeneração e seleção, os explantes foram transferidos para MS sólido (0,65%) contendo 1 mg/mL benlaminopurine (BAP), 500 μ g/L de cefotaxima e 25 μ g/mL de higromicina e mantidos em câmaras com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de 25±2°C. Para o desenvolvimento das raízes, as plântulas foram transferidas para frascos tipo magenta contendo o mesmo meio de regeneração (MS sólido 0,06%) sem BAP até serem transferidas para o solo em casa de vegetação. Como controle, o vetor pCAMBIA 1390 vazio foi submetido ao mesmo procedimento acima descrito. Plantas resistentes a higromicina foram analisadas por PCR e transferidas para o solo e crescidas em casa de vegetação a 25±10°C. As sementes foram coletadas após 4 meses.

3.2.5-ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES

3.2.5.1-Análise por PCR

O DNA genômico de folhas jovens de 14 transformantes (parental T0 e geração T1) foram extraídos utilizando o método CTAB (Murray e Thompson, 1980) com algumas modificações. Para confirmar a presença do gene α AI-*Pc1*, o DNA genômico foi utilizado como molde para a amplificação do gene por meio da técnica de PCR, anteriormente já descrita, utilizando como iniciadores o α AI-PCF e α AI-PCR.

3.2.5.2-Análise da frequência de transformação

Sementes de plantas de fumo transformadas foram coletadas e esterilizadas em 1 mL de álcool 70% por 5 minutos, seguido da adição de 1 mL de água sanitária 20% por 30 minutos. Após a lavagem com água estéril no fluxo, as sementes foram colocadas para germinar em placa de Petri contendo meio MS sólido na presença e ausência de higromicina 25 µg/mL. A frequência de transformação foi calculada pela diferença das sementes geminadas na ausência e presença do antibiótico. Sementes de plantas não transformadas foram utilizadas como controle.

3.2.5.3-Extração protéica

As proteínas presentes em sementes de plantas de fumo foram extraídas utilizando o método descrito por Grossi de Sá e colaboradores (1997b). Cerca de 250 mg de sementes foram macerada em cadinho, utilizando 1 mL de tampão de extração Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contendo 0,1% de Triton X-100, NaCl 30 mM e 1% de 2-mercaptoethanol. O homogenato foi centrifugado a 12.000 x g por 20 min e o sobrenadante (extrato total) foi utilizado para a realização do Western blot, ELISA e para os ensaios de atividade (sem 2-mercaptoethanol). A concentração de proteína foi determinada de acordo com o método descrito por Bradford (1976).

3.2.5.4-Western blot

A presença da proteína recombinante α AI-Pc1 nas sementes dos transformantes foi visualizada por Western blot (Sambrook *et al.*, 1989). Inicialmente, eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturante (SDS-PAGE) 13%, foi realizado como descrito por Shagger e von Jagon (1987) utilizando 150 µg de proteína extraídas das sementes. Após a separação por SDS-PAGE, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose 0,45 µm (*Hybond C*) durante 50 minutos, a 15 Volts, em sistema de transferência semi-úmido (Bio-Rad). Após a transferência, a membrana foi bloqueada com uma solução de gelatina a 3% em tampão TBS, contendo Tween-20 0,05% (TBS-Tween) durante toda noite a 4°C. Seguida de 3 lavagens rápidas com tampão TBST, a membrana foi incubada durante 2 horas a 37°C numa solução contendo o anticorpo primário policlonal

produzido em coelho contra α AI-1 (Grossi-de-Sá *et al.*, 1997b) diluído 1:750 em gelatina 0.3% em tampão TBS. A membrana foi submetida a 3 lavagens, durante 15 min cada, com tampão TBST e incubada por 1 hora a 37°C em solução contendo o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase, produzido em cabra e diluído 1:1000 em gelatina 0.3% em tampão TBS. A membrana foi novamente submetida a 3 lavagens nas mesmas condições anteriores. A reação foi revelada com a adição de uma solução contendo H₂O₂ a 0,1% em tampão TBS (v/v) e HPR a 3 % em metanol (w/v) (Koncs e Schell, 1986).

3.2.5.5-Ensaio Imuno Emzimático – ELISA

A proteína recombinante α AI-Pc1 foi quantificada por ensaio imuno enzimático (ELISA) segundo protocolo descrito por Ausubel e colaboradores (1989), utilizando uma curva padrão com concentrações de 20 a 100 ng de α AI-1, o qual apresenta 96% de identidade em relação a seqüência de aminoácidos do inibidor α AI-Pc1. Microplaca contendo 96 poços foi sensibilizada com 100 μ g de extrato protéico total de cada transformante e de planta não transformada (branco da reação) durante 2 horas a 37°C. A microplaca foi submetida a 4 lavagens com uma solução de leite desnatado a 1% em tampão PBS, contendo Tween-20 0,05% (PBS-Tween) e o bloqueio foi efetivado durante toda noite a 4°C, usando 150 μ L de leite desnatado a 3% em tampão PBS contendo EDTA 0,5 M. Após 4 lavagens com leite desnatado a 1% em tampão PBS-Tween 0,05%, a microplaca foi incubada por 3 hora a 37°C com 100 μ L do anticorpo primário policlonal produzido em coelho contra α AI-1 diluído 1:750 em tampão PBS contendo leite desnatado a 1%. A microplaca foi novamente submetida a 4 lavagens nas mesmas condições anteriores e foi incubada por 1 hora a 37°C com 100 μ L do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a fosfatase alcalina produzido em cabra, diluído 1:1000 em tampão PBS, contendo leite desnatado a 1%. A microplaca foi submetida a 4 lavagens como descrito anteriormente. Com adição de 100 μ L do substrato *p*-nitrofenil fosfato 0,1% (v/v) em Dietanolamida 9,7% pH 9,8, a reação foi revelada após 45 minutos de incubação a temperatura ambiente na ausência da luz e a absorbância foi lida a 405 nm.

3.2.5.6-Atividade inibitória da proteína recombinante α AI-Pc1 e extração das enzimas digestivas da broca-do-café

A atividade da proteína recombinante contra a α -amilase da broca-do-café foi detectada utilizando o método de DNS adaptado por Bernfeld (1955) usando amido a 1% como substrato.

A α -amilase da broca-do-café foi obtida pelo macerado de insetos adultos em tampão fosfato 0,1 M, pH 5,8, contendo NaCl 200 mM e CaCl₂ 0,1 mM e o homogenato (extrato protéico) foi centrifugado a 12.000 x g por 20 min e sobrenadante estocado a -20°C para os ensaios futuros.

Na detecção da atividade inibitória, 250 μ g de proteína extraída da semente de fumo de cada transformante contendo diferentes quantidades da proteína recombinante de 50 a 125 ng do inibidor α AI-Pc1 (valores calculados a partir dos níveis de expressão obtido para cada transformante) foi pré-incubado com 20 μ g de extrato enzimático de inseto ou 0,75 μ g PPA em tampão fosfato 0,1 M, pH 5,8, contendo NaCl 200 mM e CaCl₂ 0,1 mM, para um volume final de 250 μ L, por 20 min a 37°C. Após a pré-incubação foi adicionado 250 μ L de solução de amido a 1% preparado no mesmo tampão, permanecendo incubado por 10 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 500 μ L de DNS e submetida a fervura por 10 min. Após a adição de 5 mL de água destilada a leitura foi feita a absorvância de 546 nm.

Nos ensaios feitos em triplicata, foram utilizados dois controles. O controle da enzima, contendo apenas solução tampão e o controle da amostra (proteína dos transformantes), contendo tampão e extrato protéico.

A atividade inibitória do inibidor α AI-Pc1 foi expressa em % de inibição. Para isto foi definido que uma unidade de atividade da α -amilase correspondia a elevação de 0,1 unidade de absorvância a 546 nm, e a unidade de inibição foi definida como a unidade de leitura da enzima que decresce 0,1 de absorvância a 546 nm.

4-RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1-CLONAGEM E CARACTERIZAÇÃO DO GENE α AI-Pc1

Por meio da reação de PCR utilizando os iniciadores SFIAI1F e SFIAI1R um fragmento de 669 pb foi amplificado (**Figura 12**).

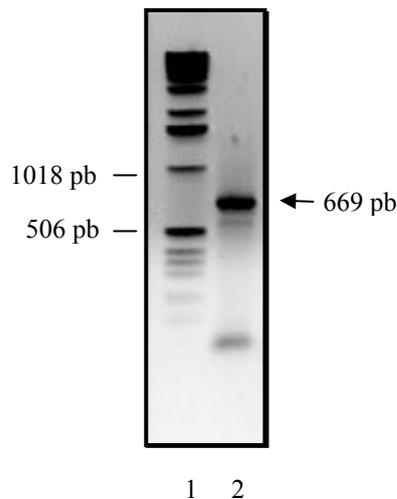


Figura 12: Análise do produto da PCR em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,1%. **1-**Marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder). **2-**Fragmento de DNA amplificado utilizando os iniciadores SFIAI1F e SFIAI1R.

Análise do seqüenciamento de 20 clones contendo o fragmento amplificado de 669 pb mostrou que 6 destes clones correspondiam a um gene codificador de inibidor de α -amilase, que foi denominado de α AI-Pc1, o qual codifica uma proteína de 223 resíduos de aminoácidos (**Figura 13**). Este gene foi clonado faltando alguns pares de base na extremidade N-terminal correspondente ao peptídeo sinal, resultado já esperado diante dos iniciadores utilizados.

Análises computacionais estimaram que a proteína possui um pI de 5.02 e uma massa molecular (Mw) de 25.000 Da, dados característicos apresentados por esta classe de proteínas.

A seqüência protéica do inibidor α AI-Pc1 quando comparada com outras seqüências de inibidores de α -amilases, arcelinas e fitohemaglutininas de algumas espécies de feijão do gênero *Phaseolus*, presentes no banco de dados, e já representadas no alinhamento feito por Mirkov e colaboradores (1994), mostrou identidade entre todas as seqüências (**Figura 14**). Os maiores percentuais de identidade foram observados entre o inibidor α AI-Pc1 e os inibidores

de α -amilase de *P. vulgaris*, apresentando 96% de identidade com inibidor α AI-1, 93% com α AI-5, 89% com α AI-4 e 74% com α AI-2. Significante identidade também pode ser observada entre o inibidor α AI-Pc1 e os inibidores de α -amilase de *P. acutifolis* e *P. maculatus*, as arcelinas ARL4 de *P. vulgaris* e ARL de *P. acutifolis*, assim como, as fitohemaglutininas PHA-E de *P. vulgaris* e PHA-L de *P. acutifolis*.

Embora estas proteínas façam parte de uma mesma família de proteínas de defesa, encontrada em feijão do gênero *Phaseolus*, no dendrograma (**Figura 15**) pode ser observada uma distribuição por grupo de acordo com o grau de identidade destas proteínas, confirmando que o inibidor α AI-Pc1 compõe o grupo dos inibidores de α -amilases.

Os inibidores de α -amilases são processados como glicoproteínas e apresentam em sua seqüência dois sítios ativos envolvidos na interação proteína-proteína, ou melhor, na formação do complexo proteína-inibidor (Bompard-Gilles *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 2001). Sendo assim, a seqüência protéica foi analisada em relação aos possíveis sítios onde possam ocorrer as ligações dos oligossacarídeos, os quais estão covalentemente acoplados a esta classe de proteínas por ligações N-glicosídicas. Nos oligossacarídeos N-ligados, GlcNAc é invariavelmente β -ligada ao nitrogênio amida de um resíduo da Asparagina (*Asn*) na seqüência *Asn-X-Ser* ou *Asn-X-Thr*, onde X, pode ser qualquer resíduo de aminoácido, exceto *Pro* e *Asp*. Os resultados da análise computacional dos possíveis pontos de glicosilação N- estão mostrados na (**Figura 13**). Na seqüência protéica do inibidor α AI-Pc1, a presença da asparagina (N), localizada na posição 12, 65, 140 e 160, foi reconhecida como um local potencial de N-glicosilação. Este resultado é bastante similar ao encontrado por Young e colaboradores (1999), que ao realizar um estudo comparativo do processamento pós-traducional dos inibidores de α -amilases α AI-1 e α AI-2, utilizando a técnica de Espectrometria de Massa, mostrou que ambos eram glicosilados nos resíduos de aminoácidos asparagina, localizados nas posições 12, 65 e 140 para o α AI-1 e nas posições 12, 65, 69 e 140 para o α AI-2.

Young e colaboradores (1999) também observaram que os inibidores α AI-1 e α AI-2 sofrem clivagem proteolítica no resíduo de aminoácido asparagina, que é posteriormente removido originando duas cadeias polipeptídicas, uma cadeia α e uma cadeia β . Sendo que na extremidade C-terminal da cadeia β do α AI-1 são removidos 19 resíduos de aminoácidos, enquanto que na extremidade C-terminal da cadeia β do α AI-2 são removidos apenas 12 resíduos.

Na seqüência protéica predita do α AI-Pc1 foram localizados duas seqüências correspondentes aos sítios ativos, os quais foram identificados a partir de uma análise comparativa com os inibidores α AI-1 e α AI-2 que interagem diretamente com a enzima PPA (Bompard-Gilles *et al.*, 1996). Os resíduos de aminoácidos de 29-46 e de 171-189 do inibidor α AI-1, os quais formam os “loops” N e C que se projetam para dentro do sítio ativo da α -amilase, também são conservados no inibidor α AI-Pc1. Além disso, todos os nove resíduos do α AI-1 que formam pontes de hidrogênio com a PPA também são conservados no inibidor α AI-Pc1. Com estes dados espera-se que semelhantes modificações pós-traducionais ocorram com a proteína recombinante α AI-Pc1 ao ser expressa em sementes de plantas de fumo, já que a clivagem proteolítica é essencial para a atividade dos inibidores de α -amilases (Altabella e Chrispeels, 1990; Pueyo *et al.*, 1993). Além de sugerir que os inibidores α AI-Pc1 e α AI-1 possam ter especificidade semelhante.

```

gccaaccgaaacctccttcaacatcgatgggttcaacaaaaccaaccttatccttcaaggcgatgcatc 69
A T E T S F N I D G F N K T N L I L Q G D A I
↓
gtctcatccaacggcaacttacaactatcctataattcatacgactctatgagcagagccttctactcc 138
V S S N G N L Q L S Y N S Y D S M S R A F Y S
↓
gccccatccaaatcagggacagcaccaccggcaacgtcgccagtttcgacaccaacttcacaatgaat 207
A P I Q I R D S T T G N V A S F D T N F T M N
atccgcactcaccgccaagcaaatccgccgttggccttgactttgttctcgtccccgtccagacaaa 276
I R T H R Q A N S A V G L D F V L V P V Q T K
tccaaaggcgatactgtgactgtggagtccgacaccttcctcagccgtattagcatcgacgtgaacaac 345
S K G D T V T V E F D T F L S R I S I D V N N
aacgatatcaaaagcgtgccttgggatgtacacgactacgacggacaaaacgccgaggttcggatcacc 414
N D I K S V P W D V H D Y D G Q N A E V R I T
↓
tataactcctccacgaaggtcttcgcggtttctctgttaaacccttctacgggaaagagcatcaacgtc 483
Y N S S T K V F A V S L L N P S T G K S I N V
↓
tctaccacagtggagctggagaaagaagtttacgactgggtgagcgttgggttctctgccacctcaggg 552
S T T V E L E K E V Y D W V S V G F S A T S G
gcttatcaatggagctatgaaacgcacgacgtcctctcttggctcttttcttccaagttcatcaatctt 621
A Y Q W S Y E T H D V L S W S F S S K F I N L
aaggacaaaaatctgaacgttccaacatcgctcctcaacaagatcctctga 669
K D Q K S E R S N I V L N K I L

```

Figura 13: Sequência nucleotídica e sequência protéica predita do α AI-Pc1. As setas indicam os possíveis locais de N-glicosilação. As duas seqüências sublinhadas correspondem aos dois sítios ativos. Os aminoácidos em negrito (**QAN**) correspondem ao sítio de clivagem para a formação das duas subunidades durante o processamento pós-traducional. Na caixa, gcc corresponde ao códon inicial da proteína e tga o códon de terminação da proteína.

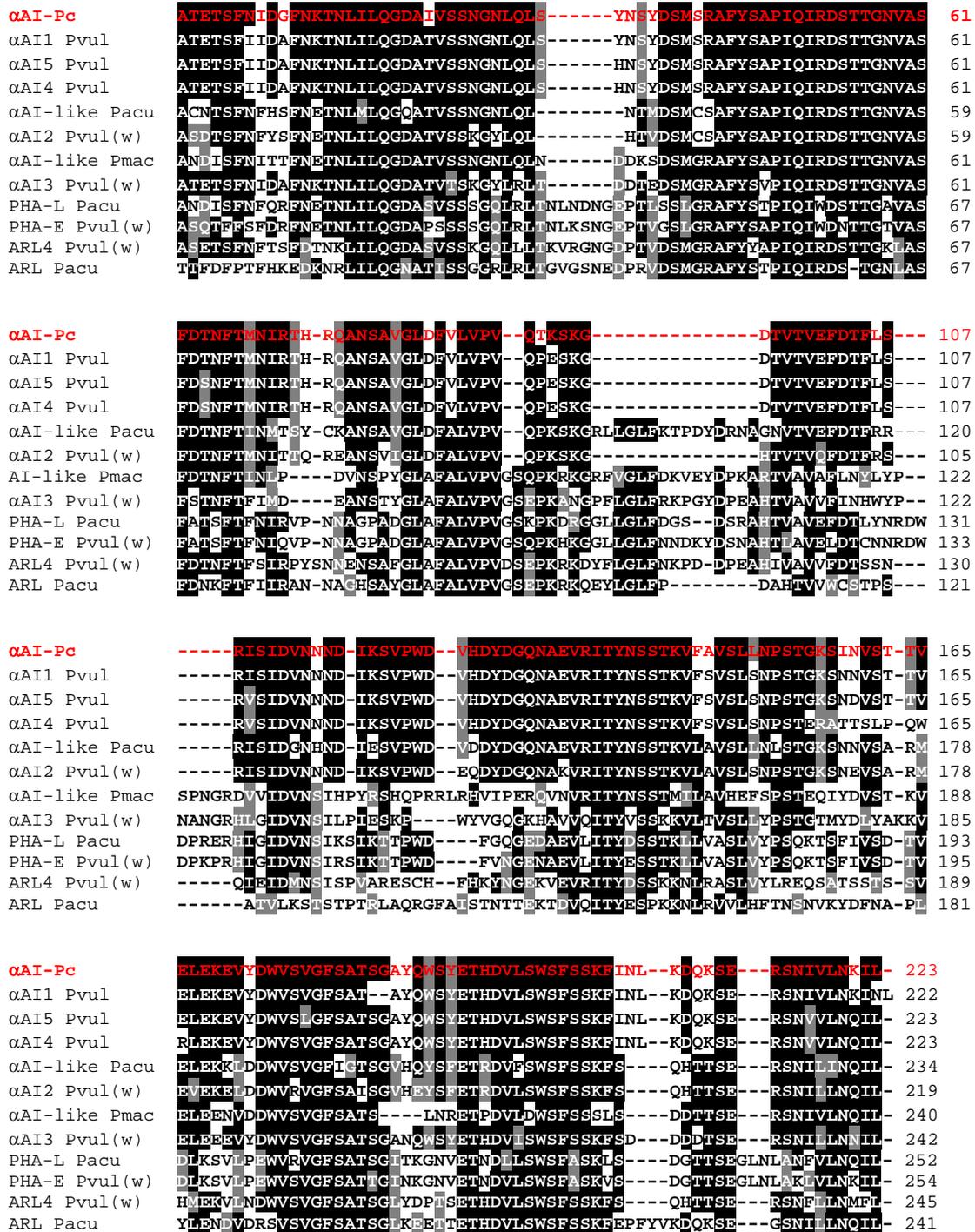


Figura 14: Alinhamento protéico do inibidor αAI-Pc1 com outras seqüências de inibidores de α-amilases (αAI1, αAI2, αAI3, αAI4, αAI5 de *P. vulgaris* e αAI-like de *P. acutifolius* e *P. maculatus*), arcelinas (ARL4 e ARL de *P. acutifolius* e *P. vulgaris*) e fitohemaglutininas (PHA-E e PHA-L de *P. acutifolius* e *P. vulgaris*). As linhas pretas indicam as regiões idênticas e as cinzas às de similaridade.

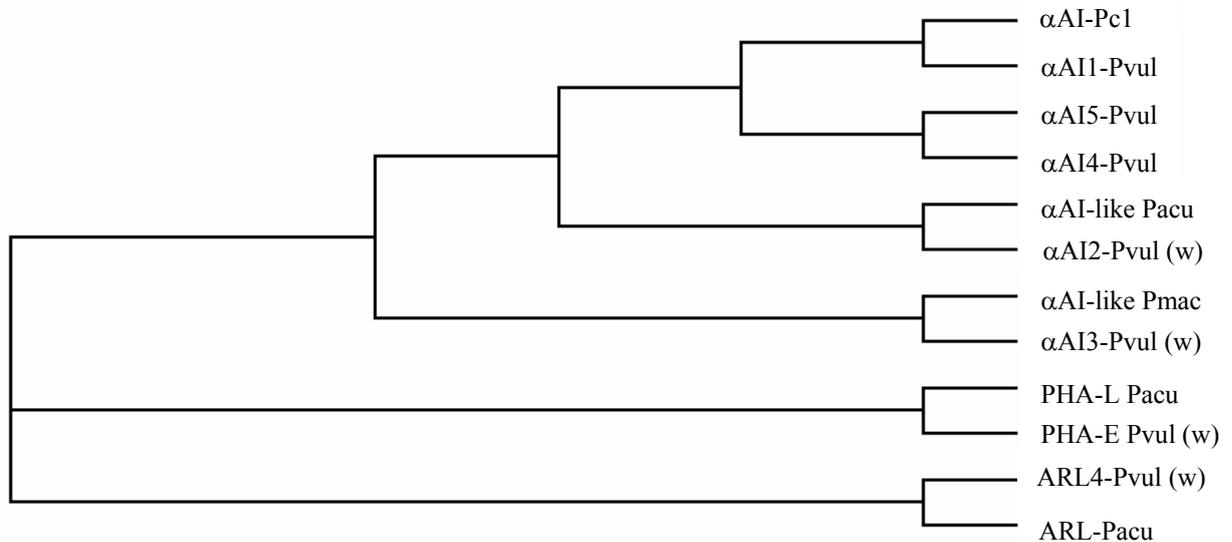


Figura 15: Dendrograma resultante do alinhamento protéico do inibidor α AI-Pc1 com os inibidores de α -amilases (α AI), arcelinas (ARL) e fitohemaglutininas (PHA) de feijão.

4.2-ANÁLISE DOS TRANSFORMANTES

No processo de transformação via *Agrobacterium* foram utilizados 60 explantes. A seleção dos transformantes foi inicialmente feita pela adição de higromicina, um agente de seleção responsável pela inibição do crescimento das células não transformadas, resultando em 14 plantas de fumo transformadas (parental T0). A eficiência de transformação foi de 35%, a qual foi avaliada considerando o número total de brotos enraizados em meio seletivo em relação ao número total de explantes co-cultivados. Os transformantes selecionados foram cultivados em casa de vegetação.

4.2.1-Análise por PCR

O DNA genômico de folhas jovens de 14 transformantes (parental T0) e de um transformante (geração T1), derivado de um dos transformantes iniciais, foram extraídos utilizando o método CTAB (Murray e Thompson, 1980) com algumas modificações. Para confirmar a presença do gene α AI-Pc1, o DNA genômico foi utilizado como molde para a

amplificação do gene por meio da técnica de PCR, já descrita, utilizando como iniciadores o α AIPCF e α AI-PCR. O fragmento de 750 pb foi amplificado como esperado (**Figura 16**).

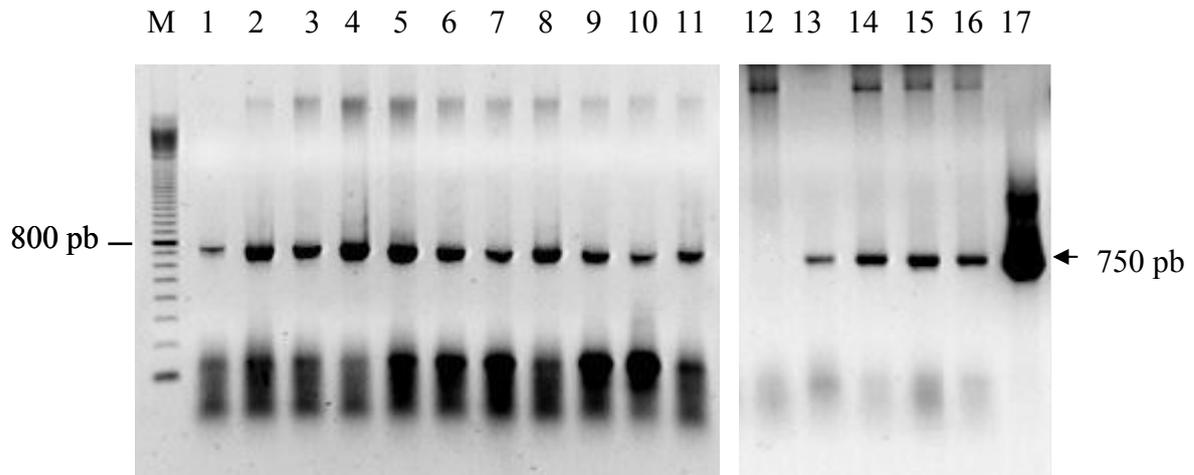


Figura 16: Análise por PCR das plantas de fumo transformadas com gene α AI-*Pc1*. **M-** Marcador de massa molecular. Linha 1 a 11 e 13 a 15: Eventos independentes de plantas (parental T0) de fumo transformadas (**1A, 1L, 1M, 2, 2B, 2C, 2J, 3, 4, 5A, 6C, 8E, 8F e 8I**). Linha 12: Planta de fumo não transformada como controle negativo (**NT**). Linha 16: Planta (geração T1) de fumo transformada (**8E₁**). Linha 17: Vetor pCAMBIA 1390/ α AI-*Pc1* como controle positivo. 200 ng de DNA de folhas de cada planta de fumo foram utilizados para a amplificação do gene.

4.2.2-Western blot

A presença da proteína recombinante α AI-*Pc1* em sementes de plantas de fumo transformadas foi confirmada por Western blot com anticorpo policlonal contra α AI-1. Dos 14 transformantes, 4 foram utilizados para análise por Western blot (**Figura 17**). O extrato protéico de sementes dos 4 transformantes foi analisado sob o efeito do agente redutor β -mercaptoethanol. Todos os extratos apresentaram o mesmo padrão de marcação, revelando a presença de peptídeos imunoreativos, com massa molecular relativa de 9 a 17 kDa. A

presença de diferentes bandas polipeptídicas observadas é provavelmente resultante dos diferentes níveis de glicosilação formado após o processamento pós-traducional, os quais ocorrem naturalmente nos α AIIs encontrados em feijão comum (Moreno e Chrispeels, 1989). Resultado semelhante foi observado quando o gene que codifica para o α AI-1 de *P. vulgaris* foi expresso em sementes de fumo, onde vários peptídeos foram produzidos e processados com massa relativa de 10 a 18 kDa (Altabella e Chrispeels, 1990).

Dentre os peptídeos imunoreativos de 9 a 17 kDa, foram observados dois peptídeos em abundância com massas moleculares relativas de aproximadamente 16,3 e 11,5 kDa, provavelmente, correspondendo as cadeias α e β do inibidor α AI-Pc1, estimando ser esta uma proteína de massa molecular de aproximadamente 28 kDa. (**Figura 17**). Estes valores foram estimados com base no perfil eletroforético do α AI-1 purificado de *P.vulgaris* (controle positivo), o qual se aproximou ao valor anteriormente citado de 25 kDa feito por análises computacionais da seqüência predita do inibidor. O processamento proteolítico do α AI-1 em duas subunidades α e β é essencial para a conversão de um precursor de cadeia única inativo para uma proteína madura ativa $\alpha_2\beta_2$. (Altabella e Chrispeels, 1990; Pueyo *et al.*, 1993).

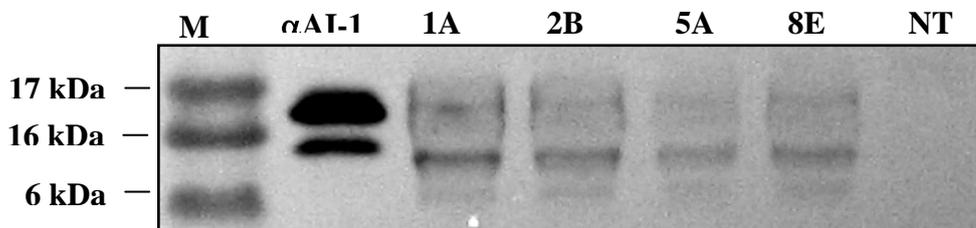


Figura 17: Análise da proteína recombinante por Western Blot do extrato protéico de semente de planta de fumo. **M**-marcador de massa molecular; **α AI-1**-controle positivo, inibidor de α -amilase de feijão *P. vulgaris*; **1A, 2B, 5A, 8E** – Plantas de fumo transformadas; **NT** – controle negativo, planta de fumo não transformada.

4.2.3-Ensaio Imuno Enzimático – ELISA

O nível da expressão da proteína recombinante foi quantificado por ELISA em sementes maduras dos 14 transformantes (**Figura 18**) utilizando uma curva padrão com concentrações crescentes de α AI-1, no intervalo de 20 a 100 ng. Na quantificação de α AI-

Pc1, utilizou-se 100 µg de extrato protéico obtido das sementes dos transformantes. O nível de expressão da proteína recombinante variou de 0,02 a 0,05% em relação à proteína solúvel total. Os transformantes denominados de 1L, 2, 2C, 2J, 3, 4, 6C e 8F apresentaram nível de expressão de 0,02 a 0,035%, enquanto que os transformantes 1A, 1M, 2B, 5A, 8E e 8I apresentaram nível de expressão de 0,04 a 0,05%.

As análises das plantas transformadas com nível de expressão de 0,05% indicaram conter 0,05 µg de inibidor α AI-Pc1 por 100 µg de proteína solúvel total. A expressão aqui mostrada é considerada baixa quando comparada com a quantidade de inibidores de α -amilases normalmente encontrada em feijão cultivado de 0,5 a 1,25% (Shade *et al.*, 1994), ou com a expressão de 1,5 a 3% do inibidor α AI-1 em relação à proteína solúvel total de sementes de ervilha (Schroeder *et al.*, 1995) e 0,82 em sementes de feijão azuki (Ishimoto *et al.*, 1996).

Voelker e colaboradores (1987) observaram que a expressão da fitohemaglutinina PHA em feijão atinge sua expressão máxima no estágio inicial do desenvolvimento da semente e não na semente madura. Esta diferença no tempo de expressão foi semelhante a observada para a expressão do inibidor α AI-1 em sementes de plantas de fumo regulada pelo promotor da PHA (Altabella e Chrispeels, 1990).

O baixo nível de expressão do inibidor α AI-Pc1, cuja expressão foi regulada pelo promotor PHA, provavelmente está relacionado ao tempo de desenvolvimento das sementes dos transformantes, já que foram utilizadas sementes maduras e não sementes em seu estágio inicial de desenvolvimento.

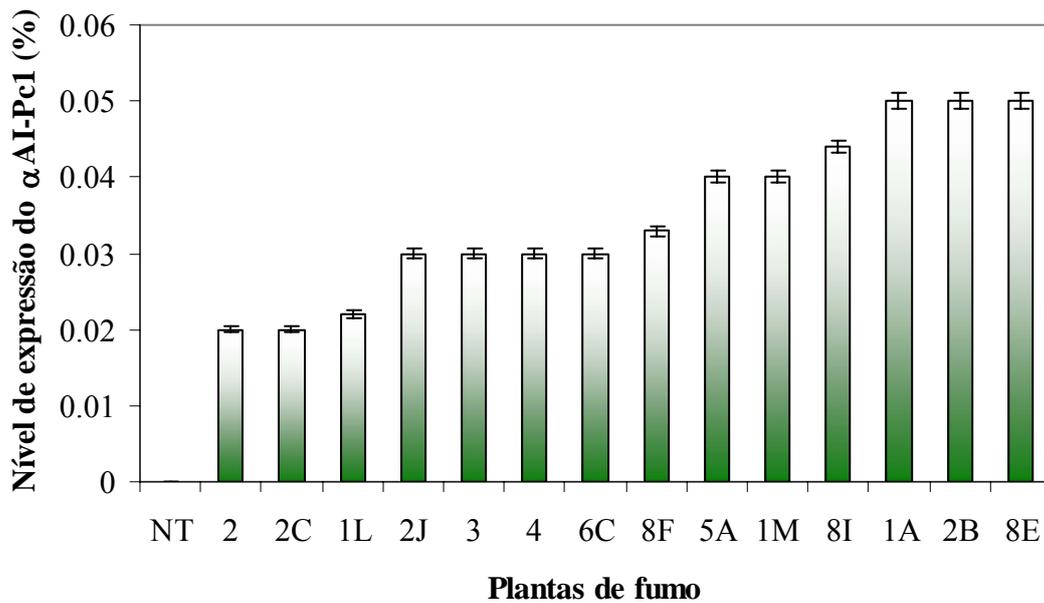


Figura 18: Quantificação por ELISA da proteína recombinante α AI-Pc1 em sementes de plantas de fumo transformadas. NT-Planta não transformada. 1A, 1L, 1M, 2, 2B, 2C, 2J, 3, 4, 5A, 6C, 8E, 8F e 8I-Transformantes expressando α AI-Pc1. 100 μ g de extrato protéico de sementes foram utilizados em cada análise. Os ensaios foram realizados conforme descrito em métodos e feitos em triplicata.

4.2.4-Ensaio de atividade inibitória de α -amilase

A atividade inibitória da proteína recombinante α AI-Pc1 expressa nos 14 transformantes foi analisada a partir de ensaios *in vitro* contra α -amilases do extrato protéico do inseto da broca-do-café (*H. hampei*) e contra a α -amilase pancreática bovina (PPA). Neste ensaio foi utilizado extrato protéico total do inseto adulto, pois além da dificuldade em obtermos larvas suficientes neste período, o inseto é muito pequeno o que torna a dissecação do intestino bastante difícil, e de acordo com Valencia e colaboradores (2000), o extrato protéico total do inseto adulto contém atividade amilásica decorrente da presença de α -amilases no seu intestino.

Com 250 μ g de extrato protéico total de sementes de cada transformante, aproximadamente contendo de 50 a 125 ng do inibidor α AI-Pc1, a atividade das α -amilases da broca-do-café foi inibida aproximadamente de 32 a 65%, sob as condições do ensaio (**Figura 19**). Quando o ensaio foi realizado com extrato protéicos de sementes de planta de

fumo não transformada, nenhuma atividade inibitória foi detectada, mostrando que a atividade é resultante da presença da proteína recombinante α AI-Pc1. A variação no efeito inibitório de α AI-Pc1 sob as α -amilases da broca-do-café está provavelmente relacionada com os diferentes níveis de expressão do inibidor α AI-Pc1 nos transformantes. Por essa razão, os transformantes com maior nível de expressão mostraram maior inibição da atividade das α -amilases da broca-do-café. O efeito máximo de inibição de 65% sobre a atividade amilásica foi encontrado com a adição de 125 ng de α AI-Pc1, presente nos 250 μ g de extrato protéico de 3 transformantes, com nível de expressão de 0,05% de α AI-Pc1 (**Figura 20**). Os transformantes 1A, 2B e 8E expressando o inibidor α AI-Pc1 inibiram aproximadamente 65% da atividade proteolítica das α -amilases da broca-do-café, enquanto que os demais transformantes 1L, 1M, 2, 2C, 2J, 3, 4, 5A, 6C, 8F e 8I inibiram de 32 a aproximadamente 60% da atividade proteolítica.

Como esperado, devido a similaridade do inibidor α AI-Pc1 com α AI-1, a atividade da PPA foi 100% inibida e esta inibição foi observada com 250 μ g de extrato protéico de sementes dos transformantes expressando 0,05% da proteína recombinante, ou seja, com 125 ng de α AI-Pc1 (**Figura 21**).

Nos ensaios *in vitro* também foram utilizadas concentrações do inibidor α AI-Pc1 acima de 125 ng na tentativa de encontrar um maior efeito deste inibidor sobre a atividade amilásica. Devido à baixa expressão do inibidor tivemos que utilizar extrato protéico bastante concentrado o que dificultou as análises dos resultados.

Valencia e colaboradores (2000) mostraram que *H. hampei* apresenta várias α -amilases com atividade digestiva no trato intestinal da larva e no extrato protéico do inseto adulto, e relataram uma inibição de aproximadamente 70 e 40 % sobre a atividade amilásica com 100 μ g/ml do inibidor α AI-1 purificado de *P. vulgarise* e com 1 mg/ml do inibidor *Amaranthus*, respectivamente. A atividade inibitória do inibidor α AI-2 de *P. vulgaris* também foi testado contra a atividade amilásica de *H. hampei* mais nenhum efeito foi observado.

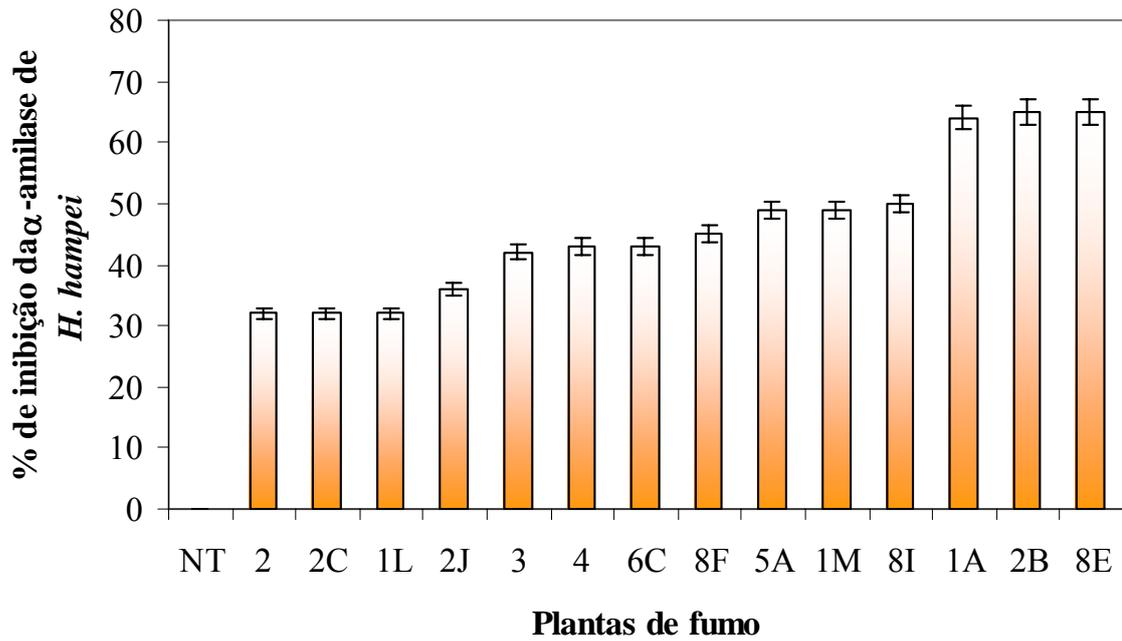


Figura 19: Inibição das α -amilases de *H. hampei* pela proteína recombinante α AI-Pc1 expressa em sementes das 14 plantas de fumo transformada. Extrato enzimático e 250 μ g de extrato protéico de sementes contendo diferentes concentrações (50 a 125 ng) do inibidor α AI-Pc1 foi pré-incubada por 20 min antes da adição do amido. NT-Planta não transformada 1A, 1L, 1M, 2, 2B, 2C, 2J, 3, 4, 5A, 6C, 8E, 8F, 8I-Transformantes expressando α AI-Pc1. Os ensaios foram realizados conforme descrito na metodologia.

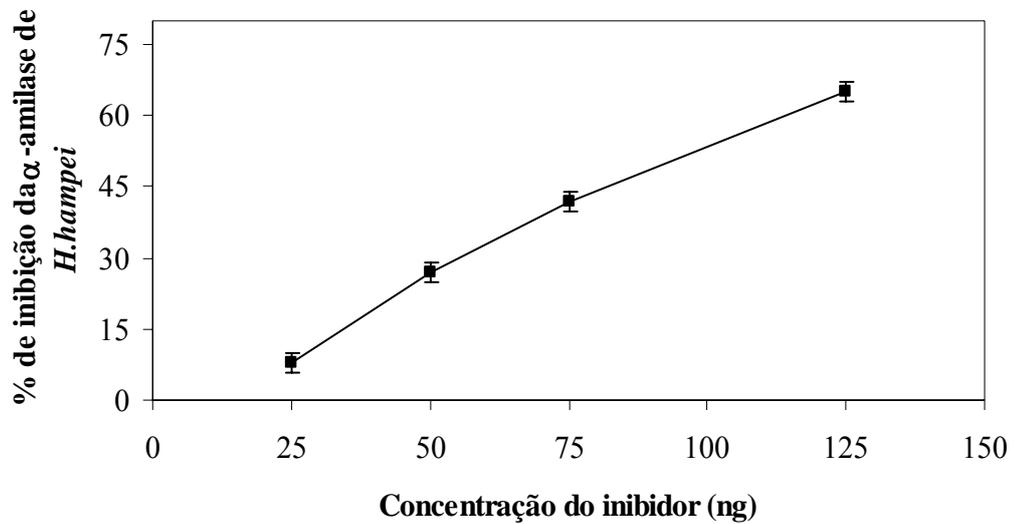


Figura 20: Inibição das α -amilases de *H. hampei* pela proteína recombinante α AI-Pc1 expressa em sementes de um transformante com nível de expressão de 0,05%. Extrato enzimático e diferentes concentrações de extrato protéico de semente contendo concentrações crescentes (25, 50, 75 e 125 ng) do inibidor α AI-Pc1 foram pré-incubados por 20 min antes da adição do amido. Resultado semelhante foi obtido para todos os 3 transformantes com nível de expressão de 0,05%. Os ensaios foram realizados conforme descrito na metodologia.

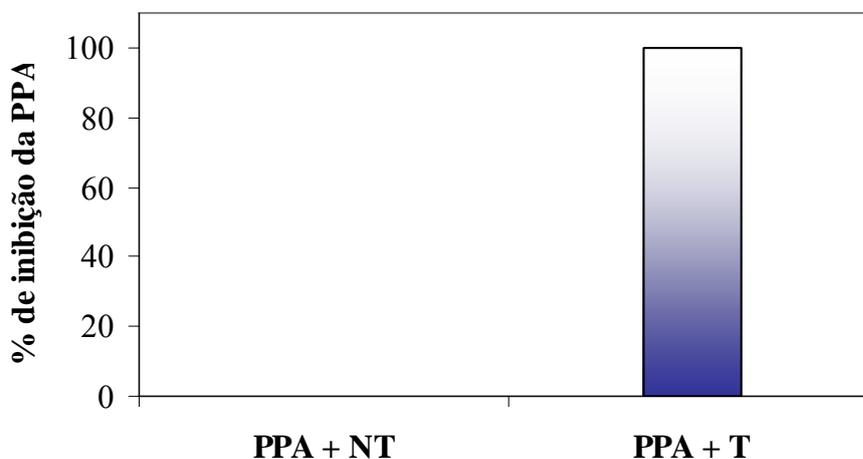


Figura 21: Inibição da PPA pela proteína recombinante α AI-Pc1 expressa em sementes de um transformante com nível de expressão de 0,05%. PPA e 250 μ g de extrato protéico de semente contendo 125 ng do inibidor α AI-Pc1 foram pré-incubados por 20 min antes da adição do amido. **PPA**- α -amilase pancreática bovina; **NT**-Planta não transformada e **T**-Transformantes expressando α AI-Pc1. Os ensaios foram realizados conforme descrito na metodologia.

1-ABSTRACT

The coffee berry borer, *H. hampei* (Ferrari) is the most important pest of coffee worldwide. Trypsin and chymotrypsin activities present in the *H. hampei* larvae midgut can be inactivated in the presence of proteic inhibitors. Thus, serine proteinase inhibitor belonging to the Bowman-Birk class was purified from wild accession of *P. coccineus* seeds. The inhibitor, nominated PcBBI1, is a protein cysteine-rich and heat stable at alkaline pH. MALDI-TOF/MS analysis showed that the inhibitor is present either as a monomer of 8.689 Da or a dimer of 17.378 Da. The inhibitory effect of PcBBI1 towards trypsin and chymotrypsin from bovine pancreas and digestive proteinases from *H. hampei* larvae were analyzed in vitro assays. The inhibitor was highly active against trypsin-like enzymes from *H. hampei*, inhibiting 80% of proteolytic activity. This new inhibitor, PcBBI1, represent a promising protein with potential application in Biotechnology of plants by engineering genetic, aiming resistance to the coffee berry borer.

2-RESUMO

A broca-do-café, *H. hampei* (Ferrari) é a praga de maior importância para o café do mundo. Atividades de tripsina e quimotripsina presentes no intestino de larva de *H. hampei* podem ser inativadas na presença de inibidores. Assim, inibidor de proteinase serínica pertencente à classe Bowman-Birk, foi purificado de acesso selvagem de sementes de *P. coccineus*. O inibidor, nomeado de PcBBI1, é uma proteína rica em cisteína e estável ao calor em pH alcalino. Análises por MALDI-TOF/MS mostraram que o inibidor PcBBI1 se apresenta na forma de um monômero de 8.689 Da ou de um dímero de 17.378 Da. O efeito inibitório de PcBBI1 foi analisado por ensaio *in vitro* para tripsina e quimotripsina pancreática bovina e para proteinases digestivas de larvas de *H. hampei*. O inibidor foi fortemente ativo contra as enzimas semelhantes à tripsina de *H. hampei*, inibindo 80% da atividade proteolítica. Este novo inibidor, PcBBI1, representa uma proteína promissora com potencial aplicação em Biotecnologia de plantas via engenharia genética, visando resistência a broca do café.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-MATERIAIS

3.1.1-Material Biológico

Feijão - Sementes de feijão não cultivado da espécie *P. coccineus* acesso 35619 foram fornecidas pelo Departamento de Química da Universidade de Caldas em Manizales na Colombia.

Insetos - Colônias de *Anthonomus grandis* (bicudo do algodoeiro), *Euschistus heros* (percevejo-da-soja) foram cedidas pelo Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN / EMBRAPA), Brasília, Distrito Federal, Brasil. Colônias de *H. hampei* (broca-do-café) foram doadas pelo Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), Londrina, Paraná, Brasil.

3.1.2-Enzimas

Tripsina pancreática bovina - Sigma (St. Louis, MO)

Quimotripsina pancreática bovina - Sigma (St. Louis, MO)

BSA (Albumina Sérica Bovina) - Sigma (St. Louis, MO)

Utilizada nos experimentos de imunoreação

3.1.3-Soluções e tampões

Acetonitrila 2%

Acetonitrila 100% 2mL

q.s.p. 100 mL de H₂O destilada

Acetonitrila 20%

Acetonitrila 100% 200mL

q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

Ácido trifluoracético (TFA) 0,1%

TFA 0,1% 1mL

q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

Acrilamida/Bis-acrilamida

Acrilamida 29,2 g

Bisacrilamida 0,8 g

q.s.p. 100 mL de H₂O destilada

HCl 0,1M, NaCl 0,15M

NaCl 4,16 g

HCl 3,3 mL

q.s.p. 500 mL de H₂O destilada

Persulfato de amônio 10%

Persulfato de amônio 10 g

q.s.p. 100 mL de H₂O destilada

SDS 10%

SDS 10 g

q.s.p. 100 mL de H₂O destilada

Solução descorante para gel de poliacrilamida

Etanol 400 mL

Ácido acético 100 mL

q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

Solução corante para gel de poliacrilamida

Coomassie brilliant blue R250 1 g

Metanol 400 mL

Ácido acético 100 mL

q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

Solução de nitrato com prata

Nitrato de prata 200 mg

Formaldeído 74 µL

q.s.q 100 mL de H₂O destilada

Solução de tiosulfato de sódio

Tiosulfato de sódio 20 mg
q.s.q 100 mL de H₂O destilada

Solução reveladora para o coramento com prata

Carbonato de sódio 6 g
Formaldeído 50 µL
Tiosulfato de sódio 2 mL
q.s.q 100 mL de H₂O destilada

Tampão de corrida para eletroforese

Tris 3 g
SDS 1 g
Glicina 14,4 g
q.s.q 1000 mL de H₂O destilada

Tampão de amostra para gel de agarose (TEB) 10X

Glicerol 50% (v/v)
Azul de bromofenol 0,1% (v/v)
Xileno cianol 0,1% (v/v)

Os reagentes foram dissolvidos em TEB 10X

Tris 0,025 M pH 7,0

Tris 3,03 g
HCl para ajustar o pH
q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

Tris 0,01 M pH 8,0

Tris 6,6g
HCl para ajustar o pH
q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

3.1.4-Reagentes

Marcador de massa molecular – BenchMark Prestained Protein Ladder (Gibco)

TEMED – Sigma (St. Louis, MO)

3.1.5-Cromatografias

DEAE-Cellulose (DE52) - Whatman

SuperdexTM 75 HR 10/30 - Amersham Pharmacia Biotech

SourceTM 5RPC ST 4.6/150 - Amersham Pharmacia Biotech

C₁₈ (218 TP 54) - Vydac

3.2-METODOLOGIA

3.2.1PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR DE TRIPSINA TIPO BOWMAN-BIRK DE *Phaseolus coccineus*

3.2.1.1-Obtenção do extrato protéico a partir de sementes de feijão

As sementes de feijão *P. coccineus* foram maceradas em nitrogênio líquido até a forma de farinha fina e depois delipidada com acetona (1:1 p/v) durante 15 min. Após a decantação, a acetona foi descartada, o processo foi repetido por 3 vezes, e a farinha delipidada foi seca à temperatura ambiente e armazenada a -20°C. A extração das proteínas da farinha foi efetuada utilizando uma solução de HCl 0,1 M e NaCl 0,15 M (1:5 p/v), sob agitação durante 2 horas a 4°C, depois submetida a centrifugação a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante teve o pH ajustado para 7,0, permanecendo em repouso por 2 horas e as proteínas solúveis, obtidas por centrifugação a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C, foram submetidas à precipitação fracionada com sulfato de amônio entre 0-60% de saturação. O precipitado foi coletado após centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C e solubilizado em tampão Tris-HCl 0,025 M pH 7,0. O material foi, então, dialisado contra o mesmo tampão, centrifugado a 10.000 x g por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante, denominado F₀₋₆₀, foi armazenado a -20°C para os experimentos seguintes.

3.2.1.2-Cromatografia de troca iônica em DEAE-Cellulose

Cerca de 3,5 mg da fração F₀₋₆₀ com atividade anti-tríptica foi aplicada em uma coluna de troca iônica DEAE (Dietilaminoetil celulose) (20 x 2,5 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5 sob fluxo de 30 mL/h. Frações de 3 mL das amostras foram coletadas. As proteínas retidas foram eluídas utilizando um gradiente de NaCl de 0-0,4 M (100 mL para cada) no mesmo tampão. O perfil cromatográfico foi determinado, através da leitura em espectrofotômetro a 280 nm. Ensaios de atividade inibitória para tripsina pancreática bovina foram feitos para identificação dos picos de inibição. As frações ativas foram coletadas, dialisadas, liofilizadas e solubilizadas para as etapas seguintes.

3.2.1.3-Cromatografia de filtração molecular em Superdex 75

As frações ativas coletadas da DEAE-Cellulose foram solubilizadas em acetonitrila 20% (solvente orgânico). A suspensão (10 µL) contendo cerca de 50 µg de proteína, foi

aplicada em uma coluna de filtração molecular Superdex 75 HR 10/30 (30 x 1 cm) equilibrada com acetonitrila 20%. As proteínas foram eluídas com acetonitrila 20% sob fluxo de 0,5 mL/min. O perfil cromatográfico foi monitorado a 216 nm e a fração contendo o inibidor de tripsina foi coletada e liofilizada.

3.2.1.4-Cromatografia líquida de alta pressão em Vydac C18 TP 54

Seguindo com a purificação, as frações coletadas da coluna de filtração molecular foram solubilizadas em ácido trifluoracético (TFA) 0,1% preparado em água Milli-Q ultra pura (solução A). Cerca de 90 µg de proteína foi adicionada em coluna de fase-reversa líquida de alta pressão Vydac C18 inicialmente equilibrada com a solução A com um fluxo de 1,0 mL/min. As proteínas foram eluídas com um gradiente de 20-60% de acetonitrila em 0,1% de TFA (solução B) e o perfil cromatográfico foi monitorado a 216 nm. As frações protéicas foram coletadas, liofilizadas e armazenados a -20°C.

3.2.1.5-Cromatografia líquida de alta pressão em Source 5RPC ST 4.6/150

O último procedimento de purificação também envolveu cromatografia líquida de alta pressão. A fração correspondente ao inibidor de tripsina, coletada do passo cromatográfico anterior, foi solubilizada em acetonitrila 2% e aplicada (30 µg) na coluna Source equilibrada com uma solução de acetonitrila 2% em ácido trifluoracético (TFA) 0,1% (solução A) e fluxo de 1,0 mL/min. As frações protéicas foram eluídas com um gradiente de 25-35% de acetonitrila em TFA 0,1% (solução B) e o perfil cromatográfico foi monitorado a 216 nm. A fração correspondente ao inibidor de tripsina foi coletada, liofilizada e armazenada para os experimentos de caracterização. A fração protéica purificada foi denominada PcBB11.

3.2.2-DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteína foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

3.2.3-EXTRAÇÃO DAS ENZIMAS DIGESTIVAS DE INSETOS

A dissecação das larvas de *A. grandis* e *H. hampei* e dos insetos adultos *E. heros* foi realizada utilizando a metodologia descrita por Terra e colaboradores (1977). As larvas, com idade de 18 a 20 dias e insetos adultos, foram mergulhados em solução de NaCl 0,15 M e dissecadas a frio com auxílio de uma lupa estereoscópica. Após a exposição do trato intestinal, seguiu-se o isolamento dos intestinos médios com secção na região de passagem do esôfago para o ventrículo e na região de inserção dos tubos de Malpighi. Todos os tecidos estranhos às paredes intestinais, tais como traquéia e corpo gorduroso foram retirados. Depois de isolados os intestinos médios foram acondicionados em microtubos (50 intestinos por tubo) contendo 200 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 (mesmo tampão utilizado nos ensaios enzimáticos). Os intestinos foram então homogeneizados com auxílio de um cadinho em banho de gelo por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g, por 20 minutos, à temperatura de 4°C e os sobrenadantes obtidos foram utilizados para os ensaios de atividade enzimática e inibitória.

3.2.4-ENSAIO *in vitro* DO INIBIDOR PCBBI1

A atividade inibitória do inibidor PcBBI1 foi testada contra tripsina pancreática bovina, quimotripsina pancreática bovina e extratos protéicos intestinais dos insetos acima citados, utilizando o método fluorimétrico descrito por Silva e colaboradores (2001).

Soluções estoque de enzima foram preparadas: tripsina (0,01 µg/µL), quimotripsina (0,01 µg/µL) e extratos protéicos de *H. hampei* (4 µg/µL), *A. grandis* (5 µg/µL) e *E. heros* (5 µg/µL) no tampão de ensaio. Os extratos protéicos intestinais dos insetos foram todos preparados em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo CaCl₂ 20 mM. Os substratos fluorimétricos Z-PheArg-MCA e Z-Arg-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA, na concentração de 2,5 mM foram preparados em 50% de Dimetil sulfoxido (DMSO) para os ensaios para tripsina e quimotripsina, respectivamente.

As diferentes concentrações do inibidor foram incubados com as soluções enzimáticas por 30 minutos a 37°C em tampão Tris-HCl 0,05 M pH 8,0 contendo CaCl₂ 20 mM. O ensaio foi iniciado com a adição do substrato para uma concentração final de 0,0625 mM em um volume final de reação de 100 µL. Após 10 minutos, a reação foi parada com a adição de 900 µL de Etanol. Provas em branco foram feitas. Os resultados foram evidenciados pela

liberação de metilcumarina livre, no qual foi utilizado o leitor fluorimétrico HITACHI F2000, em comprimento de onda de excitação de 380 nm e comprimento de onda de emissão de 440 nm. Ensaios foram feitos em triplicata e nenhum valor diferiu em mais de 10%.

Uma unidade de atividade (UA) da enzima foi definida como a capacidade de liberar 1 μ Mol de Metilcumarina (MCA) por minuto, por mg de proteína. Uma unidade de inibição (UI) foi definida como a quantidade de inibidor capaz de inibir uma unidade de atividade da enzima.

3.2.5-ENSAIO DE TERMOESTABILIDADE

Para o ensaio de termoestabilidade, o inibidor PcBBI1 purificado foi submetido a tratamento térmico à 100°C por 30 min, 1 hora, 2 horas e 3 horas e em seguida incubado com a tripsina pancreática bovina por 30 minutos a 37°C. A inibição da atividade enzimática foi verificada utilizando o ensaio fluorimétrico, descrito anteriormente.

3.2.6-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA EM DIFERENTES pHs

A atividade inibitória de PcBBI1 em diferentes pHs foi determinada incubando a enzima e o inibidor em tampão acetato de sódio 0,1 M, contendo CaCl 100 μ M pH 5,0 e 6,0, tampão fosfato de sódio pH 7,0 e tampão Tris/HCl pH 8,0 e 9,0. Ensaios controles foram feitos onde a atividade da enzima foi determinada nos mesmos tampões. A atividade foi evidenciada através do ensaio fluorimétrico, como descrito anteriormente.

3.2.7-ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Os passos de purificação foram monitorados por visualização em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE), empregando acrilamida a 4% no gel concentrador e 12% no gel separador, de acordo como o método desenvolvido por Laemmli (1970). Também foi utilizado o método descrito por Shagger e von Jagon (1987), empregando acrilamida a 4% no gel concentrador e 13% no gel separador. O marcador de massa molecular utilizado nos dois métodos é composto de lisozima (14.3 kDa), β -lactoglobulina (18.4 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (43 kDa), albumina sérica bovina (68 kDa), fosforilase b (97.4 kDa) e miosina (200 kDa). Os géis foram corados com *comassie brilliant blue* seguidos de coramento com prata. Em algumas etapas as frações foram precipitadas com

TCA para uma concentração final de 12%, seguido de incubação por 30 minutos no gelo e centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado duas vezes com acetona gelada, seguindo cada lavagem com centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi solubilizado em tampão de amostra (SDS 4%, glicerol 4%, Tris 50 mM, β -mercaptoetanol 2% e azul de bromofenol G 0,01%) e aplicados no gel.

3.2.7.1-Coramento com *comassie brilliant blue* do gel de poliacrilamida

Após a eletroforese os géis foram corados segundo procedimento descrito por Weber e Osborne (1969). A solução corante foi preparada usando *comassie brilliant blue* R-250 a 1%, metanol 40% e ácido acético 10% em água. O descoramento foi feito com uma solução contendo ácido acético 10% e metanol 40%.

3.2.7.2-Revelação com nitrato de prata do gel de poliacrilamida

Para uma melhor visualização das proteínas presentes no gel de poliacrilamida (13%) em presença de SDS, após o descoramento do *comassie brilliant blue*, o gel foi submetido ao processo de revelação com prata como descrito por Blomn e colaboradores (1987). Após a corrida, o gel de poliacrilamida, corado com *comassie brilliant blue*, foi descorado e submetido a um processo de desidratação com etanol 50% em 3 incubações de 20 minutos, sob agitação lenta. Após a última incubação com etanol 50%, o gel foi incubado em uma solução de tiosulfato de sódio por 1 minuto sob agitação, 2 mL dessa solução foi reservada. Posteriormente, o gel foi lavado em água 3 vezes rapidamente e incubado em uma solução de nitrato de prata por 20 minutos. Após a incubação, o gel foi lavado 3 vezes com água e adicionado a solução reveladora até o aparecimento das bandas coradas. A reação foi parada com a adição de ácido acético 13%.

3.2.8-REDUÇÃO E ALQUILAÇÃO DO INIBIDOR PcBBI1

O inibidor PcBBI1 foi reduzido e alquilado utilizando o método descrito por Crestfield e colaboradores (1963), com algumas modificações. Este procedimento de redução e alquilação das ligações dissulfeto é utilizado em proteínas ricas em resíduos de aminoácidos de cisteína, cujo objetivo é desnaturar a proteína e bloquear os grupos –SH livres, tornando a

proteína mais susceptível a digestão proteolítica, permitindo, dessa forma, um melhor acesso à seqüência.

Inicialmente, 150 µg de PcBBI1 foi dissolvido em 250 µL de uma solução de cloridrato de guanidina 6 M em carbonato de amônio (NH₄HCO₃) 0,1 M. Em seguida, foram adicionados 3 µL de DTT 1 M em NH₄HCO₃ e incubado por 15 min a 37°C (repete este passo). Posteriormente, foram adicionados 20 µL de iodacetamida 10 mM em NH₄HCO₃ e incubado por 5 min a 37°C na ausência da luz, seguido da aplicação imediata da amostra em cromatografias ou congelamento a -20°C.

3.2.9-ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

O grau de pureza e as massas moleculares das proteínas presentes nas etapas de purificação, descritas anteriormente, também foram analisados por espectrometria de massa em sistema *Matrix Assisted Laser Desorption ionization-Time of Flight* (MALDI-TOF) (Voyager-DE STR, PerSeptive Biosystems, Fostercity, USA). Alíquotas de 3 µL contendo cerca de 5-20 pmol/µL de proteína foram dissolvidas inicialmente em ácido trifluoracético 0,1% e adicionadas a 9µL de uma solução de α-ciano-4-hydroxicinâmico (CHCA) saturada em acetonitrila e TFA a 3%, (1:1 v/v). A mistura foi homogeneizada por aproximadamente 1 minuto em agitador *Vortex-Genie 2* (Scientific Industries Inc., Bohemia, USA). Frações de 1 µL foram aplicadas em quadriplicata sobre uma placa de amostra (Voyager Bioworkstation) e cristalizadas a temperatura ambiente. Os espectros de massa (MS) foram obtidos no modo de refletor, com resolução monoisotópica e calibração externa, utilizando padrões de calibração (Sequazyme Calmixture 1-Applied Biosystems, Fostercity, USA).

Análises do inibidor PcBBI1 reduzido e alquilado foram realizadas também por espectrometria de massa em sistema Q-TOF Ultima API (Waters, Manchester, UK) em modo W. As amostras foram preparadas em uma mistura de água, acetonitrila e ácido acético (50:50:0,1) e aplicadas sob fluxo de 2 µL/min. O capilar e a voltagem do cone foram ajustadas para 2.8 kV e 30 V, respectivamente.

3.2.10-SEQÜENCIAMENTO DO N-TERMINAL PELO MÉTODO DE DEGRADAÇÃO DE EDMAN

O inibidor PcBBI1 purificado foi seqüenciado automaticamente pelo método de degradação de Edman em um seqüenciador de peptídeos *PPSQ* (Shimadzu Co., Kyoto, Japan), conforme instruções do fabricante.

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1-PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR DE PROTEINASE TIPO BOWMAN-BIRK DE *Phaseolus coccineus*

4.1.1-Cromatografia de troca iônica em DEAE-Cellulose

A fração F₀₋₆₀, após precipitação com sulfato de amônio 0-60% de saturação, foi aplicada em uma coluna de troca iônica DEAE-Ccellulose (**Figura 22A**). O perfil protéico monitorado a 280 nm, revelou 3 frações correspondentes aos picos denominados de ID, IID e IIID. O pico ID foi eluído com o mesmo tampão de equilíbrio, enquanto que, os picos IID e IIID foram eluídos em gradiente linear entre 0-0,4 M de NaCl em tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5. O pico IIID que apresentou atividade inibitória para tripsina pancreática bovina foi eluído em 0,06 M de NaCl, aproximadamente, e quando submetido à análise por Maldi-Tof (dados não mostrados) e por SDS-PAGE (**Figura 22B**), apresentou proteínas com massas moleculares pequenas, características desses inibidores. O pico IIID foi, então, liofilizado e utilizado nos passos seguintes de purificação e caracterização.

4.1.2-Cromatografia de filtração molecular em Superdex 75

A fração ativa (pico IIID), coletada da DEAE-Cellulose, foi solubilizada em acetonitrila 20% e aplicada em uma coluna de filtração molecular Superdex 75 (**Figura 23A**) equilibrada com acetonitrila 20%. As proteínas foram eluídas sob fluxo de 0,5 mL/min. O perfil cromatográfico monitorado a 216 nm revelou 3 picos denominados de IM, IIM e IIIM, os quais foram também submetidos a análises eletroforéticas (**Figura 23B**), por Maldi-Tof (dados não mostrados) e ensaios *in vitro* contra tripsina. O pico IM, o qual apresentou atividade inibitória para tripsina foi, então, liofilizado e utilizado para seguir com a purificação do inibidor.

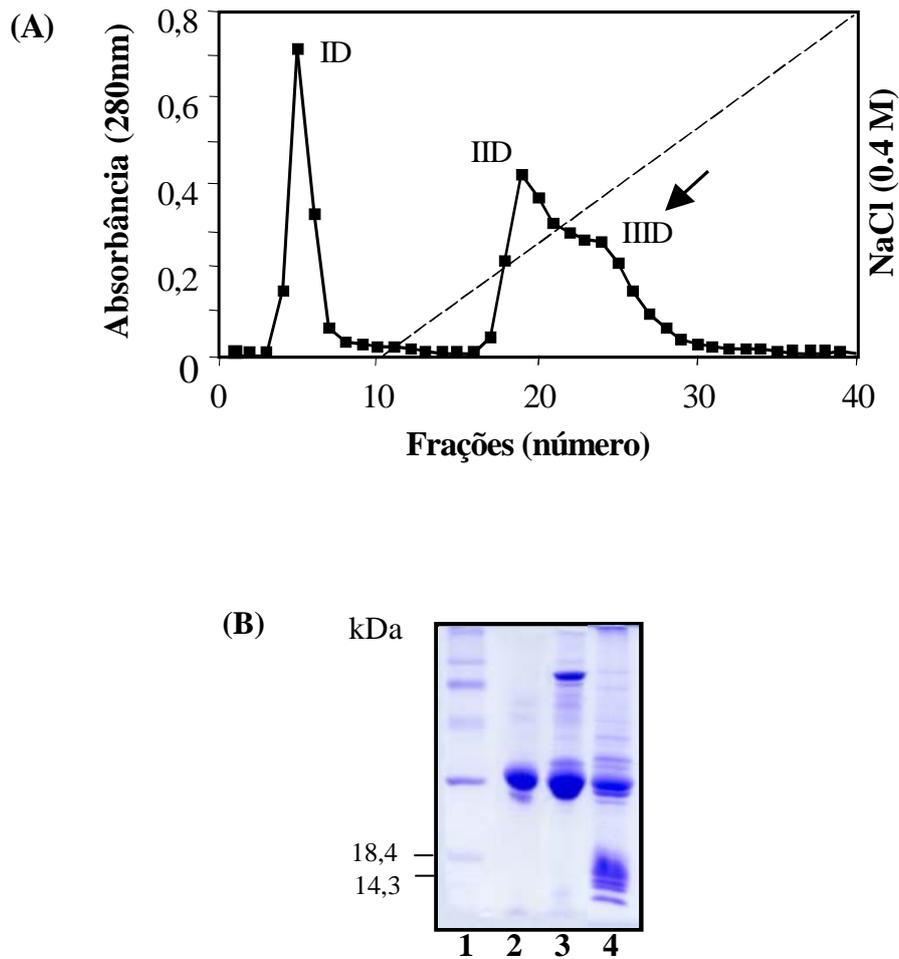


Figura 22: (A) Perfil protéico da F₀₋₆₀ submetida à cromatografia de troca iônica em DEAE-Celulose. A fração (pico IIID) contendo o inibidor de tripsina foi eluída em gradiente linear entre 0-0,4 M de NaCl em tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 7,5 sob fluxo de 30 mL/h. (B) SDS-PAGE corado com *comassie brilliant blue* das frações eluídas da DEAE-Celulose. Linha 1: Marcador de massa molecular. Linha 2: Pico ID. Linha 3: Pico IID. Linha 4: Pico IIID.

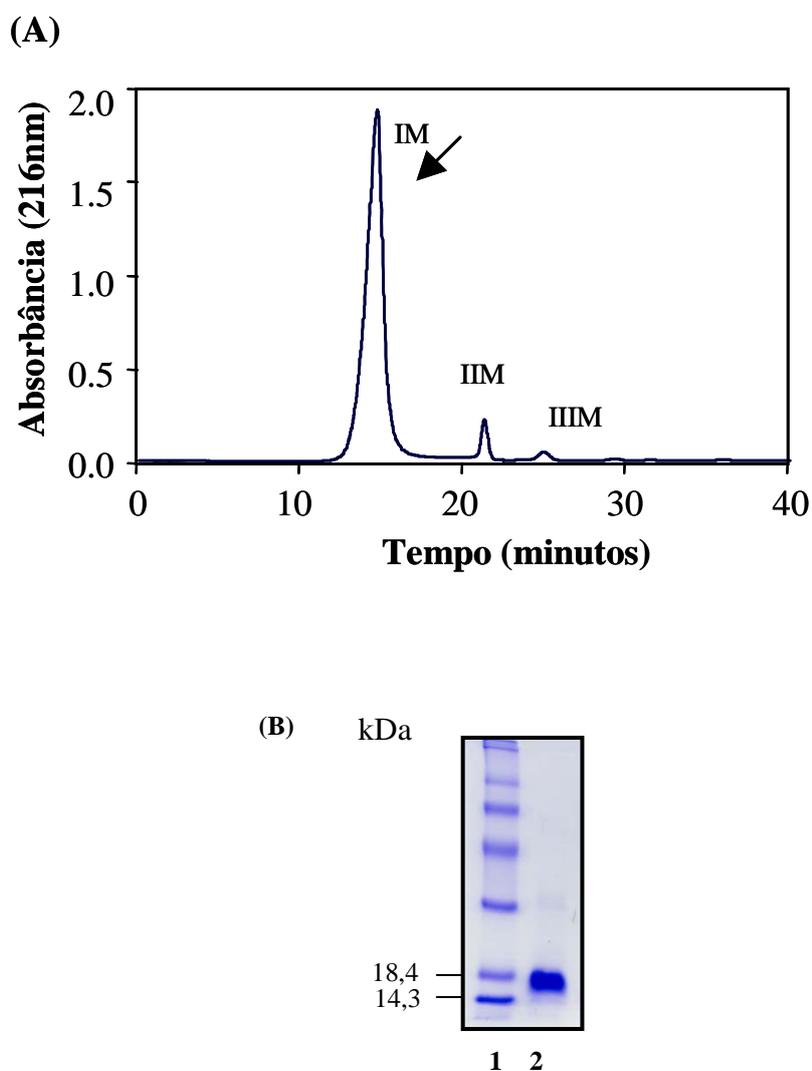


Figura 23: (A) Cromatografia de filtração molecular em Superdex 75 a partir da fração IIID. A fração IM contendo o inibidor de tripsina foi eluída em acetonitrila 20% sob fluxo de 0,5 mL/min. (B) SDS-PAGE corado com *comassie brilliant blue* da fração eluída da Superdex 75. Linha 1: Marcador de massa molecular. Linha 2: Pico IM.

4.1.3-Cromatografia líquida de alta pressão em Vydac C18 e em Source 5RPC

Seguindo com a purificação, a fração IM coletada da coluna de filtração molecular foi solubilizada em TFA 0,1% e adicionada em uma coluna fase-reversa líquida de alta pressão Vydac C18 (**Figura 24A**), equilibrada com uma solução de água contendo ácido trifluoroacético (TFA) 0,1%, sob fluxo de 1,0 mL/min. As proteínas foram eluídas com um gradiente de 20-60% de acetonitrila. O perfil cromatográfico monitorado a 216 nm, revelou 3 frações protéicas, denominadas de IC, IIC e IIIC. A fração IIIC foi eluída em 29,4% de acetonitrila e mostrou atividade inibitória para tripsina pancreática bovina. Nesta fração, após análise por MALDI-TOF, foi observada a presença de duas proteínas, sendo então necessário aplicar esta mesma fração em outra coluna líquida de alta pressão (**Figura 24B**), onde foi possível observar duas frações protéicas separadamente IS e IIS, as quais foram eluídas em 28,6 e 29,4% de acetonitrila, respectivamente. A fração IS e IIS apresentaram atividade inibitória para tripsina, mas apenas a forma mais abundante IS denominada de inibidor PcBBI1 foi submetida ao seqüenciamento para análise da composição de resíduos de aminoácidos e para os experimentos de caracterização.

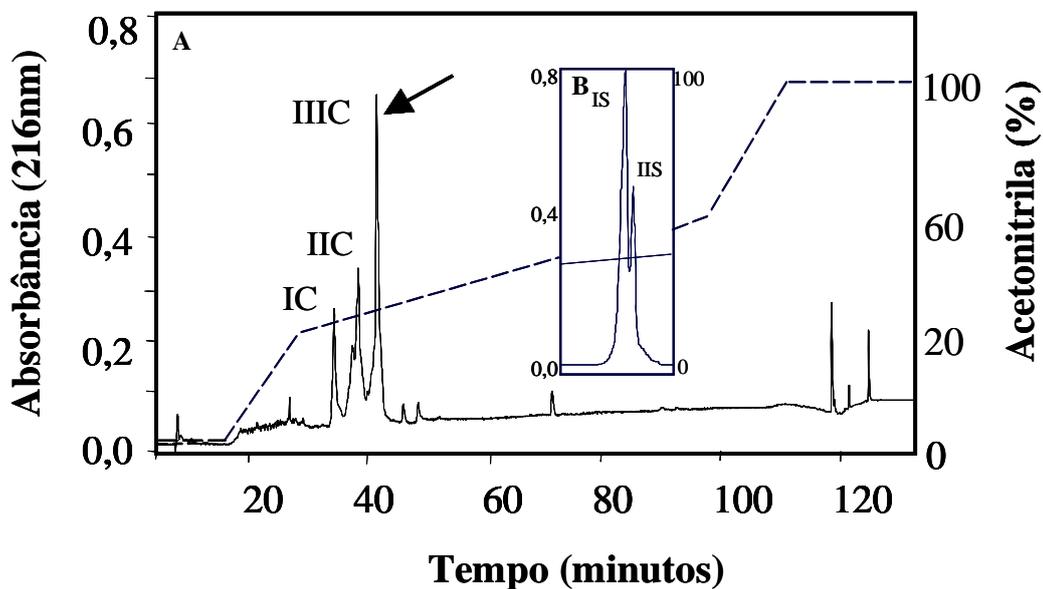


Figura 24: (A) Perfil cromatográfico da fração IM em coluna líquida de alta pressão (Vydac C18). A fração IIIC contendo o inibidor ativo para tripsina foi eluída em 29,4% de acetonitrila sob fluxo de 1 mL/min. (B) Perfil cromatográfico da fração IIIC em coluna líquida de alta pressão (Source). A fração IS e IIS foram eluídas em 28,6% e 29,4%, respectivamente, de acetonitrila, sob fluxo de 1mL/min.

O procedimento de purificação para obtenção do inibidor de proteinase de sementes de *P. coccineus* se mostrou um procedimento bastante eficiente, revelando uma purificação de 489 vezes e um rendimento de 41,9% para o inibidor PcBBI1.

Tabela 02: Purificação do inibidor de proteinase Bowman-Birk de *P. coccineus* - PcBBI1

Frações	Atividade inibitória total	Proteína total (µg)	Atividade específica (UI/mg proteína)	Purificação (X)	Concentração de proteína (ng) que inibe 50% da atividade da tripsina	Recuperação (%)
F ₀₋₆₀	31500	3.500	9	1	90	100
F _{IIID}	26400	600	4	5	20	83,8
F _{IF}	21990	30	733,3	82	1,2	69,8
F _{IIIC}	19550	10	1955	221	0,45	62,1
F _{IS (PcBBI1)}	13200	3	4400	489	0,2	41,9
F _{IIS (PcBBI2)}	12060	3	4020	472	0,18	40

Uma unidade de atividade é a quantidade da enzima que libera um µMol de MCA/minuto/mg de proteína.

Uma unidade inibitória foi definida como a quantidade de inibidor capaz de inibir uma unidade da enzima.

4.2-ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR DO INIBIDOR DE PROTEINASE PcBBI1

A massa molecular do inibidor purificado PcBBI1 foi determinada por análise em SDS-PAGE, MALDI-TOF. O perfil eletroforético (**Figura 25A**) do inibidor PcBBI1 quando tratado com β-mercaptoethanol, responsável pela redução das ligações dissulfeto, revelou uma proteína de aproximadamente 8.500 Da, podendo ser caracterizada como a forma monomérica, e sem tratamento, uma proteína de aproximadamente 17.000 Da, possivelmente caracterizada como a forma dimérica. Similar resultado foi observado por análise em espectrometria de massa (MALDI-TOF) (**Figura 25B**), onde foi visualizado uma massa molecular de 8.689 Da e uma de 17.375 Da, correspondendo ao monômero e ao dímero, respectivamente. Este resultado pode revelar que a proteína (PcBBI1) consiste de duas subunidades idênticas ou bastante similares que interagem entre si por pontes dissulfeto, as quais são formadas por ligações covalentes.

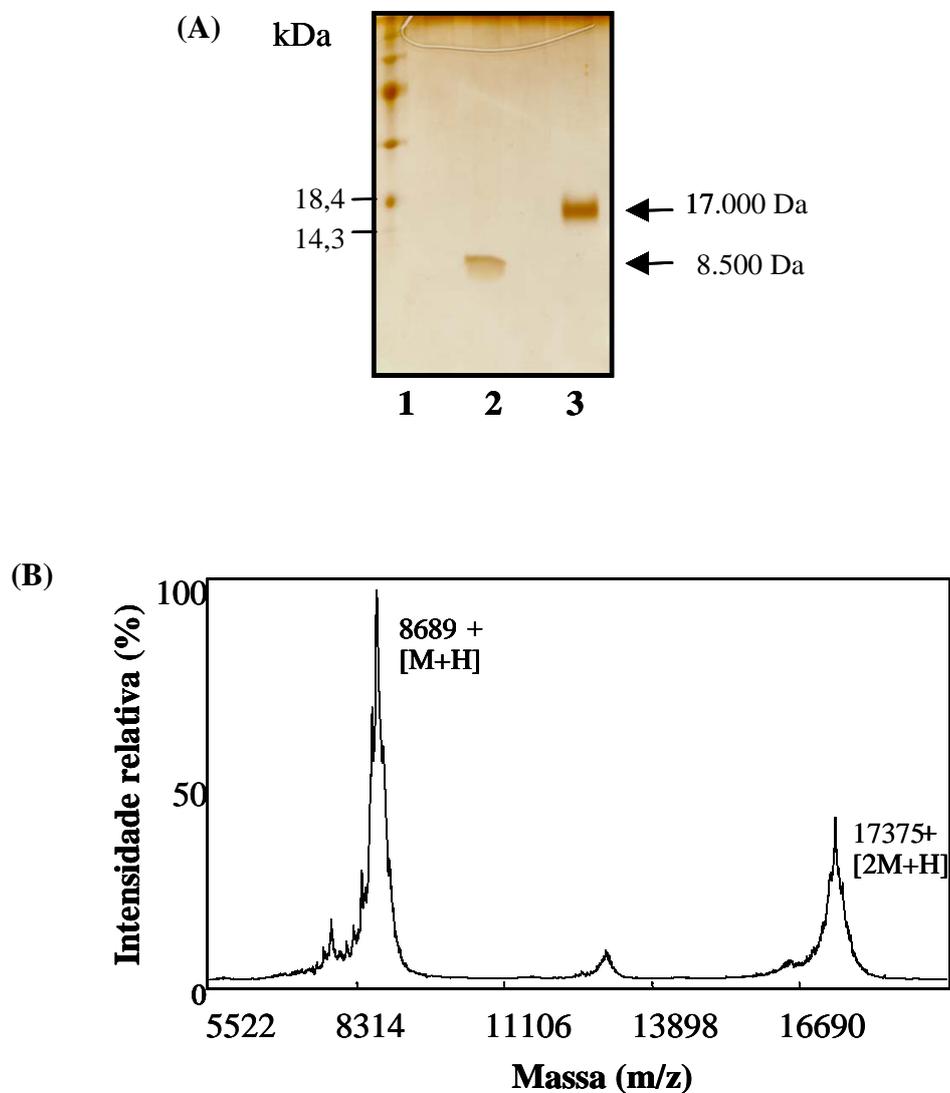


Figura 25: Análise da massa molecular do inibidor purificado PcBBI1. (A) Gel de poliacrilamida (13%) corado com prata. Linha 1: Marcadores de massa molecular. Linha 2: proteína reduzida. Linha 3: proteína nativa. 10 μ g da fração IS ou PcBBI1 foi aplicado no gel. (B) Espectrometria de massa (Maldi-Tof).

4.3-ANÁLISE DO SEQÜENCIAMENTO DO N-TERMINAL DO INIBIDOR PcBBI1

Através do seqüenciamento protéico do PcBBI1 foi identificado 51 resíduos de aminoácidos. Esta seqüência, quando depositadas no banco de dados, mostrou identidade com várias seqüências protéicas de inibidor tipo Bowman-Birk. O maior percentual de identidade do PcBBI1 foi notado em relação ao inibidor de tripsina TBPI de *P. acutifolius*, apresentando 76% de identidade e ao inibidor tipo Bowman-Birk de *P. vulgaris*, com 68% de identidade. Um menor percentual em relação aos demais inibidores de Bowman-Birk também foi observado.

O alinhamento da seqüência protéica do N-terminal do inibidor PcBBI1 com as seqüências de inibidores, acima mencionadas, pode ser visualizado na **figura 26**, onde o inibidor PcBBI1 apresenta os dois sítios ativos como encontrados nos IBBs. O primeiro sítio de ligação presente no inibidor PcBBI1, representado pela seqüência CTKSIPPQC se mostrou bastante conservado. Neste sítio foi observada uma lisina (Lys) na posição 27 (numerada de acordo com a seqüência do inibidor TBPI), citada como o resíduo de aminoácido responsável pela inibição da tripsina na maioria dos IBBs (Prakash *et al.*, 1996; Campos *et al.*, 2004; QI *et al.*, 2005). Já o segundo sítio ativo, representado pelos resíduos de aminoácidos CLHRGHAHC, se apresentou bastante diferente, onde na posição 49 (numerada de acordo com a seqüência do inibidor TBPI) foi observada uma histidina (His) no lugar dos resíduos de aminoácidos de arginina (Arg), fenilalanina (Phe), tirosina (Try), leucina (Leu) ou alanina (Ala), freqüentemente encontrado no segundo sítio como os resíduos de aminoácidos responsáveis pela inibição da quimotripsina nos IBBs, principalmente de dicotiledôneas (QI *et al.*, 2005), sendo Phe, o resíduo de aminoácido mais importante nesta inibição (Odani e Ono, 1980; Campos *et al.*, 2004; QI *et al.*, 2005). Outras diferenças de grande relevância foram observadas pela presença de uma arginina (Arg) na posição 51 ao invés do resíduo de aminoácido de serina (Ser), e pela presença de uma histidina na posição 53 ao invés de resíduo de aminoácido de prolina (Pro), Tanto Ser como pro são aminoácidos conservados nos dois sítios reativos dos BBIs (Maeder *et al.*, 1992; QI *et al.*, 2005). Estes resíduos de aminoácidos estão envolvidos na conformação de uma alça inflexível que está relacionada à atividade inibitória dos IBBs (Maeder *et al.*, 1992).

Mais adiante, será mostrado, pelos ensaios de inibição, que esta diferença não reduziu a especificidade do inibidor PcBBI1 pela quimotripsina (**Tabela 03**), mesmo assim é necessário um estudo mais apurado da seqüência, ou seja, das variações observadas e sua relação sobre a atividade do inibidor aqui estudado.

Os resíduos de aminoácidos de cisteína na sequência do inibidor PcBBI1 são bem conservados. Devido apenas 10 resíduos de aminoácidos de cisteína terem sido detectados no sequenciamento do N-terminal, o inibidor foi reduzido com DTT e alquilado com iodacetamida e submetido à análise por espectrometria de massa em Q-TOF (**Figura 27**) para confirmação do número de cisteínas. O DTT ocasiona a quebra das ligações, enquanto que a iodacetamida se liga à cisteína, impedindo que as mesmas voltem a se oxidar e reconstituam as pontes dissulfeto. Então a análise por espectrometria do inibidor PcBBI1, com massa molecular de 8.689 Da, após redução e alquilação, mostrou uma massa de 9.502 Da. Este acréscimo de 813 Da na massa molecular da proteína é decorrente da adição de 14 resíduos de iodacetamina com massa molecular de 58 Da (após perder o iodo da molécula inicial) de cada, que se ligam individualmente a cada cisteína livre, sugerindo, assim, a presença de 14 resíduos de aminoácidos de cisteína no inibidor PcBBI1, as quais formam sete pontes dissulfeto características desta classe de inibidor (Richardson *et al.*, 1991; Werner e Wemmer, 1991; Singh e Rao, 2002).

PcBBI1DEPSESSKACCDHCACTKSIPPQC	23
TBPISGHHHD..SSDEPSESSKACCDHCACTKSIPPQC	32
PvI-3SGHRHESXBSTBXASXSSKPCCBHCACTKSIPPQC	34
SoyBBI	MVVLKVLVLLFLVGGTTSANLRLSKLGLLMKSDHQHSNDESSKPCCDQCACTKSINPPQC	60
AzukiBBISVHHQD..SSDEPSESSHPCCDLCLCTKSIPPQC	31
SoyBBPIDII	MVVLKVLVLLFLVGVTAAP...MELSFVKSDQSSSYDDDEYSKPCCDLCLCMCTRSMPQC	56
PcBBI1	RCSNLRRLNECKHECRKICLHRGHAHC.....	51
TBPI	RCA.LRLN.CNH.CRSCICTFSIPAQCCTDTNDFCYEPCKSGHDDDDSG	80
PvI-3	RCSBLRLNSCHSECKGCICTFSIPAQCICDTNDFCYEPCKSSHGPBBNN	85
SoyBBI	RCSMRLNSCHSACKSCICALSYPAQCFVDITDFCYEPCKPSDDKEN.	110
AzukiBBI	QCADIRLDSCHSACKSCMCTRSMPGQCRCLDTHDFCHKPCKSRDKD....	78
SoyBBPIDII	SCEDIRLNSCHSDCKSCMCTRSQPGQCRCLDTHDFCYKPCSRDD.....	102

Figura 26: Alinhamento do inibidor PcBBI1 com outros IBBs. TBPI: P83311 (Campos *et al.*, 2004); PvI-3: P81484 (Funk *et al.*, 1993); SoyBBI: X68704 (Baek e Kim, 1993); AzukiBBI: (Kiyohara *et al.*, 1981); SoyBBPID-II: (Baek *et al.*, 1994). Os sítios de ligação para tripsina e quimotripsina estão sublinhados e os resíduos de cisteína marcados com a cor cinza.

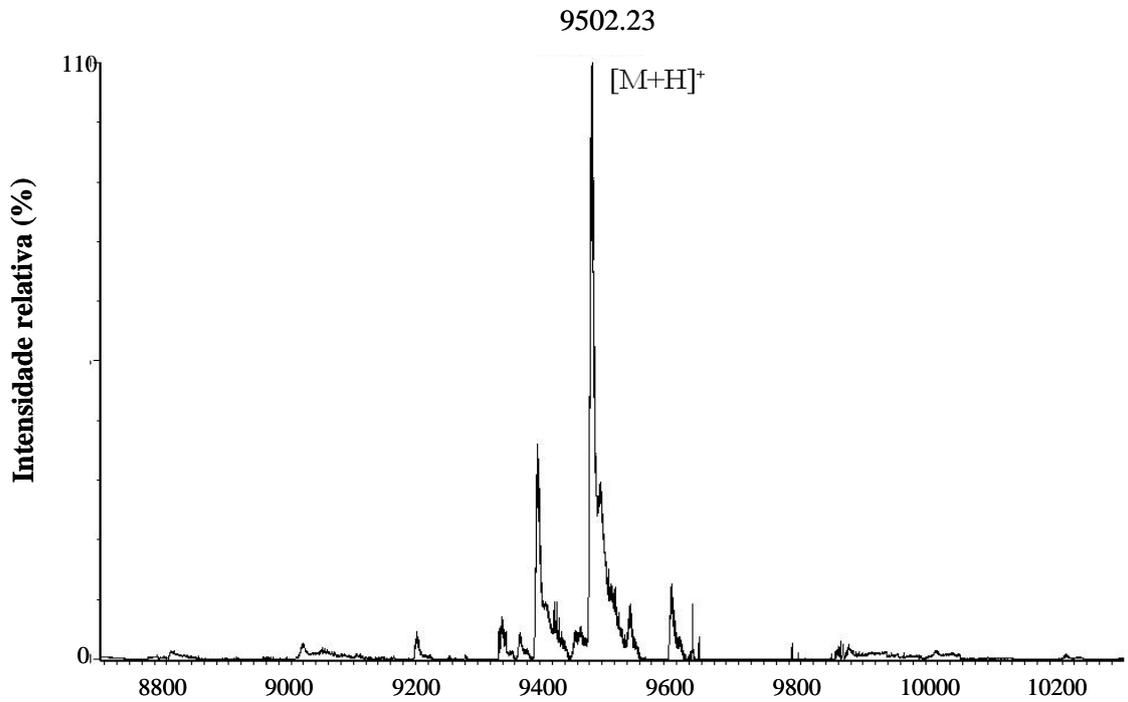


Figura 27: Espectro de massa do inibidor PcBBI1 por Q-TOF. Massa molecular da proteína reduzida com DDT e alquilada com iodacetamida.

4.4-ATIVIDADE *in vitro* DO INIBIDOR PcBBI1

As frações protéicas coletadas dos passos cromatográficos de purificação, identificadas de F₀₋₆₀, IIID, IM, IIIC, IS (PcBBI1) e IIS (PcBBI2), foram selecionadas, passo a passo, quando ensaiadas *in vitro* contra tripsina pancreática bovina, onde todas mostraram atividade inibitória (**Tabela 03**). A especificidade da atividade inibitória do inibidor purificado PcBBI1 foi demonstrada por ensaios enzimáticos *in vitro* contra tripsina e quimotripsina pancreática bovina e contra proteinases serínicas, presente nos extratos enzimáticos intestinais de larvas de *H. hampei*, *A. grandis* e extratos enzimáticos intestinais de inseto adulto de *E. heros*.

O inibidor PcBBI1 foi altamente ativo contra tripsina e quimotripsina pancreática bovina, inibindo 100% de ambas as atividades proteolíticas a uma baixa concentração de 0,01

$\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ (**Tabela 03**). Nesta mesma concentração, o inibidor PcBBI1 mostrou atividade inibitória para tripsina em todos os pHs testados mostrando maior atividade em pH 8,0 (**Figura 28**).

O inibidor foi altamente estável ao calor em pH 8,0 permanecendo ativo por um longo tempo, perdendo 90% de sua atividade inibitória apenas após 180 minutos de tratamento térmico a 100°C (**Figura 29**). A estabilidade térmica do inibidor PcBBI1 não foi testada nos pHs ácidos e neutros. Osman e colaboradores (2002) demonstraram que os inibidores de Bowman-Birk, como TBPI e SoyBBI, são altamente estáveis quando submetidos a tratamento térmico a 100°C em pH ácidos e neutro e são menos estáveis em pH alcalino. DiPietro e Liener (1989) mostraram que o inibidor de Bowman-Birk BTCl, purificado de sementes de *V. unguiculata* (L.), apresentou alta estabilidade em pH de 3 a 12 e também alta estabilidade quando submetido a tratamento térmico nestes diferentes pHs.

Embora a estabilidade térmica do inibidor PcBBI1 em pH ácido e neutro não tenha sido testada, não podemos descartar a hipótese de que este inibidor seja estável nestes pHs. Belitz e Grosch (1988) afirmaram que a estabilidade térmica dos inibidores de proteinases depende de sua massa molecular e da estabilidade da estrutura ativa, decorrente da presença das pontes dissulfeto. Isto tem sido demonstrado desde os primeiros relatos feitos por Birk (1985), que inibidores de Bowman-Birk são muito estáveis a variação de pH, devido seu tamanho e números de pontes dissulfeto do que os inibidores tipo kunitz.

Com relação à atividade inibitória do inibidor PcBBI1 sobre as atividades das proteinases presentes nos intestinos dos insetos alvos, foi encontrado que o inibidor PcBBI1, a uma concentração de 0,03 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$, apresenta um alto nível de inibição, reduzindo 80% da atividade proteolítica da tripsina de larvas de *H. hampei* (**Tabela 03 e Figura 30**), sendo inativo para a atividade tripsínica dos extratos enzimáticos de *A. grandis* e *E. heros* (**Tabela 03**). O restante da atividade (20%), observada para as proteinases com atividade trípica de *H. hampei*, pode ser explicada pela presença de proteinases insensíveis ao inibidor.

Relatos recentes têm demonstrado a atividade inibitória de inibidores de Bowman-Birk contra proteinases intestinais de insetos como *A. grandis* (Purcell *et al.*, 1992, Franco *et al.*, 2003), *A. pisum* (Rahbé *et al.*, 2003) e *D. saccharalis* (Falco *et al.*, 2003).

Tabela 03: Atividade inibitória do inibidor PcBBI1 para diferentes proteinases.

Proteinase alvos	Inibição (%)
Trypsin	100 ± 0.17
Chymotrypsin	100 ± 1.90
HhP	80 ± 2.31
AgP	4 ± 2.05
EhP	3 ± 1.58

A atividade inibitória do inibidor PcBBI1 foi testada em pH 8,0 contra a atividade enzimática da tripsina e quimotripsina e, contra as atividades das proteinases tipo tripsina presentes no extrato protéico do inseto adulto *E. hero* (EhP) e do intestino de larvas de *H. hampei* (HhP) e *A. grandis* (AgP). Para o ensaio com tripsina foi utilizado o substrato Z-PheArg-MCA e para quimotripsina o Z-Arg-Pro-Phe-His-Leu-Leu-Val-Tyr-MCA. O ensaio foi feito em triplicata e o desvio padrão foi calculado.

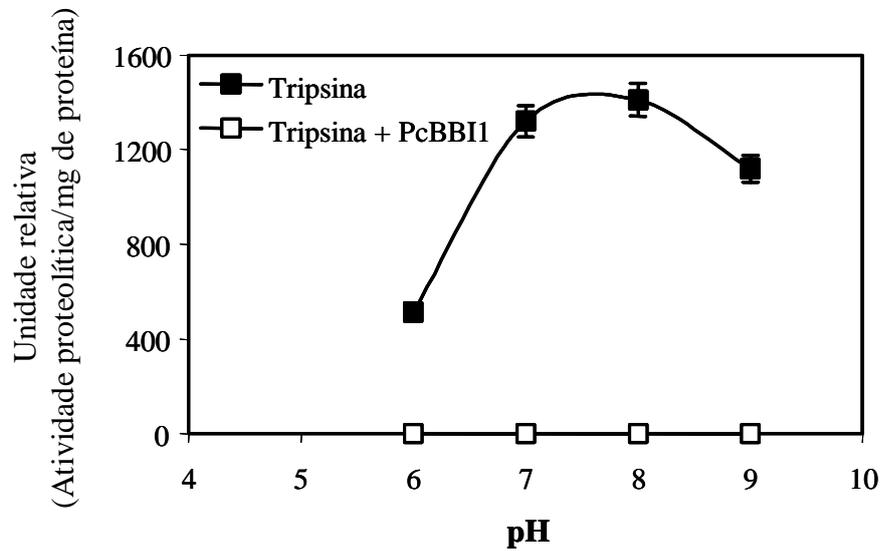


Figura 28: Atividade inibitória do inibidor PcBBI1 em diferentes pHs. Atividade da tripsina na presença de 0,1 μg PcBBI1, após 30 minutos de pré-incubação foi medida após a adição do substrato Z-Phe-Arg-MCA. Cada medida foi feita em triplicata. O erro de barras representa o desvio padrão.

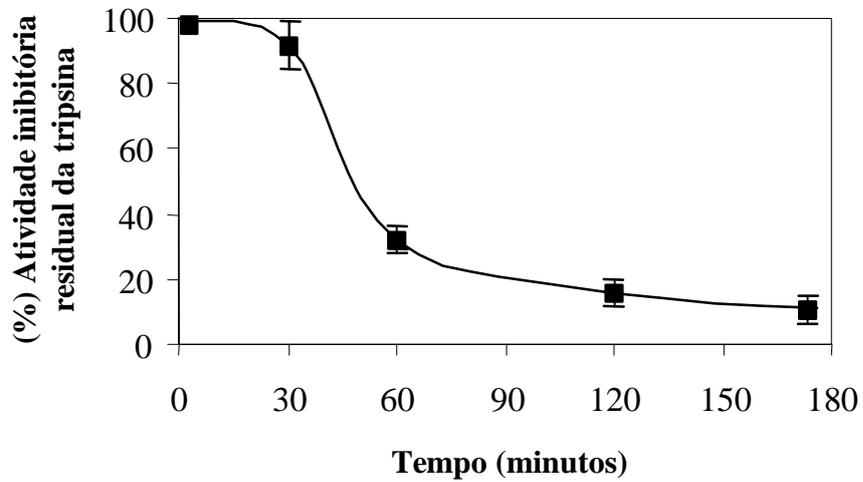


Figura 29: Inativação térmica do inibidor PcBBI1. Atividade da tripsina residual (% de atividade da tripsina na ausência do inibidor PcBBI1). A enzima foi pré-incubação por 30 minutos com PcBBI1 (0,1 μ g) após tratamento térmico a 100°C em diferentes tempos (30, 90, 120 e 180 min). Cada medida foi feita em triplicata. As barras de erro representam o desvio padrão.

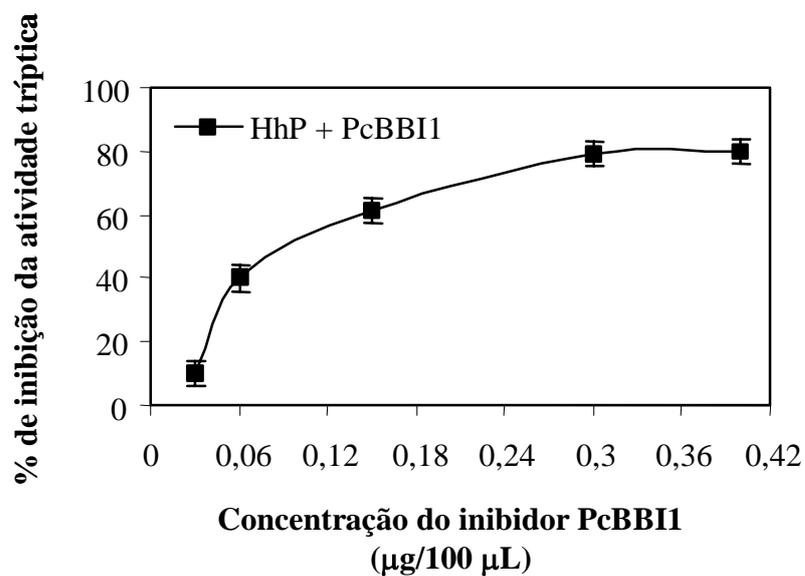


Figura 30: Inibição da atividade trípica das proteinases de larvas de *H. hampei* (HhP) pelo inibidor PcBBI1. Enzimas e várias concentrações de PcBBI1 foram pré-incubados por 30 minutos antes da adição do substrato Z-Phe-Arg-MCA para medir a atividade da enzima. Cada medida foi feita em triplicata. O erro de barras representa o desvio padrão.

1-ABSTRACT

A proteinaceous inhibitor with high activity against papain was found in seeds of the xerophytic algaroba tree (*Prosopis juliflora*). The proteinase inhibitor Pj was purified using Sephacryl S-200 gel filtration followed by reverse-phase high-performance liquid chromatography on a Vidac 18 TP. Inhibitor Pj showed a M_r of 20.000 on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and a M_r of 19.276 Da by mass spectrometry. The inhibition of papain by the Pj inhibitor was the noncompetitive type, with a K_i value of 0.59×10^{-9} M. The gelatinase activity of papain was strongly inhibited by Pj too. The N-terminal amino acid sequence of the Pj inhibitor showed homology with the N-terminal amino acid sequence of the Kunitz-proteinase inhibitor family. Pj was strongly effective against digestive proteinases from bean weevil *Acanthoscelides obtectus* and cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* and Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. The data shown here suggest that the protein present in algaroba seeds is involved with defense responses to insects and may be an important tool to be used in engineering plants resistant to bean weevils.

2-RESUMO

Um inibidor de proteinase com alta atividade contra a papaína foi isolado de sementes de algaroba (*Prosopis juliflora*). O inibidor de proteinase Pj foi purificado usando uma coluna de filtração molecular Sephacryl S-200 seguido por uma coluna de fase-reversa líquida de alta pressão Vydac 18 TP. O inibidor Pj mostrou uma massa molecular de 20.000 Da por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS e massa molecular de 19.276 Da por espectrometria de massa. A inibição da papaína pelo inibidor Pj foi do tipo não-competitivo, com um valor de K_i de 0.59×10^{-9} . A atividade gelatinásica da papaína também foi fortemente inibida pelo inibidor Pj. A seqüência de aminoácidos da extremidade N-terminal do inibidor Pj mostrou homologia com a seqüência de aminoácidos da extremidade N-terminal de inibidores de proteinase da família Kunitz. Pj foi fortemente efetivo contra proteinases digestivas do gorgulho do feijão *Acanthoscelides obtectus* e do gorgulho de caupi *Callosobruchus maculatus* e foi moderadamente ativo contra proteinases digestivas do gorgulho da vagem *Mimosestes mimosae* e do gorgulho do feijão comum *Zabrotes subfasciatus*. Os dados aqui mostrados sugerem que a proteína presente em sementes de algaroba estar envolvida na defesa em resposta ao ataque de insetos e pode ser uma importante arma para ser utilizada na engenharia de plantas resistentes a gorgulhos do feijão.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1-MATERIAIS

3.1.1-Material biológico

Algaroba - Sementes de algaroba (*P. juliflora*) foram fornecidas pelo banco de sementes do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) de Natal-RN.

Insetos - Colônias de *C. maculatus*, *M. mimosae* foram mantidas e cedidas pelo laboratório de Química e Função de Proteínas do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN. *Z. subfasciatus*, *A. obtectus* e *Meloidogyne javanica* foram cedidos pelo Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (CENARGEN / EMBRAPA), Brasília-DF.

3.1.2-Enzimas

Papaína - Sigma (St. Louis, MO)

Enzima utilizada nos ensaios de detecção enzimática e de inibição

BSA (Albumina Sérica Bovina) - Sigma (St. Louis, MO)

Utilizada nos experimentos de imunoreação e quantificação protéica

3.1.3-Soluções e tampões

Acetonitrila 20%

Acetonitrila 100% 200mL

q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

Ácido trifluoracético (TFA) 0,1%

TFA 0,1% 1mL

q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

Acrilamida/Bis-acrilamida

Acrilamida 29,2 g

Bisacrilamida 0,8 g

q.s.p. 100 mL de H₂O destilada

HCl 0,1M, NaCl 0,15M

NaCl 4,16 g

HCl 3,3 mL

q.s.p. 500 mL de H₂O destilada

Persulfato de amônio 10%

Persulfato de amônio 10 g

q.s.p. 100 mL de H₂O destilada

SDS 10%

SDS 10 g

q.s.p. 100 mL de H₂O destilada

Solução descorante para gel de poliacrilamida

Etanol 400 mL

Ácido acético 100 mL

q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

Solução corante para gel de poliacrilamida

Coomassie brilliant blue R250 1 g

Metanol 400 mL

Ácido acético 100 mL

q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

Tampão de corrida para eletroforese

Tris 3 g

SDS 1 g

Glicina 14,4 g

q.s.q 1000 mL de H₂O destilada

Tampão de amostra para gel de agarose (TEB) 10X

Glicerol 50% (v/v)

Azul de bromofenol 0,1% (v/v)

Xileno cianol 0,1% (v/v)

Os reagentes foram dissolvidos em TEB 10X

Tris 0,05 M pH 7,5

Tris 6,06 g

HCl para ajustar o pH

q.s.p. 1000 mL de H₂O destilada

3.1.4-Reagentes

Marcador de massa molecular - BenchMark Prestained Protein Ladder (Gibco)

TEMED – Sigma (St. Louis, MO)

3.1.5-Cromatografias

Sephacryl S200 - Amersham Pharmacia Biotech

C₁₈ (218 TP 54) - Vydac

3.2-METODOLOGIA

3.2.1-PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR DE PAPAÍNA DE SEMENTES DE ALGAROBA

3.2.1.1-Obtenção do extrato protéico a partir das sementes secas de algaroba

Inicialmente, as sementes secas de algaroba foram trituradas em multiprocessador e passadas em peneira para obtenção de uma farinha. O extrato bruto da farinha de semente foi preparado em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, na proporção de 1:10 (p/v), sob agitação constante por 3 horas, em câmara fria. O extrato foi centrifugado a 8.000 x g por 30 minutos, a 4°C. O precipitado foi descartado, e o sobrenadante filtrado foi denominado de ExB, o qual foi fracionado com sulfato de amônio em três etapas de saturação: 0-30%, 30-60% e 60-90%. Após cada etapa de saturação, as soluções saturadas com sulfato de amônio foram deixadas por 18 horas a 5°C, e posteriormente, centrifugadas a 10.000 x g durante 30 minutos, a 4°C. Os precipitados resultantes de cada saturação foram ressuspensos em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 e dialisados contra água, durante 18 horas. Essas frações foram denominadas de acordo com o referido percentual de saturação F0-30, F30-60 e F60-90. Posteriormente, estas frações foram ensaiadas *in vitro* contra a papaína (uma proteinase cistéinica) para a detecção da atividade inibitória.

3.2.1.2-Cromatografia de filtração molecular em Sephacryl S-200

A fração F30-60, com alta atividade inibitória contra papaína, foi utilizada para o isolamento do inibidor de proteinase. Liofilizado da fração F30-60 foram ressuspensos em 4 mL de tampão Tris-HCL 0,05 M, pH 7,5 (5,5 mg de proteínas/mL) e, em seguida, centrifugada a 10.000 x g por 30 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi aplicado em uma coluna de Sephacryl S-2000 (84 x 2,5 cm), equilibrada com o mesmo tampão acima citado e submetida a um fluxo de 30 mL/h. Frações de 1,5 mL foram coletadas e o perfil protéico foi monitorado a 280 nm. Ensaio de atividade inibitória para papaína foram feitos para identificação dos picos de inibição. A fração com maior atividade inibitória, denominada de FI3, foi coletada, dialisada e liofilizada para ser, então, utilizada nas etapas seguintes de purificação.

3.2.1.3- Cromatografia líquida de alta pressão em Vydac C18

A fração FI3, coletada da coluna de filtração molecular, foi solubilizada em ácido trifluoracético (TFA) 0,1% preparado em água Milli-Q ultra pura (Solução A) e aplicada em uma coluna de fase reversa (Vydac 18 TP 1022 C-18) acoplada a um sistema de HPLC e, inicialmente, equilibrada com a solução A, com um fluxo de 1,0 mL/min. As proteínas foram eluídas com um gradiente de 0-100% de acetonitrila em 0,1% de TFA (Solução B). O ácido trifluoroacético (TFA) a 0,1% foi utilizado como agente pareador de íons. O perfil cromatográfico foi monitorado a 216 nm e as frações individuais obtidos foram ensaiadas contra a papaína. A fração purificada correspondente ao inibidor de proteinase, identificada na coluna de pico G, foi denominada de inibidor Pj, o qual foi coletado, liofilizado e armazenado para os experimentos seguintes.

3.2.2-DOSAGEM DE PROTEÍNAS

A concentração de proteína foi determinada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina sérica bovina como padrão.

3.2.3-ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

Eletroforeses das amostras foram feitas em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) empregando acrilamida a 4% no gel concentrador e 12% no gel separador de acordo como o método desenvolvido por Laemmli (1970). O marcador de massa molecular utilizado era composto de α -lactalbumina (14.3 kDa), inibidor de tripsina de soja (20.1 kDa), anidrase carbônica (29 kDa), ovalbumina (43 kDa), albumina sérica bovina (68 kDa) e fosforilase b (97 kDa). Após a separação das proteínas, os géis foram corados com *comassie brilliant blue* como descrito anteriormente no capítulo II. As eletroforeses foram realizadas sob corrente constante de 40 mA por, aproximadamente, 2 horas.

3.2.4-ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

O grau de pureza e a massa molecular do inibidor Pj , também foi analisado por espectrometria de massa em sistema *Matrix Assisted Laser Desorption ionization-Time of Flight* (MALDI-TOF) (Voyager-DE STR, PerSeptive Biosystems, Fostercity, USA).

Alíquotas de 3 μL contendo cerca de 5-20 $\text{pmol}/\mu\text{L}$ de proteína foram dissolvidas inicialmente em ácido trifluoracético 0,1% e adicionadas a 9 μL de uma solução de α -ciano-4-hydroxicinâmico (CHCA) saturada em acetonitrila e TFA a 3%, (1:1 v/v). A mistura foi homogeneizada por aproximadamente 1 minuto em agitador *Vortex-Genie 2* (Scientific Industries Inc., Bohemia, USA). Frações de 1 μL foram aplicadas em quadriplicata sobre uma placa de amostra (Voyager Bioworkstation) e cristalizadas a temperatura ambiente. Os espectros de massa (MS) foram obtidos no modo de refletor, com resolução monoisotópica e calibração externa, utilizando padrões de calibração (Sequazyme Calmixture 1-Applied Biosystems, Fostercity, USA).

3.2.5-DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-PAPAINÁSICA

A atividade inibitória das frações protéicas analisadas foi determinada usando como substrato uma solução de azocaseína 1%. Alíquotas de 30 μL de uma solução de papaína (1mg/1mL em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,8) foram adicionadas a 40 μL de uma solução ativadora contendo EDTA 0,02 M e L-cisteína 0,05 M, pH 8,0, e 40 μL de tampão Tris-HCL 0,05 M, pH 7,5. Esta mistura foi pré-incubada por 10 minutos a 45°C. No final desse tempo, foram adicionados 60 μL das frações protéicas, contendo cada 1,2 mg de proteína/mL em tampão Tris-HCL 0,05 M, pH 7,5, e 330 μL de tampão Tris-HCL 0,05 M, pH 7,5 permanecendo por mais 10 minutos nas mesmas condições de pré-incubação. A reação foi iniciada com a adição de 200 μL de solução de azocaseína a 1%. Após 10 minutos, a reação foi parada pela adição de 300 μL de solução de TCA a 10%. Decorridos 5 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi alcalinizado com NaOH 0,25 N (v/v). A leitura espectrométrica dos peptídeos solúveis foi realizada num comprimento de onda de 440 nm. Provas em branco foram realizadas. Os ensaios foram feitos em triplicata. Uma unidade de atividade anti-papainásica (UI) foi definida como a quantidade de inibidor que diminui a atividade da papaína de 0,01 da absorbância a 440 nm.

3.2.6-EXTRAÇÃO DAS PROTEINASES DAS LARVAS DE INSETOS E DOS NEMATÓIDES

A dissecação das larvas de *C. maculatus*, *M. mimosae*, *Z. subfasciatus*, *A. obtectus* e dos nematóides *M. javanica* foi realizada utilizando a metodologia descrita por Terra e colaboradores (1977). As larvas dos insetos, com idade de 18 a 20 dias foram mergulhadas em solução de NaCl 0,15 M e dissecadas a frio com auxílio de uma lupa estereoscópica. Após a exposição do trato intestinal, seguiu-se o isolamento dos intestinos médios com secção na região de passagem do esôfago para o ventrículo e na região de inserção dos tubos de Malpighi. Todos os tecidos estranhos às paredes intestinais, tais como traquéia e corpo gorduroso foram retirados. Depois de isolados os intestinos médios foram acondicionados em microtubos (50 intestinos por tubo) contendo 100 µL de tampão. As larvas de *C. maculatus* e *M. mimosae* foram acondicionadas em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, enquanto que as larvas de *Z. subfasciatus* e *A. obtectus* foram acondicionadas no tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 6,5, contendo 20 mM de DMSO e 25 mM de DTT. Os intestinos foram então homogeneizados com auxílio de um cadinho em banho de gelo por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados a 10.000 x g por 10 minutos, a 4°C e os sobrenadantes obtidos foram utilizados para os ensaios de atividade enzimática e inibitória. Nematóides fêmeas foram homogeneizados com auxílio de um cadinho em banho de gelo por aproximadamente 10 minutos usando como extrator 1 mL de tampão Tris-HCl 0,025 M, pH 6,5, contendo 20 mM de DMSO e 0,025 M de DTT. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi, em seguida, removido e usado para os ensaios de atividade enzimática e inibitória.

3.2.7-ENSAIO *in vitro* DO INIBIDOR Pj CONTRA OS EXTRATOS PROTÉICOS DAS LARVAS DOS INSETOS E NEMATÓIDES

A atividade inibitória do inibidor Pj foi testada de acordo com a metodologia descrita por Solomon e colaboradores (1999), usando como substrato 10 µM de Phe-Arg-MCA (4-ethyl-7-coumaryl)amide em tampão Tris 0,025 M, pH 6,5, DMSO 20 mM, DTT 0,025 M, em um volume final de reação de 100 µL. Alíquotas dos extratos protéicos intestinais dos diferentes insetos e os extratos protéicos dos nematóides, separadamente, foram pré-incubadas com o inibidor Pj em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, por 15 minutos a 37°C. O inibidor foi

testado a uma concentração padrão de 50 µg/mL. Provas em branco foram feitas, onde o branco da fluorescência (com exceção do substrato) foi subtraído. O resultado foi evidenciado pela liberação de metilcumarina livre no qual foi utilizado o leitor fluorimétrico DyNA Quant 500 (Pharmacia-Biotech), em comprimento de onda de excitação de 365 nm e comprimento de onda de emissão de 460 nm. Ensaios foram feitos em triplicata e nenhum valor diferiu em mais de 10%.

3.2.8-ENSAIO *in vitro* DA ATIVIDADE DO INIBITÓRIA DO INIBIDOR Pj CONTRA PROTEINASES SERÍNICAS

A atividade inibitória do inibidor Pj foi testada para as proteinases serínicas do tipo tripsina e quimotripsina. Soluções estoque das enzimas e do inibidor Pj foram preparadas: tripsina (0,3 mg/mL em HCl 0,0025 M) e quimotripsina (1 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5); inibidor Pj (1,2 mg/mL em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5). A reação de pré-incubação com tripsina continha alíquotas de 50 µL da solução de tripsina, 200 µL HCl 0,0025 M, 50 µL de Pj e 260 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. A reação de pré-incubação com quimotripsina continha alíquotas de 7 µL da solução de quimotripsina, 50 µL.

3.2.9-ENSAIO DA ATIVIDADE DA PAPAÍNA EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO 0,1% DE GELATINA

Devido o baixo rendimento na purificação do inibidor Pj, a fração FI3 foi utilizada para determinar a atividade inibitória do inibidor contra a papaína em gel de poliacrilamida, contendo gelatina 0,1%, utilizando a metodologia descrita por Michaud e colaboradores (1993) com algumas modificações. Inicialmente, foram feitas três reações: uma reação controle, denominada de C, contendo 2,5 µL (1 µg/µL) de papaína, 3,8 µL de solução ativadora (EDTA 0,02 M e L-cisteína 0,05 M, pH 8,0), 26 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5; uma reação 1, denominada de R1, contendo 2,5 µL (1 µg/µL) de papaína, 3,8 µL de solução ativadora (EDTA 0,02 M e L-cisteína 0,05 M, pH 8,0), 6 µL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, e 20 µL (2 µg/µL) da fração FI3; e uma reação 2, denominada de R2, semelhante a R1, mais contendo 26 µL (2 µg/µL) da fração FI3. A reação R1 e R2 foram pré-incubadas por 10 minutos a 45°C. Após a pré-incubação, foram adicionados a essa mistura, 3 µL do tampão de amostra, a qual foi, então, aplicadas ao gel (SDS-PAGE) contendo gelatina 0,1%. Após a

separação das proteínas, cuja corrida foi feita a 5°C, os géis foram incubados com uma solução de Triton X-100 a 2,5% por 60 minutos para remover o SDS, seguido de uma lavagem com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 por 10 minutos. Posteriormente, os géis foram incubados com uma mistura contendo 1,5 mL de solução ativadora (EDTA 0,02M e cisteína 0,05 M, pH 8,0) por 60 minutos a 45°C. Ao final deste período, o gel foi submetido a uma rápida lavagem com água destilada e, em seguida, corado com *coomassie brilliant blue*.

3.2.10-ENSAIO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA EM GEL DE POLIACRILAMIDA-SDS

Estas análises foram feitas em SDS-PAGE, no qual foi aplicado um marcador protéico de massa molecular (I), 22 µg da fração FI3 (II), e 45 µg da fração FI3 (III). Após a separação das proteínas, o gel foi incubado com uma solução de Triton X-100 a 2,5% por 30 minutos, à temperatura ambiente, para remover o SDS, seguido de uma lavagem com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 por 30 minutos. Após a lavagem, o gel foi dividido em duas partes: uma parte chamada de gel controle, contendo (I) e (II); e uma segunda parte chamada de gel teste, contendo a amostra (III). O gel teste foi pré-incubado em Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 por 10 minutos a 45°C. Após este tempo, o gel foi incubado, por mais 60 minutos, com 3 mL de uma mistura contendo 1,5 mL de solução de papaína (1 mg/1 mL de tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5) e 1,5 mL de solução ativadora (EDTA 0,02M e cisteína 0,05 M, pH 8,0). Posteriormente, a reação foi parada pela transferência do gel para uma solução corante em *coomassie brilliant blue*, em seguida, o gel foi descorado com metanol:ácido acético:água (3:1:6, v/v/v). O gel controle foi corado e descorado utilizando o mesmo procedimento para o gel teste.

3.2.11-ANÁLISE CINÉTICA DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DO INIBIDOR Pj

Para a determinação do mecanismo de inibição do inibidor Pj, o valor de K_i (constante de equilíbrio da reação de ligação do inibidor) da reação entre o inibidor Pj e a papaína foi obtido como descrito em 3.2.4. Para o controle positivo, alíquotas de 30 µL de papaína foram incubadas com concentrações crescentes de soluções de azocaseína a 1% (0,062 mg; 0,084 mg; 0,126 mg; 0,25 mg; 0,5 mg e 1,5 mg) em volumes de 200 µL livres do inibidor. Para análise da fração inibidora (Pj), alíquotas de 20 µL; 60 µL; 80 µL e 100 µL da fração foram incubadas com 30 µL de solução de papaína e 200 µL das soluções de azocaseína (0,062 mg;

0,084 mg; 0,126 mg; 0,25 mg; 0,5 mg e 1,5 mg). Provas em branco foram realizadas e os ensaios foram realizados em triplicatas. A absorbância foi medida a 440 nm e a velocidade da reação foi expressa como $1/V$ ($\text{DO}_{440}/\text{h/mL}$)⁻¹. O valor de K_i foi determinado pelo gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk conforme Dixon e colaboradores (1979). Os valores do Interceptor correspondem aos interceptos no eixo $1/V$ ($\text{DO}_{440}/\text{h/mL}$)⁻¹ obtidos da determinação do mecanismo de inibição acima citado e os valores para a inclinação das retas foram obtidos pela fórmula abaixo:

$$\text{Inclinação} = \frac{\Delta 1/V (\text{DO}_{440}/\text{h/mL})^{-1}}{\Delta 1/ [S] \mu\text{g}^{-1}}$$

3.2.12-SEQÜENCIAMENTO DO N-TERMINAL PELO MÉTODO DE DEGRADAÇÃO DE EDMAN

O inibidor PcBBI1 purificado foi seqüenciado automaticamente pelo método de degradação de Edman em um seqüenciador de peptídeos *PPSQ* (Shimadzu Co., Kyoto, Japan), conforme instruções do fabricante.

4-RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1-PURIFICAÇÃO DO INIBIDOR TIPO KUNITZ DE SEMENTE DE ALGAROBA ATIVO CONTRA PROTEINASES CISTEÍNICAS

4.1.1-Obtenção do extrato protéico com atividade inibitória

O extrato bruto da semente de algaroba fracionado com sulfato de amônio em três etapas de saturação: 0-30%, 30-60% e 60-90%, originaram três frações protéicas, denominadas de F0-30, F30-60 e F60-90, as quais foram testadas quanto à sua atividade anti-papainásica (**Figura 31**). A fração F30-60 apresentou maior atividade anti-papainásica em relação às demais frações analisadas, com um percentual de inibição correspondente a 72%.

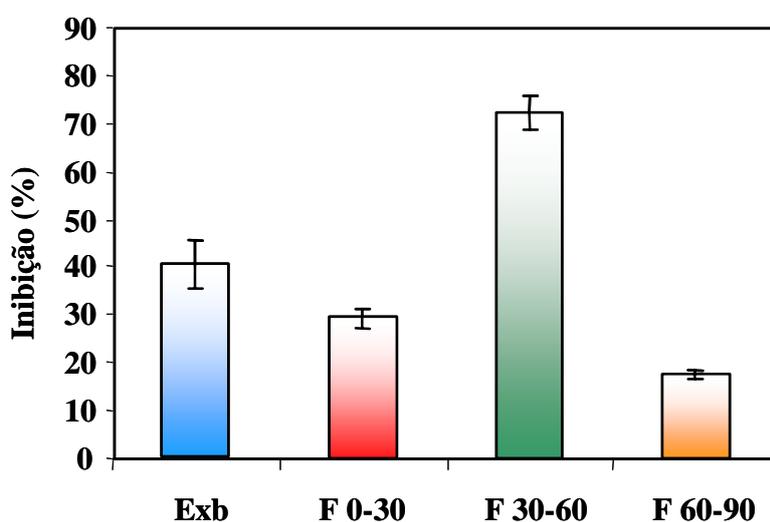


Figura 31: Atividade anti-papainásica das frações protéicas ExB, F0-30, F30-60 e F60-90. Para determinar a inibição das frações sobre a papaína foram utilizadas cerca de 100 µg de proteína de cada fração em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5. A atividade da papaína na presença de cada fração, após 10 minutos de pré-incubação foi medida após a adição do substrato azocaseína a 1%. Cada medida foi feita em triplicata. O erro de barras representa o desvio padrão.

4.1.2-Cromatografia de exclusão molecular em sephacryl S-200

A fração protéica F30-60, com elevada atividade anti-papainásica, foi aplicada em uma coluna de exclusão molecular em Sephacryl S-200 (**Figura 32**), equilibrada com tampão Tris-HCL 0,05 M pH 7,5. O perfil protéico foi monitorado a 280 nm. As frações protéicas eluídas com tampão de equilíbrio em volumes de 1,5 mL, foram submetidas ao ensaio *in vitro* para detecção da atividade anti-papainásica, revelando a presença de três grupos de inibidores, denominados de FI1, FI2 e FI3. As frações correspondentes a cada grupo de inibidor, devido o baixo rendimento cromatográfico, foram reunidas a partir de várias corridas cromatográficas e precipitadas com sulfato de amônio em saturação de 0-90%. Após diálise em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, essas frações foram submetidas a ensaio de atividade anti-papainásica, permitindo assim, identificar o percentual de inibição sobre a atividade da papaína. Como resultado desse procedimento, foi observado maior atividade inibitória da fração FI3 (68% de inibição) do que nas frações FI1 e FI2 (30% e 43%, respectivamente) (**Figura 33**).

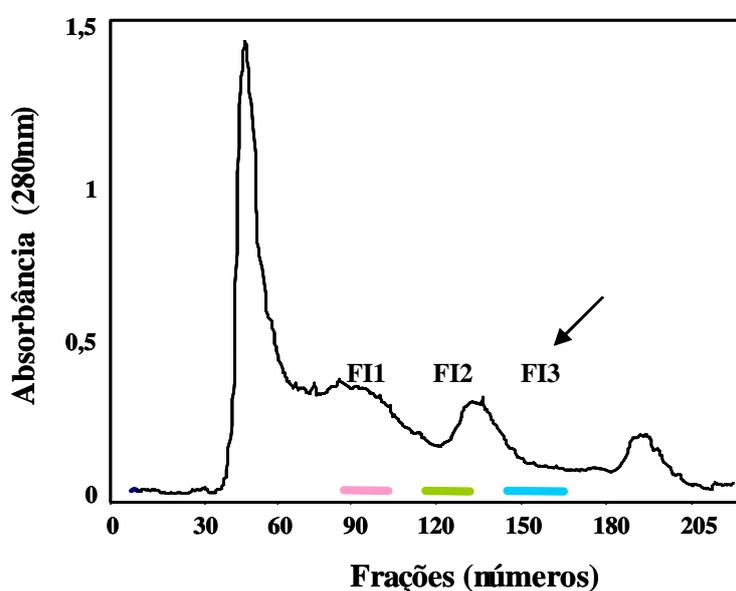


Figura 32: Perfil de eluição de F30-60 em cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200. As frações protéicas foram eluídas com tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 e lidas a 280 nm (1,5 mL, volume de cada fração eluída). FI1, FI2 e FI3, representam os três grupos de inibidores que foram detectados através dos ensaios de atividade anti-papainásica.

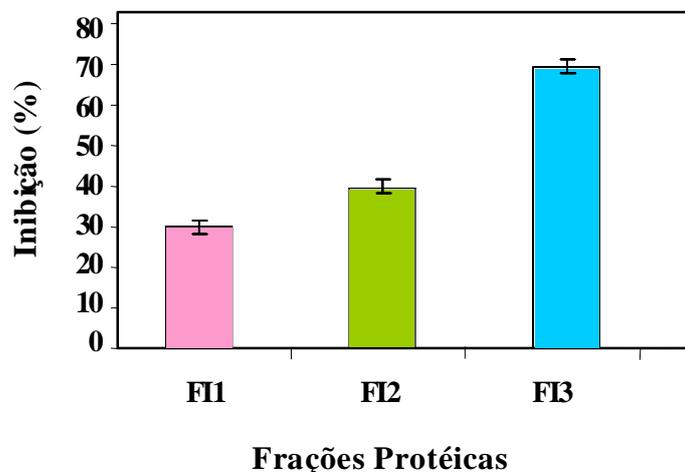


Figura 33: Percentual da atividade anti-papainásica das frações FI1, FI2 e FI3. Essas frações correspondem aos três grupos de inibidores, ativos para papaína, obtidos da cromatografia de exclusão molecular em Sephacryl S-200.

4.1.3-Cromatografia líquida de alta pressão em Vydac C18

A fração FI3, com alta atividade inibitória, proveniente da cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-200, foi submetida à cromatografia líquida de alta pressão (Vydac C18), equilibrada com a solução A em um fluxo de 1,0 mL/min. As proteínas foram eluídas com um gradiente de 0-100% de acetonitrila em 0,1% de TFA (solução B) e o perfil cromatográfico foi monitorado a 216 nm. O perfil de eluição da fração FI3, parcialmente purificado, revelou a presença de inúmeros picos protéicos que foram identificados em ordem alfabética de A até G (**Figura 34**). Os picos protéicos foram ensaiados contra papaína como descrito no item 3.2.7 e apenas o pico G, denominado de fração G ou inibidor Pj, mostrou atividade inibitória para a papaína, apresentando 99% de inibição, sendo, então, inicialmente caracterizado como um inibidor de proteinase cisteínica. O inibidor Pj foi, posteriormente, utilizado para as análises inibitórias contra enzimas de várias fontes (**Tabela 05**).

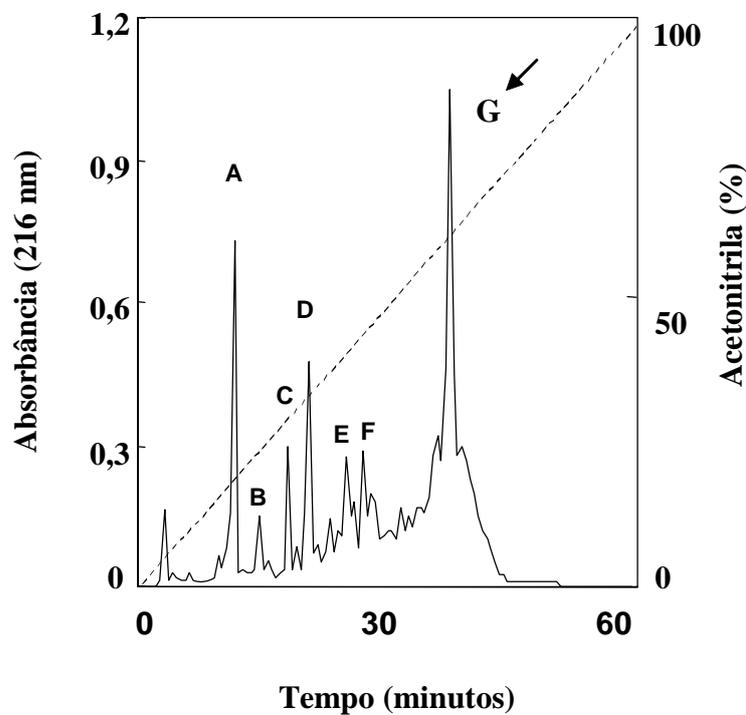


Figura 34: Perfil de eluição de FI3 em coluna líquida de alta pressão (Vydac C18). A fração G, contendo o inibidor ativo para papaína, foi eluída com cerca de 65% de acetonitrila sob fluxo de 1 mL/min.

Para a elaboração de uma tabela de purificação (**Tabela 04**), as frações obtidas nas etapas de isolamento: ExB, fração F30-60, fração FI3 e a fração G, foram testadas especificamente contra papaína. A **tabela 04** mostra o teor de proteínas, atividade anti-papainásica total, atividade específica, o rendimento e o grau de purificação das frações.

Observou-se que os métodos empregados para o isolamento do inibidor de proteinase do tipo kunitz, ativo contra a papaína, de sementes de algaroba proporcionaram um grau de purificação satisfatório, tendo em vista a obtenção do rendimento dessa proteína em 2,9%, grau de purificação de 95 vezes e ausência de contaminantes.

Tabela 04: Purificação do inibidor tipo kunitz ativo contra proteinases cisteínicas

Frações	Atividade inibitória total	Proteína total (mg)	Atividade específica (UI/mg proteína)	Purificação (X)	Rendimento (%)
ExB	88800	1634,40	54,33	1	100
F30-60	28200	10	2820	52	31,7
FI3	12427	3,23	3847,40	71	14
Inibidor Pj (G)	2580,9	0,50	5161,72	95	2,9

Uma unidade de inibidor foi definida como a quantidade de inibidor que diminui a atividade da enzima em 0,01 da absorvância a 440nm.

4.2-ANÁLISE DA MASSA MOLECULAR DO INIBIDOR POR ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM SDS (SDS-PAGE) E MALDI-TOF

A **figura 35A** mostra o perfil eletroforético do extrato bruto (ExB-18µg de proteína); F30-60 (22 µg de proteínas); fração FI3 obtida da cromatografia de exclusão molecular Sephacryl S-200 (21,6 µg de proteínas) e fração G ou inibidor Pj (20µg de proteínas), obtida da cromatografia líquida de alta pressão Vydac C-18. A análise eletroforética do ExB e da fração F30-60, revelou a presença de bandas com massa molecular que variam de 15.000 a 68.000 Da. Na fração protéica FI3 constatou-se a presença de várias bandas protéicas de massa molecular entre 20.000 Da e 50.000 Da, sendo a de 20.000 Da a mais abundante. Para o inibidor Pj observou-se uma banda protéica de massa molecular de aproximadamente 20.000 Da. Similar resultado foi observado quando o inibidor Pj foi analisado por espectrometria de massa (MALDI-TOF), onde foi visualizado uma massa molecular de 19.276 Da e uma de 38.573 Da, correspondendo ao monômero e ao dímero, respectivamente (**Figura 35B**).

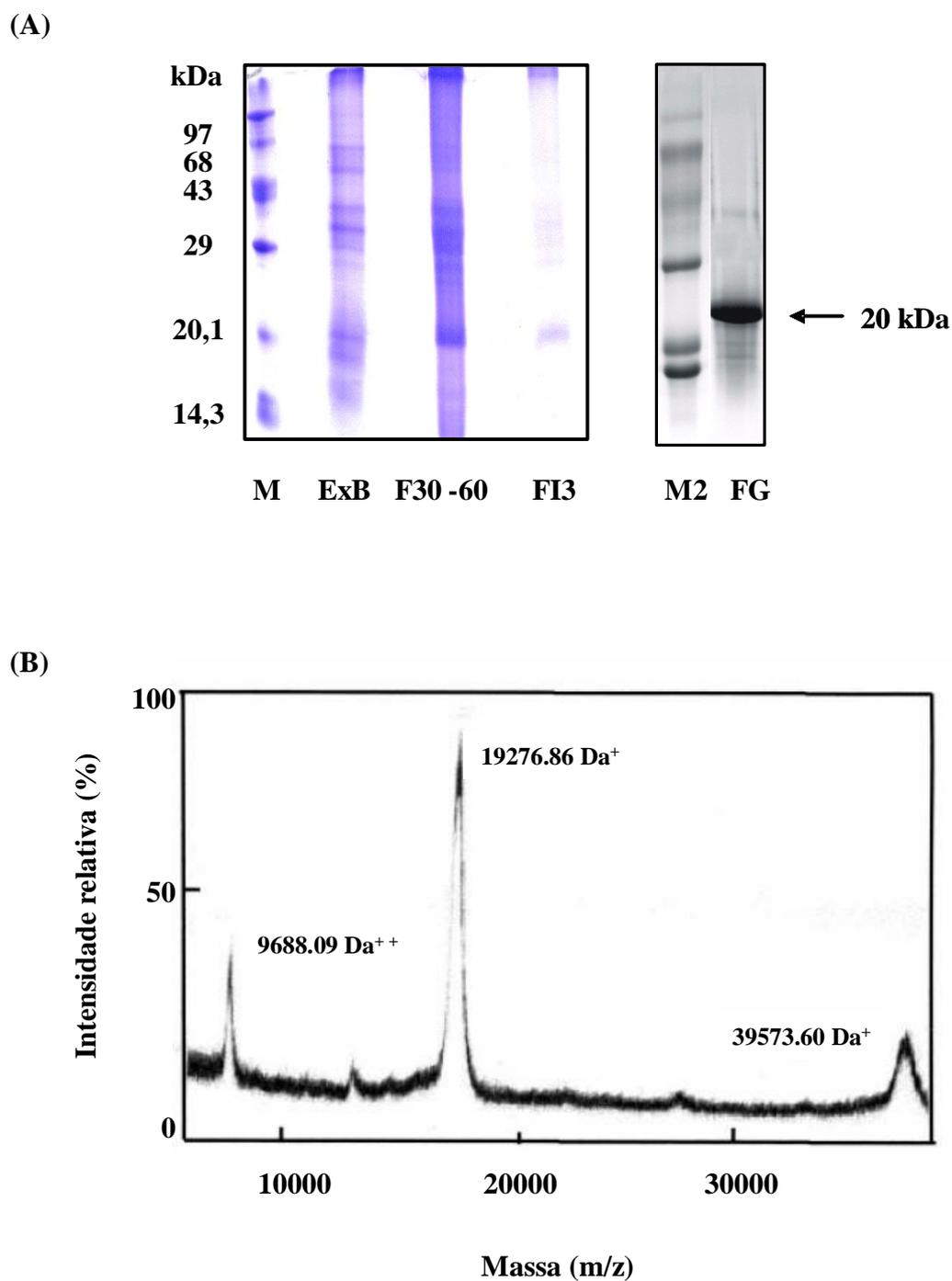


Figura 35: (A) Análise eletroforética das frações obtidas nos vários passos de purificação do inibidor de proteinase cisteínica de sementes de algaroba. **M**-Marcador de massa molecular. **ExB**-Extrato bruto. **F30-60**-Fração protéica obtida do fracionamento com sulfato de amônio. **FI3**-Fração protéica proveniente da Sephacryl S-200; e **FG (inibidor Pj)**-Fração protéica eluída da Vydac C18. (B) Espectrometria de massa (MALDI-TOF) do inibidor Pj.

4.3-ANÁLISE DO SEQUENCIAMENTO DO N-TERMINAL DO INIBIDOR Pj

Através do seqüenciamento protéico do inibidor Pj foi identificado 22 resíduos de aminoácidos. Esta seqüência quando depositada no banco de dados, mostrou homologia com várias seqüências protéicas de inibidores de proteinases da família Kunitz (**Tabela 05**). O maior percentual de identidade do inibidor Pj foi notado em relação ao inibidor de *Adenantha pavonina*, apresentando 88% de identidade e ao inibidor de *Acacia confusa*, com 86% de identidade. Um menor percentual foi observado em relação ao inibidor de *Albizzia julibrissin* e *Glicine Max*, com 69 e 57% de identidade, respectivamente.

Tabela 05: Seqüência de aminoácidos da extremidade N-terminal do inibidor Pj em comparação com outros inibidores de proteinases vegetais tipo Kunitz

Espécies	Seqüência N-terminal	Identidade
<i>P. juliflora</i>	SDR-CKDLGISIDEENN-RRL-V	100%
<i>A. pavonina</i>	LE-CKDLGISIDDDMN-RRLAV	88%
<i>A. confusa</i>	DDESCDLGISIDDENN-RRLVV	86%
<i>A. julibrissin</i>	KDDHCKDLGSIDDDE	69%
<i>G. max</i>	DDKCGDIGISIDHDDGTRRLV	57%

4.4-ATIVIDADE INIBITÓRIA DO INIBIDOR Pj PARA VÁRIAS PROTEINASES

O inibidor purificado Pj foi ensaiado contra a atividade de diferentes proteinases presentes nos insetos *C. maculatus*, *M. mimosae*, *Z. subfasciatus*, *A. obtectus* e no nematóide *M. javanica*. O inibidor pj também foi testado contra a atividade da tripaina e quimotripsina (**Tabela 06**), já que alguns inibidores tipo cistatina possuem atividade inibitória contra proteinases serínicas, e pelo fato de que o inibidor Pj, segundo o seqüenciamento é um inibidor do tipo kunitz. Os resultados revelaram que o inibidor Pj apresenta alto nível de inibição contra a atividade proteolítica das proteinases cisteínicas de *A. obtectus* e de *C. maculatus* com 76,3 e 72% de inibição, respectivamente. Os resultados também mostraram que o inibidor Pj inibiu moderadamente a atividade proteolítica das proteinases digestivas de *M. mimosae*, com 42% de inibição, assim como apresentou baixa atividade inibitória contra a

atividade das proteinases digestivas de *Z. subfasciatus*, com apenas 19,1% de inibição. No entanto nenhum efeito inibitório significativo foi observado contra as proteinases de *M. javanica* e contra as proteinases serínicas.

Segundo Ojima e colaboradores (1997), o inibidor de proteinase cisteínica, purificado de cultura de células da cenoura, foi considerado um fraco inibidor contra a tripsina, mesmo com um percentual de inibição equivalente a 30%, mas nenhuma inibição foi detectada contra a quimotripsina. Pernas e colaboradores (1998) consideraram efetiva a atuação da cistatina purificada de sementes de castanha, *C. sativa*, contra a tripsina, onde apenas 15% de inibição foi detectado.

Nossos resultados sugerem que, embora o inibidor Pj seja caracterizado pela sua seqüência como um inibidor do tipo Kunitz, inibidor que atua preferencialmente sobre as proteinases do tipo serínicas, podemos dizer que o inibidor Pj se trata de um típico inibidor de proteinase cisteínica.

Tabela 06: Atividade inibitória do inibidor Pj contra diferentes proteinases

Enzimas	% de inibição
Papaína	99,0 ± 0,70
Tripsina	4,2 ± 0,42
Quimotripsina	5,6 ± 1,75
AoP	76,2 ± 1,90
CmP	72,0 ± 1,71
MmP	42,0 ± 1,24
ZsP	19,1 ± 1,83
MjP	2,5 ± 0,28

Ensaio contra papaína, tripsina, quimotripsina, nematóide *M. javanica* (MjP), e proteinases dos bruquídeos *A. obtectus* (AoP), *C. maculatus* (CmP), *M. mimosae* (MmP) e *Z. subfasciatus* (ZsP). Os valores da tabela representam as médias dos percentuais de inibição ± desvio padrão dos resultados obtidas nos ensaios *in vitro* de atividade inibitória realizados em triplicata.

4.5-ENSAIO DA ATIVIDADE ANTI-PAPAINÁSICA EM GEL DE POLIACRILAMIDA

A eletroforese em gel de poliacrilamida contendo 0,1% de gelatina foi feita seguindo a metodologia descrita por Michaud e colaboradores (1993), com algumas modificações. Por meio deste método foi possível visualizar a atividade proteolítica da papaína caracterizada como uma área clara em contraste com o azul do gel corado com *ccomassie brilliant blue*. Neste ensaio, devido às pequenas quantidades do inibidor (Pj), obtido no passo final de purificação, a fração FI3 foi utilizada como fonte de inibidor. Como resultado, na **figura 36A**, foi observado na linha 1 (controle) a atividade proteolítica da papaína, e na linha 2 (R1) e na linha 3 (R2), onde a papaína foi tratada com a fração FI3, a atividade da papaína também foi visualizada, mais em menor intensidade, devido a ação inibitória do inibidor sobre a atividade da papaína.

Outro ensaio foi feito em gel de poliacrilamida na ausência de gelatina (**Figura 36B**) para testar a atividade do inibidor contra a papaína. A fração FI3 também foi utilizada neste experimento como fonte de inibidor. No gel teste (III), contendo 45 µg da fração FI3, tratado com papaína, foi visualizado uma única banda protéica de aproximadamente 20.000 Da, correspondente a mesma massa molecular apresentada pelo inibidor Pj (fração G) purificado da coluna Vydac C18 e visualizada no SDS-PAGE (**Figura 35A**).

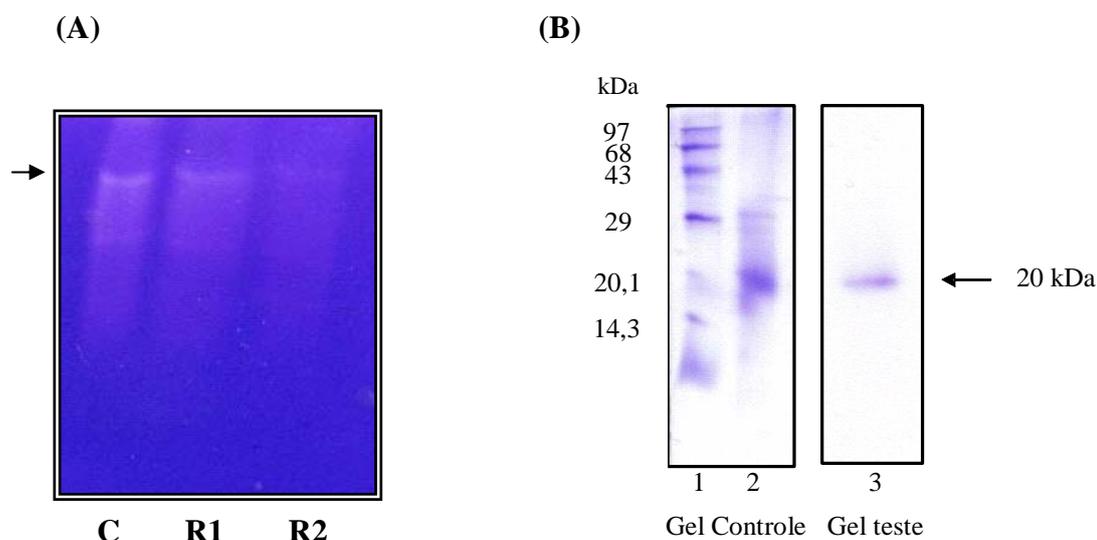


Figura 36: (A) Ensaio inibitório do inibidor Pj em gel de poliacrilamida contendo gelatina a 0,1%. **C (controle positivo)**; **R1**-2,5 µg de papaína + 40 µg de FI3; **R2**-2,5 µg de papaína + 56 µg de FI3. (B) Ensaio inibitório do inibidor Pj em gel de poliacrilamida sem gelatina. **Gel controle:1**-marcador de massa molecular; **2**-10 µg de FI3. **Gel teste: 3**-22 µg de FI3. A seta indica a banda protéica de 20.000 Da correspondente ao inibidor Pj.

4.6-MECANISMO DE INIBIÇÃO DO INIBIDOR Pj

Para a determinação do mecanismo de inibição do inibidor Pj contra a papaína, os dados cinéticos de inibição foram analisados pelo gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk (**Figura 37**). A análise do gráfico revelou um mecanismo de inibição do tipo não-competitivo, caracterizado pela inalteração do valor de K_m e diminuição da $V_{máx}$, quando comparada com a reação na ausência do inibidor. Este resultado não se assemelha com os resultados revelados por Barrett (1987) que se referiu aos inibidores de proteinases cisteínicas como inibidores competitivos. No entanto, trabalhos posteriores, feitos com cistatina de arroz e de milho (Abe *et al.*, 1994), cistatina de soja (Zhao *et al.*, 1996) e cistatina isolada da castanha (Pernas *et al.*, 1998) apresentaram um perfil de inibição do tipo não-competitiva quando ensaiados contra a papaína.

A determinação da constante de inibição do inibidor Pj (**Figura 38**), foi realizada pelo Método de Dixon e colaboradores (1979), utilizando os dados obtidos com o gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk. O valor de K_i encontrado para o inibidor Pj foi de $0,59 \times 10^{-9}$.

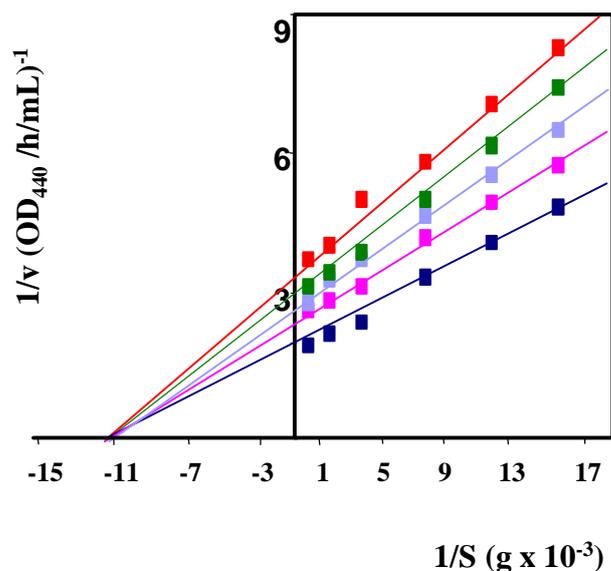


Figura 37: Inibição da atividade da papaína pelo Inibidor Pj. Dados da cinética de inibição foram ilustrados pelo gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk. A atividade inibitória de Pj foi determinada usando várias concentrações de azocaseína como substrato. (■) Controle (ausência de Pj); (■) 24 µg de Pj; (■) 72 µg de Pj; (■) 96 µg de Pj e (■) 120 µg de Pj.

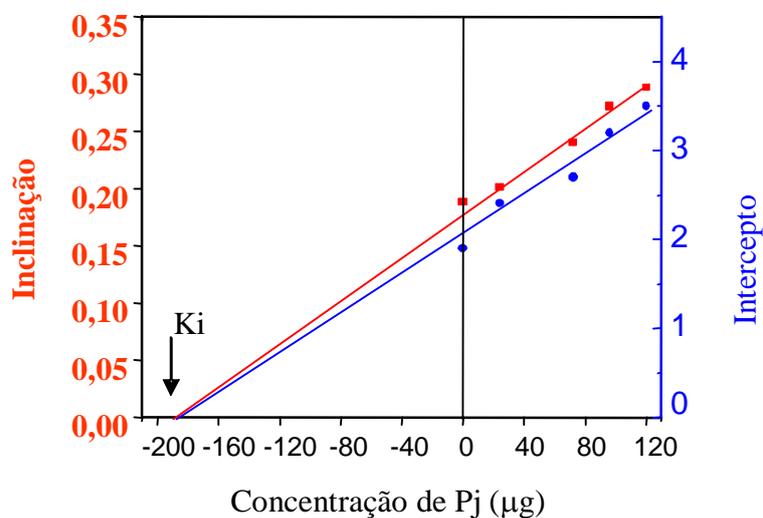


Figura 38: Determinação do valor de K_i do inibidor Pj contra a papaína. Para determinar a constante de inibição de Pj sobre a papaína foi utilizado como controle positivo a papaína incubada com concentrações crescentes de soluções de azocaseína a 1% (0,062 mg; 0,084 mg; 0,126 mg; 0,25 mg; 0,5 mg e 1,5 mg) na ausência do inibidor. Para análise da fração inibidora (Pj), alíquotas de 20 µL; 60 µL; 80 µL e 100 µL da fração foram incubadas com 30 µL de solução de papaína e 200 µL das soluções de azocaseína (0,062 mg; 0,084 mg; 0,126 mg; 0,25 mg; 0,5 mg e 1,5 mg).

4-DISCUSSÃO

Com o avanço da engenharia genética, voltada para o desenvolvimento de plantas resistentes ao ataque de insetos-praga e patógenos, os inibidores protéicos vêm sendo propostos como um dos fatores a serem utilizados para a obtenção de plantas geneticamente modificadas (Gatehouse e Gatehouse, 1998; Ussuf *et al.*, 2001; Carlini e Grossi de Sá, 2002; Lawrence e Koundal, 2002).

Para a seleção destes inibidores, estudos detalhados vêm sendo desenvolvidos levando em consideração, principalmente, a fisiologia e a bioquímica de sua digestão pelo inseto. Sendo assim, diferentes inibidores protéicos, encontrados em diferentes espécies de planta, são amplamente estudados em relação ao seu efeito inibitório sobre as proteinases intestinais de insetos (Ishimoto *et al.*, 1996; Grossi de Sa *et al.*, 1997; Da Silva *et al.*, 2000; Franco *et al.*, 2000; Valencia *et al.*, 2000), bem como pelo seu potencial em reduzir a fecundidade e o peso, aumentar a mortalidade e causar várias deformações no inseto (Kuroda *et al.*, 1996; De Leo e Gallerani, 2002; Elden, 2000; Telang *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2003; Franco *et al.*, 2004; Srinivasan *et al.*, 2005).

Os inibidores protéicos e outros compostos envolvidos no mecanismo de defesa estão, naturalmente, presentes nas plantas. Diante disto, é esperado que estas proteínas, independente de sua origem, desempenhe sua função biológica em resposta ao ataque do inseto alvo na planta geneticamente modificada tornando-a resistente.

No entanto, questionam-se como alguns insetos-praga, são capazes de infestar as plantas tornando-se dominantes. Em alguns casos, estes compostos estão presentes em acessos selvagens em altos níveis, quando domesticados, estes acessos, perdem ou reduzem a capacidade de sintetizá-los (Hilder *et al.*, 1987). Um exemplo deste processo é a proteína arcelina, uma família de proteínas com propriedades inseticidas, encontrada apenas em acessos selvagens de feijão comum *P. vulgaris* (Orborn *et al.*, 1988; Cardona *te al.*, 1990). Outro fato importante é a co-evolução dos insetos e plantas, explicada pela teoria de Erlich e Raven (1964), o qual sugere que a produção e o acúmulo de uma toxina pela planta são seguidos por uma resposta do predador. Esta resposta pode está relacionada a estratégias desenvolvidas pelos insetos, que incluem a metabolização e o seqüestro de compostos tóxicos (Scott e Wen, 2001; Nishida, 2002), mecanismo de fuga (Zangerl, 1990) e alteração nos padrões de expressão gênica (Silva *et al.*, 2001).

Durante a evolução, plantas e insetos desenvolveram mecanismos ecológicos, fisiológicos e bioquímicos para diminuir os efeitos negativos desta interação. Com ênfase aos inibidores protéicos, as plantas desenvolveram mecanismos extraordinários contra as proteinases dos insetos, tais como, o aumento da atividade destes inibidores nos tecidos (Rakwal *et al.*, 2001), a síntese de uma gama enorme de inibidores que possuem atividade contra várias enzimas (Christeller *et al.*, 1998), a produção de inibidores bifuncionais que atuam contra amilases e proteinases (Roy e Gupta, 2000), a expressão de inibidores altamente específicos para as enzimas dos insetos (Falco *et al.*, 2001) e a síntese de inibidores resistentes à proteólise e ativos sob várias condições de pH do trato digestivo de insetos (Christeller *et al.*, 1998). Em contrapartida, os insetos desenvolveram maneiras de superar os efeitos negativos causados pelos inibidores protéicos presentes em suas plantas hospedeiras. Estas incluem o aumento da atividade das enzimas do trato digestivo e a síntese de enzimas menos sensíveis (Paulillo *et al.*, 2000), a modificação do espectro ou atividade relativa de várias hidrolases digestivas (Patankar *et al.*, 2001), a quebra de inibidores via proteinases (Girar *et al.*, 1998) e a diminuição da sensibilidade das enzimas aos inibidores (Brito *et al.*, 2001) via formação de oligômeros de alto peso molecular insensível aos inibidores protéicos.

Patankar e colaboradores (2001) mostraram que lagartas de *H. armigera* eram capazes de superar os efeitos de vários PI de plantas hospedeiras alterando a composição das enzimas do trato digestivo após a ingestão destes PI. O mesmo foi observado para *Agrotis ipsilon*, *H. zea* (Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001a, b) e *H. virescens* (Brito *et al.*, 2001). Mazumdar-Leighton e Broadway (2001a) mostraram que insetos da ordem Lepidoptera apresentavam tripsinas constitutivas e tripsinas induzidas após a ingestão de PI que eram insensíveis aos inibidores. Resultados semelhantes foram descritos para as quimotripsinas (Mazumdar-Leighton e Broadway, 2001b) e para as α -amilases (Silva *et al.*, 2001).

Diante deste quadro, surge a necessidade de selecionar novas proteínas com ação inseticida com alta afinidade e desenvolver novos mecanismos para driblar a capacidade adaptativa dos insetos. Estudos enfatizando a introdução de múltiplos genes relacionados à defesa na mesma planta também vêm sendo aplicados como uma nova estratégia, sendo assim, é preciso conhecer a proteína a ser introduzida, seu papel fisiológico e modo de ação, que são etapas imprescindíveis nesse processo.

Estudos relacionados às propriedades de interação proteína-proteína são indispensáveis (Richardson, 1991; Da Silva *et al.*, 2000, Clemente *et al.*, 2004, Weder e Hinker, 2004), onde a descoberta de novos resíduos responsáveis pela interação específica,

entre inibidor e enzima, além de ajudar a desvendar algo novo, abre novos horizontes para o desenho de inibidores altamente específicos, mostrando ser um passo eficiente e seguro no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas.

5-CONCLUSÃO

Neste trabalho selecionamos dois inibidores de sementes de *P. coccineus* com atividade inibitória sobre as proteinases digestivas da broca-do-café. A identificação e a avaliação da especificidade *in vitro* do inibidor de α -amilase (α AI-Pc1) e do inibidor de proteinase serínica PcBBI1, foi um passo inicial muito importante, que contribuiu para selecionar inibidores com potencial a ser utilizado na produção de café transgênicos que confira resistência a broca-do-café. No entanto, alguns estudos mais aprofundados são necessários.

O trabalho direcionado para a seleção de inibidores de proteinase proveniente de sementes de algaroba (*P. juliflora*) mostrou que o inibidor de proteinase cisteínico tem grande potencial de uso para o melhoramento de plantas de feijão através da engenharia genética.

6-PESPECTIVA

Os próximos passos a serem dados:

- A purificação do inibidor α AI-Pc1 das sementes de plantas de fumo transgênico para que possam ser feitos os experimentos de estrutura e análises bioquímicas mais detalhadas envolvendo a interação do inibidor com a α -amilase da broca-do-café;
- Clonagem do gene que codifica para o inibidor de Bowman-Birk das sementes de *P. coccineus*;
- Validação destas duas moléculas sobre as pragas alvos por meio de bioensaio;
- Utilização dos genes destas proteínas na obtenção de plantas de café geneticamente modificadas, visando obter plantas resistentes ao inseto-praga estudado, a broca-do-café.

7-REFERÊNCIAS

- Abe, J. I.; Sidenius, U.; Svendsen, B. Arginine is essential for the amylase inhibitory activity of the amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. **Biochemical Journal**, v.293, p.151-155, 1993.
- Abe, K.; Emori, Y.; Kondo, H.; Arai, S.; Suzuki, K. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (oryzacystatin) – Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, n.35, p.16793-16797, 1987.
- Abe, M.; Abe, K.; Iwabuchi, K.; Domoto, C.; Arai, S. Corn cystatin I expressed in *Escherichia coli*: investigation of its inhibitory profile and occurrence in corn kernels. **Journal of Biochemistry**, v.116, n.3, p.488-492, 1994.
- Abe, M.; Abe, K.; Kudora, M.; Arai, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as novel cystatin superfamily member of plant origin. **European Journal of Biochemistry**, v.209, p.933-937, 1992.
- Abe, M.; Arai, S. Some properties of a cysteine proteinase inhibitors from corn endosperm. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.55, n.9, p.2417-2418, 1991.
- Abe, M.; Whitaker, J. R. Purification and characterization of a cysteine proteinase inhibitor from the endosperm of corn. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.52, p.1583, 1988.
- Abrahamson, M.; Ritonja, A.; Brown, M. A.; Grubb, A.; Machleidt, W.; Barrett, A. J. Identification of the probable inhibitory reactive sites of the cysteine proteinase inhibitors, human cystatin C, and chicken cystatin. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.9688-9494, 1987.
- Aguiar, A. T. E.; Guerreiro-Filho, O.; Maluf, M. P.; Gallo, P. B.; Fazuoli, L. G. Caracterização de cultivares de *Coffea arabica* mediante utilização de descritores mínimos. **Bragatia**, Campinas, v.63, n.2, p.179-192, 2004.
- Altabella, T.; Chrispeels, M. J. Tobacco plants transformed with the bean α i gene express an inhibitor of insect α -amylase in their seeds. **Plant Physiology**, v.93, p.805-810, 1990.
- Applebaum, S. W. Biochemistry of digestion. In: Kerkut, G. A.; Gilbert, L. I. ed, *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*, New York: **Pergamon Press**, v.4, p.279-311, 1985.

- Aragão, F. J. L.; Barros, L. M. G.; Souza, M. V.; Grossi de Sá, M. F.; Almeida, E. R. P.; Gander, E. F.; Rech, E. L. Expression of a methionine-rich stored albumin from the Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H. B. K. lecytidaceae) in transgenic bean plants (*Phaseolus vulgaris* (L.) fabeacea). **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.3, p.445-449, 1999.
- Arai, S.; Watanabe, H.; Kondo, H.; Emori, Y. Abe, K. Papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a rice seed cysteine proteinase inhibitor, depends on the central Gln-Val-Val-Ala-Gly region conserved among cystatin superfamily members. **Journal of Biochemistry**, v.109, p.294-298, 1991.
- Auerswald, A.; Genenger, G.; Assfalg-Machleidt, I.; Machleidt, W.; Engh, R. A.; Fritz, H. Recombinant chicken egg white cystatin variants of the QLVSQ region. **European Journal of Biochemistry**, v.209, p.837-845, 1992.
- Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D. O.; Seidman, J. G.; Smith, J. A.; Struhl, K. Current protocols. **Molecular Biology Journal**, New York, 1987.
- Baek, J. M.; Kim, S. I. Nucleotide sequence of a cDNAs encoding soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor [PGR93-01], **Plant Physiology**, v.102, p.687, 1993.
- Baek, J. M.; Song, J. C.; Choi, Y. D.; Kim, S. I. Nucleotide sequence homology of a cDNAs encoding soybean Bowman-Birk type proteinase inhibitor and isoinhibitors, **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.58, p.843-846, 1993.
- Baker, P. S. Colombia coffee IPM. **Biocontrol News and Information**, v.20, p.72-73, 1999.
- Baker, P. S.; Jackson, J. A. F.; Murphy, S. T. Natural Enemies, Natural Allies. The Commodities Press, Cali, Colombia, 2002.
- Baldwin, I. T. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. **Plant Physiology**, v.127, n.4, p.1449-58, 2001.
- Barret, A. J. The classes of proteolytic enzymes. In: Dalling, M. J. ed. **Plant Proteolytic Enzymes**. Florida, CRC Press Inc., v.1, p.1-16, 1986.
- Barret, A. J. The cystatins: a new class of peptidase inhibitor. **Trends in Biochemistry Science**, v.12, p.193-196, 1987.
- Baudys, M.; Gosh, M.; Harlos, K.; Mares, M.; Fusek, M.; Kostka, V.; Blake, C. C. F. Crystallization and preliminary crystallographic study of cathepsin D inhibitor from potatoes. **Journal of Molecular Biology**, v.218, p.21-22, 1991.
- Belitz, H.; Grosch, W. Química de los alimentos. Madrid: Acribia, cap 16: leguminosas, p.585-598, 1998.

- Bell, A. A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology**, v.63, p.21-81, 1981.
- Benassi, V. L. R. M. Levantamento dos inimigos naturais da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferr.) (Coleoptera: Scolytidae) no norte do Espírito Santo. **Anais da Sociedade de Entomologia do Brasil**, v.24, n.3, p.635-538, 1995.
- Benassi, V. L. R. M.; Carvalho, C. H. S. Preferência de ataque a frutos de *Coffea arabica* e *C. canephora* pela broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae). **Revista de Agricultura**, v.69, n.1, p.103-111, 1989.
- Bergamin, J. Contribuição para o conhecimento da biologia da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Ipidae). **Arquivo do Instituto Biológico**, São Paulo, v.14, p.31-72, 1943.
- Bernfeld, P. Amylase, α and β . **Methods in Enzymology**, v.1, p.149-158, 1955.
- Billeter, M.; Kline, A. D.; Braun, W.; Huber, R.; Wuthrich, K. Comparison of the high-resolution structures of the alpha-amylase inhibitor tendamistat determined by nuclear magnetic resonance in solution and by X-ray diffraction in single crystals. **Journal of Molecular Biology**, v.206, n.4, p.677-87, 1989.
- Birk, Y. The Bowman-Birk inhibitor. Trypsin- and chymotrypsin-inhibitor from soybeans, **International Journal of Peptide and Protein Research**, v.25, p.113-131, 1985.
- Birkett, M. A.; Campbell, C. A. M.; Chamberlain, K.; Guerrieri, E.; Hick, A. J.; Martin, J. L.; Matthes, M.; Napier, J. A.; Pettersson, J.; Pickett, J. A.; Poppy, G. M.; Pow, E. M.; Pey, B. J.; Smart L. E.; Wadhams, G. H.; Wadhams, L. J.; Woodcock, C. M. New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.97, p.9329-9334, 2000.
- Bloch Jr., C.; Richardson, M. A new family of small (5kDa) proteins inhibitors of insect alpha amylase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor-L- Moench*) have sequence homologies with wheat-alpha-purothionins. **FEBBS Letters**, v.279, n.1, p.101-104, 1991.
- Bloom, H.; Beier, H. S. Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Eletroforeses**, v.8, p.93-99, 1987.
- Bode, W.; Engh, R.; Musil, D.; Thiele, U.; Huber, R.; Karshikov, A.; Brzin, J.; Kos, J.; Turk, V. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken eggs white cystatin and its possible

- mode of interaction with cysteine proteinase. **The EMBO Journal**, v.7, n.8, p.2593-2599, 1988
- Bode, W.; Huber, R. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1477, p. 241-252, 2000.
- Bompard-Gilles, C.; Rousseau, P.; Rougé, P.; Payan, F. Substrate mimicry in the active center of a mammalian α -amylase: structural analysis of an enzyme-inhibitor complex. **Structure**, v. 4, n.12, p.1441-1452, 1996.
- Botella, M. A.; Xu, Y.; Prabha, T. N.; Zhao, Y.; Narasimhan, M. L.; Wilson, K. A.; Nielsen, S. S.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. A. Differential expression of soybean cysteine proteinase inhibitor genes during development and in response to wounding and methyl jasmonate. **Plant Physiology**, v.112, p.1201-1210, 1996.
- Boulter, D. Insect pest by copying nature using genetically engineered crops. **Phytochemistry**, v.34, p.1453-1466, 1993.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- Broadway, R. M.; Duffey, S. S. Plant proteinase inhibitors: mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. **Journal of Insect Physiology**, v.32, p.827-33, 1986.
- Brun, L. O.; Marcillaud, C.; Gaudichon, V.; Scukling, D. Endosulfan resistance in *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) in New Caledonia. **Journal of Economic Entomology**, v.82, p.1311-1316, 1989.
- Campos, J. E.; Whitaker, J. R.; Yip, T. T.; Hutchens, T. W.; Blanco-Labra, A. Unusual structural characteristics and complete amino acid sequence of a protease inhibitor from *Phaseolus acutifolius* seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.42, p.209-214, 2004.
- Cardona, C.; Kornegay, J.; Posso, C. E.; Molares, F.; Ramirez, H. Comparative value of four arcelin variants in the development of dry bean lines resistant to the Mexican bean weevil. **Entomologica Experimentallis Applicata**, v.56, p.197-206. 1990.
- Cardona, C.; Posso, C. E.; Kornegay, J. Valor, J.; Serrano, M. Antibiosis effects of wild dry bean accessions on the Mexican bean weevil and the bean weevil (Coleoptera: Bruchidae). **Journal of Economic Entomology**, v.82, n.1, p.310-315, 1989.

- Carlini, C. R.; Grossi de Sá, M. F. Plant toxic protein with insecticidal properties: A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v.40, n.11, p.1515-1539, 2002.
- Carneiro, R. M. D. G.; Almeida, M. R. A. Distribution of *Meloidogyne* spp. On coffee in Brazil: identification, characterization and intraspecific variability. Mejoramiento sostenible del café Arabica por los recursos genéticos, asistido por los mercados moleculares, com enfasis em la resistencia a los nematodos. Publication Especial CATIE/IRD, p.43-48, 2000.
- Castro, J. M. C.; Campos, V. P.; Naves, R. L. Occurrence of *Meloidogyne paranaensis* in coffee plantations in the Alto Paranaíba region of Minas Gerais, Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.5, p.565-565, 2003.
- Castro, J. M. C.; Campos, V. P.; Dutra, M. R. Occurrence of *Meloidogyne coffeicola* in coffee plantations from Coromandel Country in the region of Alto Paranaíba, Minas Gerais, Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.2, p.227-227, 2004.
- Chalfoun, S. M.; Souza, J. C.; Carvalho, V. D. de. Relação entre a incidência da broca, *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera: Scolytidae) e microorganismos em grãos de café. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras, 11, Londrina, **Anais**, Londrina, p.149-150, 1984.
- Chen, M.; Johnson, B.; Wen, L.; Muthukrisnan, S.; Kramer, K.; Morgan, T.; Eeck, G. Rice cystatin: bacterial expression, purification, cysteine proteinase inhibitory activity and insect growth suppressing activity of a truncated form of the protein. **Protein Expression and Purification**, v.3, p.41-49, 1992a.
- Chen, P.; Rose, J.; Loves, R.; Wei, C. H.; Wang, B. Reactive sites of an anticarcinogenic Bowman-Birk proteinase inhibitor are similar to other trypsin inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n.3, p.1990-1994, 1992.
- Chesin, M.; Zipf, A. E. Alarm systems in higher plants. **The Botanical Review**, v.56, p.193-235, 1990.
- Chrispeels, M. J. Plant physiology has become plant biology, a cross-disciplinary science. **Plant Physiology**, v.112, n.1, p.1-2, 1996.
- Chrispeels, M. J.; Grossi de Sá, M. F.; Higgins, T. J. V. Genetic engineering with α -amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. **Seed Science Research**, v.8, p.257-263, 1998.
- Chrispeels, M. J.; Raikhel, N. V. Lectins, lectin genes and their role in plant defense. **Plant Cell**, v.3, p.1-9, 1991.

- Chrzaszcz, T.; Janicki, J. The inactivation of animal amylase by plant paralyzers and the presence of inactivating substances in solutions of animal amylase. **Biochemistry**, v.28, p.296-304, 1934.
- Coutinho, M. V.; oliveira Neto, O. B. de; Groosi de Sá, M. F. As pragas que atacam o feijão armazenado e os possíveis fatores protéicos envolvidos em sua resistência. Brasília: Embrapa Recurso Genético e Biotecnologia. **Circular Técnica**, n.6, 66p, 2000.
- Crestfield, a. M.; Moore, S.; Stein, W. H. The preparation and enzymatic hydrolysis of S-carboxymethylated proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.238, p.622-627, 1963.
- Da Silva, M. C. M.; Grossi de Sá, M. F.; Chrispeels, M. J.; Togawa, R. C.; Neshich, G. Analysis of structural and physico-chemical parameters involved in the specificity of binding between α -amylase and their inhibitors. **Protein Engineering**, v.13, p.166-177, 2000.
- De Leo, F.; Bonadé-Botino.; M., Ceci, R. L.; Galerani, R.; Jouanin, L. Effects of mustard trypsin inhibitors expressed in different plants on three different lepidopteran pests. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.31, p.593-602, 2001.
- De Muner, L. H.; Martins, D. S.; Fornazier, M. J.; Arleu, R. J.; Benassi, V. L. R. M. Programa de manejo da broca-do-café no Estado do Espírito Santo. EMCAPER (**Documentos**). Vitória/ES, p6, 2000.
- Dean, R.; Kuc, J. Induction systemic protection in concuber. The source of the signal. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, v.28, p.227-233, 1986.
- Dempsey, D. A.; Silva, H.; Klessig, D. F. Engineering disease and pest resistance in plants. **Trends in Microbiology**, v.6, n.2, p.54-61, 1998.
- Dendy, J.; Credland, P. E. development, fecundity and egg dispersion of *Zabrotes subfasciatus*. **Entomology Experimentalis Applicata**, v.59, p.9-17, 191.
- Dixon, M.; Webe, E. C.; Therone, C. J. R.; Tipton, K. F. Inhibition and activation. In Enzymes. **Academic Press**, New York, p.332-381.
- Don-Pedro, K. N. Mode of action of fixed oils against eggs of *Callosobruchus maculatus* (F.) **Pesticide Science, Lanham**, v.26, n.2, p.107-116, 1989.
- Dorizzoto, A.; Abreu, M. S. Reação de plântulas e frutos verdes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) a *Colletotrichum coffeaeum* Noack e *Colletotrichum gloeosporioides*. In: Congresso Brasileiro de Fitopatologia, 26, Aracaju. **Suplementos...** Brasília: SBF, p.285, 1993.

- Duan, X.; Li, X.; Xue, Q.; Abo-El-Saad, M.; Xu, D.; Wu, R. Transgenic rice plants harboring na introduced potato proteinase inhibitor II gene are insect resistant. **Nature Biotechnology**, v.14, p.494-498, 1996.
- Edmonds, H. S.; Gatehouse, L. N.; Hilder, V. A.; Gatehouse, J. A. The inhibitory effects of the cysteine protease inhibitor, oryzacystatin, on digestive proteases on larval survival and development of the southern corn rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*). **Entomology Experimentalis Applicata**, v.78, p.83-94, 1996.
- Espinosa, O. G. Ciclo biológico de *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867), broca del café. In: Congresso de Sanidad Vegetal, Loja, Equador. **Anales...** Loja, Equador, p.8, 1986.
- Falco, M. C.; Silva-Filho, M. C. Expression of soybean proteinase inhibitor in transgenic sugarcane plants: effects on natural defense against *Diatraea saccharalis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.41, p.761-766, 2003.
- Fariori, L. R. D.; Molin, L.; Andrade, E. T.; Cardoso, E. G. Utilização de produtos naturais no controle de *Acanthoscelides obtectus* em feijão armazenado. **Revista Brasileira da Amazônia**, v.20, n.1-2, p.44-48, 1995.
- Fazuoli, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro, In: Rena, A.B.; Malavolta, E.; Rocha, M.; Yamada, T. (ed.). Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: **Patafós**, p.87-106, 1986.
- Feng, G. H.; Richardson, M.; Chen, M. S.; Kramer, K. J.; Morgan, T. D.; Reeck, G. R. α -Amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.26, n.5, p.419-426, 1996.
- Fernandes, K. V. S.; Sabelli, P. A.; Barrett, P.; Richardson, M.; Xavier-Filho, J.; Shewry, R. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetle is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, v.23, p. 215-219, 1993.
- Fernandes-Borrero, O.; Mestre, A. M.; Lopes-Duque, S. Efect de la fertilizacion na la incidencia de la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*) em frutos de café. **Cenicafé**, Caldas, Colômbia, v.7, n.1. p.5-16, 1966.
- Ferre, J.; Van Rie. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. **Annual Review of Entomology**, v. 47, p.501-533, 2002.
- Figueira, E. L. Z.; Hirooka, E. Y.; Mendiola-Olaya, E.; Blanco-Labra, A. Characterization of a hydrophobic amylase inhibitor from corn (*Zea mays*) seeds with activity against amylase

- from *Fusarium verticillioides*. **Biochemistry and Cell Biology**, v.93, n.8, p.917-922, 2003.
- Finardi-Filho, F.; Mirkov, T. E.; Chrispeels, M. J. A putative precursor protein in the evolution of the bean alpha-amylase inhibitor. **Phytochemistry**, v.43, p.57-62, 1996.
- Fordyce, J. A.; Agrawal, A. A. The role of plant trichomes and caterpillar group size on growth and defense of the pipevine swallowtail *Battus philenor*. **Journal of Animal Ecology**, v.70, p.997-1005, 2001.
- Franco, O. L.; Rigden, D. J.; Melo, F. R.; Bloch Jr., C.; Silva, C. P.; Grossi de Sá, M. F. Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry**, v.267, n.8, p. 1466-1473, 2000.
- Franco, O. L.; Rigden, D. J.; Melo, F. R.; Grossi de Sá, M. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: Structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, v.269, p.349-412, 2002.
- Franco, O. L.; Santos, R. C.; Araújo, M. A. M.; Mendes, A. C. M.; Batista, J. A. N.; Monnerat, R. G.; Grossi-de-Sá, M. F. Effects of black-eyed pea trypsin/chymotrypsin inhibitor on proteolytic activity and on development of *Anthonomus grandis*. **Phytochemistry**, v.63, p.343-349, 2003.
- Funk, A.; Weder, J. K.; Belitz, H. D. Primary structure of proteinase inhibitors from *Phaseolus vulgaris*. **Z Lebensn Unters Forsch**, v.196, p.343-350, 1993.
- Gallo, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R. P. L.; Batista, G. C.; Bertifilho, E.; Parra, J. R. P.; Zucchi, R. A.; Alves, S. B. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo: Agronomia Ceres, p.531, 1973.
- Garcia-Casado, G.; Armentia, A.; Sanchez-Monge, R.; Sanchez, L. M.; Lopez-Otin, C.; Salcedo, G. A major baker's asthma allergen from rye flour is considerably more active than its barley counterpart. **FEBS Letters**, v.364, p. 36-40, 1995.
- Garcia-Maroto, F.; Carbonero, P.; Garcia-Olmedo, F. Site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli* of WMAI-1, a wheat monomeric inhibitor of insect alpha amylase. **Plant Molecular Biology**, v.17, p.1005-1011, 1991.
- Gariani, T.; Leatherbarrow, R. J. Stability of protease inhibitors based on the Bowman-Birk reactive site loop to hydrolysis by proteases. **Journal of Peptide Research**, v.49, n.6, p.467-475, 1997.

- Gatehouse, A. M. R.; Hilder, V. A.; Boulter, D. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. **Biotechnology in Agriculture n° 7: Plant Genetic Manipulation for crop protection**, CAB International, p. 155-181, 1992.
- Gatehouse, A. M. R.; Norton, E.; Davison, G. M.; Babbe, S. M.; Newell, C. A.; Gatehouse, J. A. Digestive proteolytic activity in larvae of tomato moth, *Lacanobia oleracea*; effects of plant proteinase inhibitor *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Insect Physiology**, v.45, p.545-558, 1999.
- Godoy, C. V.; Bergamin Filho, A.; Salgado, C. L. Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) In: Kimati, H. *et al* (Ed). **Manual de Fitopatologia**. Piracicaba. ESALQ. v.2, p.184-200, 1997.
- Gottstein, H. D.; Kuc, J. induction of systemic resistance in concuber by phosphates. **Phytopathology**, p.79, 1989.
- Grossi de Sá, M. F.; Chrispeels, M. J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.27, n.4, p.271-281, 1997(b).
- Grossi de Sá, M. F.; Mirkov, T. E.; Ishimoto, M; Colluci, G.; Bateman, K. S.; Chrispeels, M. J. Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor that inhibits the α -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. **Planta**, v.203, p.295-303, 1997(a).
- Grutter, M. G.; Priestle, J. P.; Rahuel, J.; Grossenbacher, H.; Bode, W.; Hofsteenge, J.; Stone, S. R. Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel model of serine proteinase inhibition. **The EMBO Journal**, v.9, p.2361-2365, 1990.
- Gutierrez, B. A.; Schoonhoven, A. van. Proteja su cosecha de frijol contra el ataque de los gorgojos. Palmira: Instituto Colombiano Agropecuario. **Boletim Divulgativo**, n.66, 12p, 1981.
- Hall, J. S.; Harman, G. E. Efficacy of oil treatments of legume seeds for control of *Aspergillus* and *Zabrotes*. **Crop Protection**, Oxford, v.10, p.315-319, 1991.
- Hammond, R. W.; foard, D. E.; Larkins, B. A. Molecular cloning and analysis of a gene coding for the Bowman-Birk protease inhibitor in soybean. **Journal of Biological Chemistry**, v.259, n.15, p.9883-9890, 1984.
- Hilder, V.; Gatehouse, A.; Sheerman, S.; Barker, R.; Boulter, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. **Nature**, v.330, p.160-163, 1987.
- Hohmann, C. L.; Carvalho, S. M. Pragas e seu controle. In: Carvalho, S. M.; Carneiro, R. G.; Mariot, E. J.; Assumpção, L. C.; Júnior, R. P. L.; Pereira, L. R.; Siqueira, D. R. S.;

- Hauagge, r.; Postiglioni, S. R. (eds.). **O feijão no Pará**, Londrina, IAPAR, Circular, v.63, 303p, 1989.
- Horsh, R. B.; Fry, J. E.; Haffman, N. L.; Eicholtz, D.; Rogers, S. G.; Fraley, R. T. A simples and general method for transferring genes into plants. **Science**, v.227, p.1229-1231, 1985.
- Iguti, A. M.; Lajolo, F. M. Occurrence and purification of alpha-amylase iso inhibitors in bean (*Phaseolus vulgaris*) varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.39, p.2131-2136, 1991.
- Infante, F.; Luis, J. H.; Barrera, J. F.; Gomez, J.; Castillo A. Thermal constants for preimaginal development of the parasitoid *Cephalonomia stephanoderis* Betrem (Hymenoptera: Bethyridae). **The Canadian Entomologist**, v.124, p.935-941, 1992.
- Irie, K.; Hosoyama, H.; Takeuchi, T.; Iwabuchi, K.; Watanabe, A. Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitors activity against insect gut proteinases. **Plant Molecular Biology**, v.30, p.149-157, 1996.
- Ishimoto, M.; Kitamura, K. Growth inhibitory effects of an α -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). **Applied Entomology and Zoology**, v.24, p.281-286, 1989.
- Ishimoto, M.; Sato, T., Chrispeels, M. J.; Kitamura, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α -amylase inhibitor of common bean. **Entomology Experimentalis Applicata**, v.79, p.309-315, 1996.
- Johnston, K. A.; Gatehouse, J. A.; Anstee, J. H. Effects of soybean protease inhibitors on the growth and development of larval *Helicoverpa armigera*. **Journal of Insect Physiology**, v.39, p.657-664, 1993.
- Jongsma, M. A.; Bolter, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v.43, p.885-895, 1997.
- Kasahara, K.; Hayashi, K.; Arakawa, T.; Philo, J.; Wen, J.; Hara, S.; Yamaguchi, H. Complete sequence, subunit structure and complexes with pancreatic α -amylase of an α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris*. **Biochemistry Journal**, v.20, p.177-183, 1996.
- Kennedy, A. Chemopreventive agents: protease inhibitors. **Pharmacology and Therapeutics**, v.78, p.167-209, 1998.
- Khush, G. S. Green revolution preparing for the 21st century. **Genome**, v.42, p.646-655, 1999.

- Kiyohara, T.; Yokota, K.; Masaki, O.; Iwasaki, T.; Yoshikawa, M. The amino acid sequence of proteinase inhibitors I-A and I-A' from azuki beans. **Journal of Biochemistry**, v.90, p.721-728, 1981.
- Kliebenstein, D. J.; Gershenzon, J.; Mitchell-Olds, T. Comparative quantitative trait loci mapping of aliphatic, indolic and benzylic glucosinolate production in *Arabidopsis thaliana* leaves and seeds. **Genetics**, v.159, p.359-370, 2001.
- Kneen, E.; Sandsted, R. M. An amylase inhibitor from certain cereals. **Journal of the American Chemical Society**, v.68, p.1247-1252, 1943.
- Koide, T.; Ikenaka, T. Studies on soybean trypsin inhibitors: 3. amino-acid sequence of the carboxyl-terminal region and the complete amino-acid sequence of soybean trypsin inhibitor (Kunitz). **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.32, n.3, p.417-431, 1973.
- Koiwa, H.; Paino, D. M.; Zhu-Salzman, K.; Ibeas, J. I.; Shade, R. E.; Murdock, L. L.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. An in gel assay of a recombinant western corn rootworm (*Diabrotica Virgifera Virgifera*) cysteine proteinase expressed in yeast. **Analytical Biochemistry**, v.282, n.1, p.153-5, 2000.
- Koiwa, H.; Shade, R. E.; Zhu-Salzman, K.; Subramanian, L.; Murdock, L. L.; Nielsen, S. S.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. Phage display selection can differentiate insecticidal activity of soybean cystatine. **The Plant Journal**, v.14, n.3, p.371-379, 1998.
- Koncz, C.; Schell, J. The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. **Molecular and General Genetics**, v.204, p.383-396, 1986.
- Kondo, H.; Abe, K.; Nishimura, I.; Iwatanabe, H.; Emori, Y.; Arai, S. Two distinct cystatin species in rice seeds with different specificities against cysteine proteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v.265, n.26, p.15832-15837, 1990.
- Kondo, H.; Abe, K.; Emori, Y.; Arai, S. Gene organization of oryzacystatin-II, a new cystatin superfamily member of plant origin, is closely related to that of oryzacystatin-I but different from those of animal cystatins. **FEBS Letters**, v.278, p.87-90, 1991.
- Krizaj, I.; Brobnic-Kosorok, M.; Brzin, J.; JERALA, R.; TURK, V. The primary structure of the inhibitor of cysteine proteinase from potato. **FEBS Letters**, v.333, n.1-2, p.15-20, 1993.
- Kunitz, M. Crystallization of a trypsin inhibitor from soybean. **Science**, v.101, p.668-66, 1945.

- La Jolo, F. M.; Finardi-Filho, F.; Menezes, E. W. Amylase inhibitors in *Phaseolus vulgaris* bean. **Food Technology**, p.119-121, 1991.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the ready bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
- Laskowski Jr., M.; Qasim, M. A. What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme substrate complexes? **Biochemica and Biophysica Acta**, v.1477, p.324-337, 2000.
- Laskowsky, M.; Kato, I. Protein Inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, v.49, p.593-626, 1980.
- Lê Berre-Antonon, V.; Nahoum, V.; Payan, F.; Rougé, P. Molecular basis for the specific binding of different amylase inhibitors from *Phaseolus vulgaris* seeds to the active site of amylase. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.38, p.657-665, 2000.
- Lenarcic, B.; Ritonja, A.; Turk, B.; Dolenc, I. D.; Turk, V. Characterization and structure of pineapple stem inhibitor of cysteine proteinase. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v.373, p.454-464, 1992.
- Lim, C. H.; Lee, S. I., Chung, W. S.; Park, S. H.; Hwang, I.; Cho, M. J. Characterization of a cDNA encoding cysteine proteinase inhibitor from Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. Pekinensis) flower buds. **Plant Molecular Biology**, v.30, p.373-379, 1996.
- Llorens, J. M. Homoptera I – Cochinillas de los cítricos y su control biológico. **Pisa Ediciones**. Valencia, Espanha, 260p, 1990.
- Lorini, L. **Manual para o manejo integrado de pragas de grãos armazenados**. Embrapa trigo, 80p, 2001.
- Lu, X. F.; Xia, Y. X.; Pei Y. Roles of plant proteinase inhibitors in the resistance of plant against insect and pathogens. **Progress in Biochemistry and Biophysiology**, v.25, p.328-333, 1998.
- Machleidt, W.; Thiele, U.; Laber, B.; Arsfald-Machleidt, I.; Esterl, A.; Wiegand, G.; Kos, J.; Turk, V.; Bode, W. Mechanism of inhibition of papain by chicken egg white cystatin: Inhibition constants of N-terminally truncated forms and cyanogen bromid fragments of the inhibitor. **FEBS Letters**, v.243, n.2, p.234-238, 1989.
- Maeder, D. L.; Sunde, M.; Botes, D. P. Design and inhibitory properties of synthetic Bowman-Birk loops. **International Journal Peptide and Protein Research**, v.40, n.2, p.97-102, 1992.

- Marshall, J. J.; Lauda, C. M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α -amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Biological Chemistry**, v.250, n.20, p.8030-8037, 1975.
- Matsumoto, I.; Emori, Y.; Abe, K.; Arai, S. Characterization of a gene family encoding cysteine proteinases of *Sitophilus zeamais* (Maize weevil), and analysis of the protein distribution in various tissues including alimentary tract and germ cells. **Journal of Biochemistry**, v.121, p.464-476, 1997.
- McClellan, P.; Chee, P.; Held, B.; Simental, J.; Drong, R. F.; Slightom, J. susceptibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Agrobacterium* infection; transformation of cotyledonary and hypocotyls tissues. **Plant Cell Tissue Organ Culture**, v.23, p.131-138, 1991.
- McGurl, B.; Mukherjee, S.; Kahn, M.; Ryan, C. A. Characterization of two proteinase inhibitor (ATI) cDNAs from alfafa leaves (*Medicago sativa* var. Vernema): the expression of ATI genes in response to wounding and soil microorganisms. **Plant Molecular Biology**, v.27, n.5, p.995-1001, 1995.
- Meins, F. J.; Fritig, B.; Linthorst, H. J. M.; Mikkelsen, J. D.; Neuhaus, J. M.; Ryals, J. Plant chitinase genes. **Plant Molecular Biology**, v.12, p.22-28, 1994.
- Mello, M. O.; Silva-Filho, M. Plant-insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defence mechanisms. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.14, n.2, p.71-81, 2002.
- Melo, F. R.; Sales, M. P.; Silva, L. S.; Franco, O. L.; Bloch Jr., C.; Ary, M. B. α -Amylase from cowpea seeds. **Proteins and Peptide Letters**, v.6, n.6, p.387-392, 1999.
- Michaud, D.; Faye, L.; Yelle, S. Eletrophoretic analysis of plant cysteine and proteinases using gelatine-containing polyacrylamide gels and class-specific proteinase inhibitors. **Eletrophoresis**, v.14, p.451-464, 1996.
- Mirkov, T. E.; Evans, S. V.; Wahlstrom, J.; Gomez, L.; Young, N. M.; Chrispeels, M. J. Location of the active site of the bean α -amylase inhibitor and involvement of a Trp Arg Tyr triad. **Glycobiology**, v.5, p.45-50, 1995.
- Mirkov, T. E.; Wahlstrom, J. M.; Hagiwara, K.; Finardi Filho, F.; Kjemtrup, S.; Chrispeels, M. J. Evolutionary relationship among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin-alpha-amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. **Plant Molecular Biology**, v. 23, p. 1103-1113, 1994.

- Misaka, T.; Koroda, M.; Iwabuchi, K.; Abe, K.; Arai, S. Soyacystatin, a novel cysteine proteinase inhibitor in soybean, is distinct in protein structure and gene organization from other cystatins of animal and plant origin. **European Journal of Biochemistry**, v.240, p.609-614, 1996.
- Mohan-Babu, R.; Sajeena, A.; Seetharaman, K.; Reddy, M. S. advances in genetically engineered (transgenic) plants in pest management – an over view. **Crop Protection**, v.22, p.1071-1086, 2003.
- Moreno, J.; Chrispeels, M. J. A lectin gene encodes the α -amylase inhibitor of the common bean. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.86, p.7885-7889, 1989.
- Morton, R. L.; Schroeder, H. E.; Bateman, K. S.; Chrispeels, M. J.; Armstrong, E.; Higgins, T. J. V. Bean alpha-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, n.8, p.3820-3825, 2000.
- Murashige, T.; Skoog, F. A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.15, p.473-497, 1962.
- Murdock, L. L.; Brookehart, G.; Dunn, P. E.; Foard, D. E.; Kelly, S.; Kitch, L.; Shade, R. E.; Shuckle, R. H. and Wofson, J. L. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.87B, p.783-787, 1987.
- Murdock, L. L.; Shade, R. E.; Pomeroy, M. A. Effects of E-64, a cysteine proteinase inhibitor, on Cowpea weevil growth, development and fecundity. **Environmental Entomology**, v.17, n.3, p.783-787, 1988.
- Murray, G. C; Thompson, W. F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. **Nucleotide Acid Research**, v.8, p.4321-4325, 1980.
- Musser, F. R.; Shelton, A. M. Bt sweet corn and selective insecticides: impacts on pest and predators. **Journal of Economic Entomology**, v.96, n.1, p.71-80, 2003.
- Nakano, O.; Costa, J. D.; Bertoloti, S. G.; Oliveti, C. M. Revisão sobre o conceito de controle químico da broca do café - *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) (Coleoptera, Anobiidae). Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras. **Anais**. Caxambu, MG, p.08-10, 1976.

- Odani, S.; Ikenaka, T. Studies on soybean trypsin inhibitor: VIII–Disulfide bridges soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor. **Journal of Biochemistry**, p 74-78, 1973.
- Odani, S.; Ikenaka, T. Studies on soybean trypsin inhibitor: XIV – Change of the inhibitory activity of Bowman-Birk inhibitor upon replacements of the α -chymotrypsin reactive site serine residue by other amino acids. **Journal of Biochemistry**, v.84, n.1, p.1-9, 1978.
- Odani, S.; Ono, T. Chemical substitutions of the reactive site leucine residue in soybean Bowman-Birk proteinase inhibitor with other amino acids. **Journal of Biochemistry**, v.88, p.1555-1558, 1980.
- Oerke, E. C.; Dehne, H. W.; Schonbeck, F.; Weber, A. Crop production and crop protection: estimated losses in major food and cash crops. Amsterdam, Elsevier Science. 1994.
- Ojima, A.; Shiota, H.; Higashi, K.; Kamada, H.; Shimma; Yoh-ichi; Wada Masata; Satoh, S. Na extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell cultures and seeds of carrot. **Plant Molecular Biology**, v.34, p.99-109, 1997.
- Oliva, M. L. V.; Sampaio, M. U.; Sampaio, C. A. M. Serine- and SH-proteinase inhibitors from *Enterolobium contorsiliquum* Beans. Purification and preliminary characterization. **Brazilian Journal of Medical and Research**, v.20, p.767-770, 1987.
- Oliveira Filho, M. L. Contribuição para o conhecimento da broca-do-café *Stephanoderis hampei* (Ferrari, 1867): modo de comporta-se e ser combatida em São Paulo – Brasil. São Paulo: **Comissão de Estudo e Debelação da Praga Cafeeira**, n.20, p.95, 1927.
- Oliveira, F. J.; Santos, J. H. R.; Alves, J. F.; Paiva, J. B.; Assunção, M. V. Perdas de peso em sementes de cultivares de caupi, atacadas pelo caruncho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.19, n.1, p.47-52, 1984.
- Oliveira, J. V.; Vendramim, J. D. Repelência de óleos essenciais e pós vegetais sobre adultos de *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera: Bruchidae) em sementes de feijoeiro. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, Londrina, v.29, n.3, p.549-555, 1999.
- Oliveira-Neto, O. B.; Batista, J. A. N.; Rigden, D. J.; Franco, O. L.; Falção, R.; Frago, R. R.; Mello, L. V.; dos-Santos, R. C.; Grossi-de-Sá, M. F. Molecular cloning of α -amylases from Cotton boll weevil, *Anthonomus grandis* and structural relations to plants inhibitors: an approach to insect resistance. **Journal of Protein Chemistry**, v.22, n.1, p.77-87, 2003.
- Ormond, J. G. P.; Paula, S. R. L.; Filho, P. F. Café: (RE) conquista dos mercados. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n.10, p.3-56, 1999.

- Orr, G. L.; Strickland, J. A.; Walsh, T. Inhibition of *Diabrotica* larval growth by a multicystatin from potato tubers. **Journal of Insect Physiology**, v.40, n.10, p.893-900, 1994.
- Ortego, F.; Farinós, G. P.; Ruiz, M.; Marco, V.; Castañera, P. (1998) Characterization of digestive proteases in the weevil *Aubeonymus mariaefranciscae* and effect of proteinase inhibitors on larval development and survival. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.88, 265-274.
- Osman, M. A.; Reid, P. M.; Weber, C. W. Terminal inactivation of therapy bean (*Phaseolus acutifolius*), soybean and lima bean proteinase inhibitors: effect of acid and basic pH. **Food chemistry**, v.78, p.419-423, 2002.
- Pedro, M. O. J. N. Utilização de *Beauveria bassiana* no manejo da broca-do-café no Brasil. Workshop Internacional: Manejo da broca-do-café. **Anais**. Londrina-PR, p.21, 2004.
- Pereira, P. J. B.; Lozanov, V.; Patthy, A.; Huber, R.; Bode, W.; Pongor, S.; Strobl, S. Specific inhibition of insect α -amylases: yellow meal worm α -amylase in complex with the *Amaranth* α -amylase inhibitor at 2.0 Å resolution. **Structure**, v.7, p.1079-1088, 1999.
- Pernas, M.; López-Solanilla, E.; Sánchez-Monge, R.; Salcedo, G.; Rodríguez-Palenzuela, P. Antifungal activity of a plant cystatin. **The American Phytopathological Society**, v.12, n.7, p.624-627, 1999.
- Pernas, M.; Sánchez-Monge, R.; Gomes, L.; Salcedo, G. A chestnut seed cystatin differentially effective against cysteine proteinases from closely related pests. **Plant Molecular Biology**, v.138 n.6, p.1235-1242, 1998.
- Pompermayer, P.; Lopes, A. R.; Terra, W. R.; Parra, J. R. P.; Falco, M. C.; Silva, M. C. Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatrea saccharalis*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.99, p.79-85, 2001.
- Portz, R. L.; Furlanetto, C.; Stangarlin, J. R. Levantamento de espécies de nematóides do gênero *Meloidogyne* na cultura do café em municípios do oeste do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, v.25, p.339, 2000.
- Prakash, B.; Selvaraj, S. S.; Murthy, M. R. N.; Sreerama, Y. N.; Rao, D.; Gowda, L. R. Analysis of the amino acid sequences of plant Bowman-Birk inhibitors. **Journal Molecular Evolution**, v.42, 560 p, 1996.

- Pueyo, J. J.; Hunt, D. C.; Chrispeels, M. J. Activation of bean (*Phaseolus vulgaris*) a-amylase inhibitor requires proteolytic processing of the pro-protein. **Plant Physiology**, v.101, p.1341-1348, 1993.
- Purcell, J. P., Greenplate, J. T., Sammons, R. D. Examination of midgut luminal proteinase activities in six economically important insects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.22, n.1, p.41-47, 1992.
- QI, Rui-Feng.; Song, Zhan-Wu; Chi, Cheng-Wu. Structural features and molecular evolution of Bowman-Birk protease inhibitors and their potential application. **Acta Biochemical et Biophysica Sinica**, v.37, n.5, p.283-292, 2005.
- Qian, M. X.; Haser, R.; Payan, F. Structure and molecular-model refinement of pig pancreatic alpha-amylase at 2.1 angstrom resolution. **Journal Molecular Biology**, v.231, p.785-799, 1993.
- Rahbé, Y.; Ferrasson, E.; Rabesona, H.; Quillien, L. Toxicity to the pea aphid *Acysthosiphon pisum* of anti-chymotrypsin isoforms and fragments of Bowman-Birk protease inhibitors from pea seeds. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.33, p. 299-306, 2003.
- Rakwal, R.; Agrawal, G. K.; Jwa, N-S. Characterization of a rice (*Oryza sativa* L.) Bowman-Birk proteinase inhibitor: tight regulated induction in response to cut, jasmonic acid, ethylene and protein phosphatase 2A inhibitors. **Gene**, v.263, p.189-198, 2001.
- Reis, P. R.; Souza, J. C. Pragas do cafeeiro. In: Rena, A. B.; Malavolta, E.; Rocha, M.; Yamada, T. (Ed.). *Cultura do Cafeeiro: fatores que afetam a produtividade*. Piracicaba: **Patofós**, p.323-378, 1986.
- Reis, P. R.; Souza, J. C. Pragas do cafeeiro. **Informe agropecuário**, v.10, n.109, p.41-47, 1984.
- Rele, M. V.; Vartak, H. G.; Jagannathan, V. Proteinase inhibitors from *Vigna unguiculata* subsp. *Cylindrica*. I occurrence of thiol proteinase inhibitors in plants and purification from *Vigna unguiculata* subsp. *Cylindrica*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.204, n.1, p.117-128, 1980.
- Richardson, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors, In: **Methods in Plant Biochemistry**, New York: Acad. Press, v.5, p.295-305, 1991.
- Rigden, D. J.; Monteiro, A. C. S.; Grossi-de-Sá, M. F. **FEBS Letters**, v.504, p.41-44, 2001.
- Ritonja, A.; Krizaj, I.; Mesko, P.; Kopitar, M.; Lucovnik, P.; Strukelj, B.; Pungercar, J.; Buttler, D. J.; Barret, A. J.; Turk, V. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. **FEBS Letters**, v.267, n.1, p.13-5, 1990.

- Rodenburg, K. W.; Varallyay, E.; Svendsen, I.; Svensson, B. Arg-27, Arg-127 and Arg-155 in the α -trefoil protein barley α -amylase/subtilisin inhibitor are interface residues in the complex with barley α -amylase. **Biochemical Journal**, n.309, p.969-976, 1995.
- Rohrmeier, T.; Lehle, L. WIP1, a wound-inducible gene from maize with homology to Bowman-Birk proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**, v.22, n.5, p.783-792, 1993.
- Ryan, C. A. Protease inhibitors in plants: Genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v.28, p.425-440, 1990.
- Ryan, C. A. Protease inhibitors. In: Marcus, A. **The Biochemistry of Plants**, New York, **Academic Press**, v.6, p.351-370, 1991.
- Ryan, C. A.; Walker-Simmons, M. Plant Proteinases. In: Marcus, A. (ed.), **The Biochemistry of Plants**, New York, Academic Press, n.6, p.321-350, 1981.
- Sales, M. P.; Gerhardt, I. R.; Grossi de Sá, M. F.; Xavier Filho, J. Do legume storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**, v.124, p.515-522, 2000.
- Sambrook, E.F. Fritsch; Maniatis, T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed., **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Santanu, B.; Roy, A.; Sampa, D. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homopteran pests is correlated to its insecticidal activity. **Plant Science**, v.161, p.1025-1033, 2001.
- Santino, A.; Daminati, M. E.; Vitale, A.; Bollini, R. The α -amilase inhibitors of bean seeds: two step proteolytic maturation in the protein storage vacuoles of the developing cotyledon. **Physiologia Plantarum**, v.85, p.425-432, 1992.
- Schagger, H.; Von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfare-polyacrylamide gel eletroforesis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. **Analytical Biochemistry**, v. 166, p.368-379, 1987.
- Schoonhoven, A. van.; Cardona, C.; Valor, J. Resistance to the bean weevil and the Mexican bean weevil (Coleoptera: Bruchidae) in non cultivated common bean accessions. **Journal of Economic Entomology**, v.76, n.6, p.1255-1259, 1983.
- Schroeder, H. E.; Gollash, S.; Moore, A.; Tabe, L. M.; Craig, S.; Hardie, D.; Chrispeels, M. J.; Spencer, D.; Higgins, T. J. V. Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil, *Bruchus pisorum*, in genetically engineered peas (*Pisum sativum* L.). **Plant Physiology**, v.107, p.1233-1239, 1995.

- Sgarbieri, V. C.; Whitaker, J. R. Physical, chemical and nutritional properties of common bean (*Phaseolus*) proteins. **Advance Food Research**, Orlando, v.28, n.1, p.93-166, 1982.
- Shade, R. E.; Schroeder, H. E.; Pueyo, J. J.; Tabe, L. M.; Murdock, L. L.; Higgins, T. J. V.; Chrispeels, M. J. Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. **Biotechnology**, v.12, p.793-796, 1994.
- Shewry, P. R.; Lucas, J. A. Plant Proteins that Confer Resistance to Pests and Pathogens. In: Callow, J. (ed.). **Advances in Botanical Research**, n.26, p.136-192, 1997.
- Siddiqi, M. A. Incidence, development and symptoms of *Cercospora* disease of coffee in Malawi. **Transactions of the British Mycological Society**, v. 54, n.3, p.415-421, 1970.
- Silva, C. P.; Terra, W. R.; Grossi-de-Sá, M. F.; Samuel, R. I.; Isejima, E. M.; Bifana, T. D.; Almeida, J. S. Induction of digestive α -amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: bruchidae) in response to ingestion of common bean α -amylase inhibitor 1. **Journal of Insect Physiology**, v.47, n.11, p.1283-2001, 2001.
- Singh, R. R.; Rao, A. G. A. Reductive unfold and oxidative refolding of a Bowman-Birk inhibitor from horsegram seeds (*Dolichos biflorus*): EVIDENCE FOR 'hyperreactive' disulfide bonds and rate-limiting nature of disulfide isomerization in folding. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1597, p.280-291, 2002.
- Sobrinho, C. A.; Viana, F. M. P.; Santos, A. A. Doenças do feijão feijão-de-corda. In: Cardoso, M. J. (Org). **Agricultura do feijão feijão-de-corda no Meio-Norte do Brasil**. Cap.VIII. Teresina: Embrapa Meio-Norte, p.155-183, 2000.
- Solomon, M.; Belenghi, B.; Delledone, M.; Menachem, E.; Levine, A. The involvement of cysteine proteinase and proteinase inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **The Plant Cell**, v.11, p.431-443, 1999.
- Souza, J. C.; Reis, P. R. Broca do café: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle. **EPAMIG**, 40p. (Boletim Técnico nº 50), 1997.
- Souza, J. C.; Reis, P. R.; Rigitano, R. L. O bicho mineiro do cafeeiro: Biologia, danos e manejo integrado. **EPAMIG**, 48p. (Boletim Técnico nº 54), 1998.
- Souza, J. T.; Maximiniano, C.; Campos, V. P. Nematóides parasitos encontrados em cafeeiros em campo e em viveiros de mudas do Estado de Minas Gerais. **Summa Phytopathologia**, v.25, p.180-183, 1999.

- Strobl, S.; Mskos, K.; Betz, M.; Wiegand, G.; Huber, R.; Gomi-Rüth, F. X.; Glockshuber, R. Crystal structure of yellow meal worm α -amylase at 1.64 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v.278, p.616-628, 1998.
- Stubbs, M. T.; Laber, B.; Bode, W.; Huber, R.; Jerala, R.; Lenarcic, B.; Turk, V. The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. **The EMBO Journal**, v.9, p.1939-1947, 1990.
- Suzuki, A.; Tsunogae, Y.; Tanaka, I.; Yamane, T.; Ashida, T.; Norioka, S.; Hara, S.; Ikenaka, T. The structure of a Bowman-Birk type protease inhibitor A-II from peanut (*Arachis hypogaea*) at 3.3 Å resolution. **Journal of Biochemistry**, v.101, p.267-274, 1987.
- Svensson, B.; Fukuda K.; Nielsen, P. K.; Bonsager, B.C. Proteinaceous α -amylase inhibitors. **Biochimica and Biophysica Acta**, v.1696, p.145-146, 2004.
- Tan-Wilson, A L.; Wilson, K. A. Relevance of multiple soybean trypsin inhibitor forms to nutritional quality. In; Friedmen M., (Ed.) **Nutritional and toxicological significance of enzyme inhibitors in plant foods**. New York: Plenum Press, p.391-411, 1986.
- Terra, W. R.; Ferreira, C.; Bianchi, A. G. Action patter, kinetical properties and eletrophoretical studies on an α -amylase present in midgut homogenates from *Rhyncosciara Americana* (Diptera) larvae. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.58B, p.201-209, 1977.
- Tiffin, P.; Gaut, B. S. Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor *Wip1* in *Zea* and related genera. **Molecular Biology Evolution**, v.18, p.2092-2101, 2001.
- Toledo, A.A. Importância econômica da broca-do-café *Hypothenemus hampei* (Ferrari, 1867) no Estado de São Paulo. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.18, p.213-238, 1947/1948.
- Turk, V.; Bode, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases, **FEBS Letters**, v. 285, n.2, p. 213-9, 1991.
- Urwin, P. E.; Atkinson, H. J.; Waller, D. A.; McPherson, M. J. Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy roots confers resistance to *Globodera pallida*. **The Plant Journal**, v.8, n.1, p.121-31, 1995.
- Urwin, P. E.; Lilley, C. J.; McPherson, M. J.; Atkinson, H. J. Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. **The Plant Journal**, v.12, n.2, p.455-61, 1997

- Uvah, I. I.; Ishaya, A. T. Effect of some vegetable Oliz on emergence, oviposition and longevity of the bean weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.). **Tropical Pests Management**, v.45, p.51-59, 1994.
- Valencia, J. A.; Ruiz, S. L.; Gonzales, G. M. T.; Riaño, H. N. M.; Posada, F. F. J. Efecto de inhibidores de proteinases sobre la actividad tripsina y quimotripsina de *Hypothenemus hampei* (Ferreri). **Cenicafé**, v.45, p.51-59, 1994.
- Valencia, J. A.; Bustillo, A. E.; Ossa, G. E.; Chrispeels, M. J. α -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitor. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, p.207-213, 2000.
- Vervilet, G.; Hosters, M.; Teuchy, H.; Montagu, M. van; Schell, J. Characterization of different plaque-forming and defective temperature phages in *Agrobacterium* strains. **Journal of General Virology**, v.26, p.33-48, 1975.
- Vieira, C.; Paula, J. R.; Borém, A. Feijão: aspectos gerais e a cultura no Estado de Minas Gerais. **Viçosa: UFU**, 596p, 1998.
- Voelker, T.; Sturm, A.; Chrispeels, M. J. Differences in expression between two seed lectin alleles obtained from normal and lectin-deficient beans are maintained in transgenic tobacco. **The EMBO Journal**, v.6, p.5371-3577, 1987.
- Waldron, C.; Lynett, M.; Wegrich, P.; Merlo, A. O.; Walsh, T. A. Characterization of a genomic sequence coding for potato multicystatin, an eight-domain cysteine proteinase inhibitor. **Plant Molecular Biology**, v.23, p.801-812, 1993.
- Wato, S.; Kamei, K.; Arakawa, T.; Philo, J.; Wen, J.; Hara, S; Yamaguchi, H. A chimera-like α -amylase inhibitor suggesting the evolution of *Phaseolus vulgaris* α -amylase inhibitor. **Journal of Biochemistry**, v.128, p.139-144, 2000.
- Weber, K.; Osborne, M. The reability of molecular weight determination by sodium dodecil sulfate polyacrilamide gel eletroforesis. **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p.4406-4412, 1969.
- Werner, M. H.; Wemmmer, D. E. 1H assignments and secondary structure determination of the soybean trypsin/chymotrypsin Bowman-Birk inhibitor. **Biochemistry**, v.30, n.42, p.10362, 1991.
- Wijaya, R.; Neumann, G. M.; Condrón, R.; Huches, A. B.; Polya, G. M. Defense protein from seed of *Cassia fistulal* include a lipid transfer protein homologues and a protease inhibitory plant defensin. **Plant Science**, v.159, p.243-255, 2000.

- Wolfson, J. L.; Murdock, L. L. Suppression of larval Colorado potato beetle growth and development by digestive proteinase inhibitors. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v.44, p.235, 1987.
- Xavier-Filho, J. The Biological Roles of Serine and Cysteine Proteinase Inhibitors in Plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.4, n.1, p.1-6, 1992.
- Xu, D. P.; Xue, Q. Z.; Mcelroy D.; Mawal. Y.; Hilder, V. A.; Wu, R. Constitutive expression of a cowpea trypsin-inhibitor gene, CpTI, in transgenic rice plants confers resistance to 2 major rice insect pests. **Molecular Breeding**, v.2, p.167-173, 1996.
- Yamada, T.; Hattori, K., Ishimoto, M. Purification and characterization of two alpha-amylase inhibitors from seeds of therapy bean (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). **Phytochemistry**, v.58, p.59-66, 2001.
- Yamaguchi, H. Isolation and characterization of the subunits of a heat labile a-amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney bean, **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.57, p.297-302, 1993.
- Young, N.M.; Thibault, P.; Watson, D.C.; Chrispeels, M.J. Post-translational processing of two a-amylase inhibitors and an arcelin from the common bean, *Phaseolus vulgaris*. **Febbs Letters**, v.446, p. 203-206, 1999.
- Zambolim, L.; Del Peloso, M. C.; Chave, G. M. Principais doenças do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, v.11, p.64-75, 1985.
- Zhao, Y.; Botella, M. A.; Subramanian, L.; Niu, X., Nielson, S. S.; Bressan, R. A.; Hasegawa, P. M. Two wound inducible soybean cystein proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities then a constitutive homolog. **Plant Physiology**, v.111, p.1299-1306, 1996.