

Universidade de Brasília-UnB  
Instituto de Ciências Biológicas-IB  
Departamento de Biologia Celular  
Pós-Graduação em Biologia Molecular  
Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga – LIMPP

**AS ENZIMAS PRESENTES NO TRATO  
DIGESTIVO DOS INSETOS: Um alvo  
susceptível de inibição**

Arnubio Valencia Jiménez

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Fátima Grossi de Sá

Abril, 2009 – Brasília

Universidade de Brasília-UnB  
Instituto de Ciências Biológicas-IB  
Departamento de Biologia Celular  
Pós-Graduação em Biologia Molecular  
Laboratório de Interação Molecular Planta-Praga – LIMPP

# **AS ENZIMAS PRESENTES NO TRATO DIGESTIVO DOS INSETOS: Um alvo susceptível de inibição**

Arnubio Valencia Jiménez

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Fátima Grossi de Sá

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

Abril, 2009 – Brasília

## BANCA EXAMINADORA

Dr. Osmundo Brilhante Oliveira Neto  
Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho  
Departamento de Biologia Celular  
Universidade de Brasília- UnB

Dr. Octavio Luiz Franco  
Universidade Católica de Brasília.

Dra. Maria Sueli S. Felipe  
Laboratório de Biologia Molecular  
Universidade de Brasília- UnB

Dra. Maria Fátima Grossi de Sá (Orientadora)  
Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

Dra. Maria Cristina Mattar da Silva (Suplente)  
Embrapa - Recursos Genéticos e Biotecnologia

Trabalho realizado no Laboratório de Interação  
Molecular Planta-Praga (LIMPP) da Embrapa–  
Recursos Genéticos e Biotecnologia

Abril, 2009 – Brasília

## AGRADECIMENTOS

- ✓ Agradeço muito à minha orientadora de doutorado Dra. Maria Fátima Grossi de Sá pelo exemplo de liderança e dedicação ao trabalho, pela confiança nas minhas atividades de pesquisa, e pela amizade e carinho que sempre demonstrou dentro e fora do laboratório. O seu apoio foi fundamental no meu crescimento profissional e pessoal.
  
- ✓ Agradeço muito aos meus queridos amigos Simoni Campos Dias e Thales Lima Rocha pelo exemplo de amizade e respeito ao próximo. Eu os considero como grandes amigos a quem respeito muito pela sua enorme competência científica e pela sua constante dedicação à pesquisa. Vocês brilham com luz própria !!!.
  
- ✓ Agradeço muito ao Dr. Osmundo Brilhante Oliveira Neto pela valiosa ajuda subministrada na clonagem parcial do gene das amilases, embora o trabalho ficasse suspenso pela enorme dificuldade na consecução e transporte do material biológico requerido. Eu considero que o Osmundo é um grande pesquisador e colega fiel.
  
- ✓ Agradeço muito a minha querida amiga Fernanda Mulinari pela valiosa ajuda subministrada na revisão da tese, especialmente na procura de erros no português e por me oferecer valiosas sugestões na configuração final da tese.
  
- ✓ Agradeço aos amigos, colegas e colaboradores do laboratório de Interação Molecular Planta-Praga e a todos os professores da Pós-graduação que passaram para mim todos os seus conhecimentos e experiências.

- ✓ Agradeço a todos os integrantes da banca examinadora pelo apoio e dedicação na revisão desta tese.
  
- ✓ Agradeço ao excelente programa de Pós-graduação em Biologia Molecular da UnB por aceitar-me como estudante internacional de doutorado e ter me recebido com carinho e respeito. Para mim é sem dúvida uma grande honra ser um estudante graduado da UnB.
  
- ✓ Agradeço especialmente a minha amada esposa LUZ STELLA e a meus dois adorados e amados filhos JOHN ALEXANDER e LUISA MARIA pela paciência, companhia e apoio constante dentro e fora da Colômbia. A sua permanente companhia é a chave do meu sucesso.
  
- ✓ Agradeço muito a meus pais pelo apoio e imenso amor mostrado durante toda a minha vida.
  
- ✓ Agradeço muito a COLCIENCIAS (COLÔMBIA), LASPAU (USA) e a Universidade de Caldas (Manizales- COLÔMBIA) pelo apoio e confiança oferecidos durante todos estes anos.
  
- ✓ Finalmente, agradeço a DEUS.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABELAS.....	xii
ABREVIATURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
I-CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	1
II – INTRODUÇÃO	
II.i. $\alpha$ -Amilases digestivas de insetos e a sua interação com inibidores específicos.....	3
II.ii.  Inibidores de $\alpha$ -amilase de feijão ( <i>Phaseolus</i> spp.) e <i>Amaranthus</i> spp.....	5
II.iii.  Plantas geneticamente modificadas expressando inibidores de enzimas digestivas de insetos.....	9
II.iv    Café ( <i>Coffea canephora</i> ) e a Broca do Café ( <i>Hypothenemus hampei</i> )	
II.iv.i.  Histórico do Café no Brasil.....	11
II.iv.ii. Importância do café na economia do Brasil e nos países produtores.....	12
II.iv.iii. Produção e áreas de café no Brasil para o ano 2008.....	14
II.iv.iv. Importância do café na economia da Colômbia.....	16
II.iv.v.  Broca do café ( <i>Hypothenemus hampei</i> ).....	18
II.v.    Batata ( <i>Solanum tuberosum</i> ) e a Lagarta da Batata ( <i>Tecia solanivora</i> )	
II.v.i.  Importância da batata na Colômbia.....	22
II.v.ii.  A Lagarta da Batata ( <i>Tecia solanivora</i> ).....	22
II.vi.  A Cana de Açúcar e a Broca Gigante da Cana ( <i>Telchin licus</i> )	
II.vi.i  Importância da cana de açúcar e da broca gigante da cana.....	24

III-	JUSTIFICATIVA.....	27
IV-	OBJETIVOS	
IV.i.	Objetivo Geral.....	28
IV.ii.	Objetivos Específicos.....	28

CAPÍTULO 1 – Atividade biológica de inibidores de  $\alpha$ -amilase presentes em *Phaseolus coccineus* e a digestão proteolítica do inibidor de amilase  $\alpha$ -AI-1

1.1.	Resumo do primeiro capítulo.....	29
1.2.	Materiais e Métodos	
1.2.1.	Insetos e Sementes.....	30
1.2.2.	Procedimentos de extração das proteases do inseto.....	30
1.2.3.	Ensaio de atividade amilase e atividade inibitória de amilase.....	30
1.2.4.	Ensaio de atividade proteolítica.....	31
1.2.5.	Ensaio de digestão proteolítica do inibidor de amilases ( $\alpha$ -AI-1) puro.....	31
1.2.6.	Obtenção dos extratos contendo o inibidor de amilases a partir de sementes de feijão e tabaco.....	32
1.2.7.	Purificação do inibidor de amilases (AI-1).....	32
1.2.8.	Immunoblot dos inibidores de amilase.....	33
1.2.9.	Separação eletroforética e detecção da atividade biológica dos inibidores de amilase ( $\alpha$ -AIs) em géis nativos e de focalização isoeletrica (IEF).....	33
1.2.10.	Efeito da temperatura na atividade biológica do inibidor de amilase.....	34
1.2.11.	Quantificação de proteínas.....	34

1.3.	Resultados e Discussão.	
1.3.1.	Análise do Immunoblot.....	34
1.3.2.	Zimogramas de inibidores de $\alpha$ -amilase em sementes de <i>P. coccineus</i> e em sementes de tabaco transgênico.....	36
1.3.3.	Inibição das $\alpha$ -amilases do pâncreas do porco, salival humana e da broca-do-café, <i>H. hampei</i> .....	39
1.3.4.	Inativação térmica do inibidor de amilases ( $\alpha$ -AI).....	42
1.3.5.	Ensaio de digestão proteolítica do inibidor de amilase ( $\alpha$ -AI-1).....	43
1.4.	Conclusões.....	45

CAPITULO 2 –  $\alpha$ -Amilases presentes no trato digestivo de larvas de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae): resposta ao pH, à temperatura e aos inibidores de amilase de origem vegetal

2.1.	Resumo do segundo capítulo.....	46
2.2.	Materiais e Método	
2.2.1.	Insetos e inibidores vegetais.....	47
2.2.2.	Procedimentos para a extração das amilases do inseto.....	47
2.2.3.	Preparação dos inibidores crus.....	47
2.2.4.	Ensaio da atividade de amilases.....	48
2.2.5.	pH ótimo para a atividade da amilase.....	49
2.2.6.	Estabilidade térmica das $\alpha$ -amilases.....	49
2.2.7.	Separação por eletroforese das diferentes formas moleculares da amilase em géis nativos e por focalização isoeletrica (IEF).....	49



2.3.	Resultados	
2.3.1.	Características das $\alpha$ -amilases intestinais da <i>T. solanivora</i> .....	50
2.3.2.	Efeito do pH e da temperatura na atividade amilase.....	52
2.3.3.	Efeito biológico dos inibidores de $\alpha$ -amilase.....	53
2.4.	Discussão.....	55

CAPITULO 3 - Caracterização parcial de enzimas proteolíticas intestinais de larvas de broca gigante da cana, *Telchin licus* (Drury) (Lepidoptera: Castniidae)

3.1.	Resumo do terceiro Capítulo.....	58
3.2.	Material e Métodos	
3.2.1.	Insetos.....	59
3.2.2.	Obtenção dos extratos intestinais.....	59
3.2.3.	Determinação da concentração de proteínas.....	59
3.2.4.	Ensaio de atividade de quimotripsina.....	59
3.2.5.	Ensaio de atividade de tripsina.....	60
3.2.6.	Ensaio de atividade de leucina-aminopeptidase (LAP).....	60
3.2.7.	Substratos e inibidores de proteases.....	60
3.3.	Resultados e Discussão	
3.3.1.	Atividade de quimotripsina e tripsina.....	61
3.3.2.	Efeito de inibidores de proteases in vitro.....	62
3.3.3.	Atividade de leucina-aminopeptidase (LAP).....	62
V-	CONCLUSAO GERAL.....	66
VI –	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
VI –	ANEXOS.....	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II.iv.iii.	Evolução da produção Brasileira dos último dez anos.....	16
Figura II.iv.iv.	Participação pelo tipo de café no total das exportações de Café da Colômbia no período 2000 – 2008.....	18
Figura II.iv.iv.i	Diferentes estágios de maturação do café.....	20
Figura II.iv.iv.ii.	Países do mundo com presença da broca do café, <i>H. hampei</i> .....	18
Figura II.iv.ii	Danos causados aos tubérculos da batata ( <i>Solanum tuberosum</i> ) pelas larvas da lagarta-da-batata ( <i>Tecia solanivora</i> ).....	23
Figura 1.3.1	Western blotting dos extratos protéicos de diferentes acessões de <i>P. coccineus</i> ; mediante o uso de anticorpos policlonais que foram gerados contra o inibidor de amilases de <i>P. vulgaris</i> $\alpha$ -AI-1.....	35
Figura 1.3.2.1	Separação eletroforética dos inibidores de amilase presentes nas sementes de <i>Phaseolus coccineus</i> e de sementes de tabaco transgênico.....	37
Figura 1.3.2.2	Focalização isoeétrica dos inibidores de amilase presentes em duas cultivares de <i>P. coccineus</i> .....	38
Figura 1.3.3	Efeito de dois extratos crus de proteínas extraídas de sementes de <i>P. coccineus</i> contendo o inibidor de amilases $\alpha$ -AI-Pc, na atividade de amilases de diferentes fontes.....	39
Figura 1.3.4	Ensaio de inativação térmica do inibidor de amilases presente em sementes de <i>P. coccineus</i> em função do tempo de incubação a 80°C.....	43

Figura 1.3.5	Ensaio de digestão proteolítica do inibidor de amilases ( $\alpha$ -AI) proveniente de <i>P. vulgaris</i> , com diferentes concentrações de proteases intestinais de larvas da broca-do-café, <i>H. hampei</i> .....	44
Figura 2.3.1.1	Padrão eletroforético de diferentes isoformas de $\alpha$ -amilase presentes em larvas completas de <i>T. solanivora</i> .....	50
Figura 2.3.1.2	Determinação do ponto isoelétrico (pI) das principais amilases digestivas de <i>T. solanivora</i> .....	51
Figura 2.3.2a	Curva de pH para a atividade de $\alpha$ -amilases provenientes de larvas de <i>T. solanivora</i> .....	52
Figura 2.3.2b	Efeito da temperatura sobre a estabilidade das amilases digestivas de <i>T. solanivora</i> .....	53
Figura 2.3.3.1	Inibição das amilases de <i>T. solanivora</i> na presença do inibidor Obtido de sementes de <i>Amaranthus</i> spp.....	54
Figura 2.3.3.2	Inibição das amilases de <i>T. solanivora</i> na presença do inibidor cru proveniente de sementes de <i>Phaseolus vulgaris</i> cv. Radical e <i>Phaseolus coccineus</i> 35619, em pH 6.0.....	55
Figura 3.3.1	Atividades específicas de quimotripsina e de tripsina endógenas de extratos intestinais de larvas de <i>T. licus</i> .....	62
Figura 3.3.3.1	Atividade leucina-aminopeptidase (LAP) do trato intestinal de larvas de <i>T. licus</i> .....	64
Figura 3.3.3.2	Curva do progresso da absorvância a 590 nm ( $\Delta$ Abs. 590 nm) em função da concentração da enzima leucina-aminopeptidase (LAP) do intestino de larvas de <i>T. licus</i> .....	65

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela II.iv.iii. Café beneficiado. Safra 2008. Previsão de produção.....15

## ABREVIATURAS

$\alpha$ -AI	inibidor de $\alpha$ -amilases
$\alpha$ -AIs	inibidores de $\alpha$ -amilases
$\alpha$ -AI-1	inibidor de $\alpha$ -amilase 1
$\alpha$ -AI-2	inibidor de $\alpha$ -amilase 2
$\alpha$ -AI-Pc	inibidor de amilase das sementes de <i>P. coccineus</i>
BTEE	N-benzoil-tiretil éster
BAEE	N-benzoil-l-arginina etil éster
HSA	amilase da saliva humana
IEF	focalização isoeletrica
kDa	kilodalton
LAP	leucina-aminopeptidase
M	molar
mM	milimolar
nm	nanômetro
PHA	fitohemaglutinina
PI	inibidor de proteinases
PMSF	Phenylmethyl sulphonyl fluoride
PPA	amilase pancreática de porco
ZSA	<i>Zabrotes subfasciatus</i>

## RESUMO

Sementes do feijão (*Phaseolus coccineus*) foram analisadas pela presença e atividade do inibidor de amilase ( $\alpha$ -AI). Por meio do uso de anticorpos policlonais gerados contra o inibidor  $\alpha$ -AI-1 do feijão comum (*P. vulgaris*), foi possível detectar polipeptídios típicos deste inibidor (Mr. 14 – 18 kDa), além do polipeptídeo de 32 kDa. Os resultados encontrados nos testes de inibição permitem sugerir que o inibidor presente nas sementes de *P. coccineus* 35590 seria o melhor candidato para a transformação genética do café visando à geração de plantas com resistência a larvas da broca-do-café. A digestão proteolítica *in vitro* do inibidor puro causou uma perda rápida da sua atividade inibitória, afetando seriamente sua capacidade natural de interagir com as  $\alpha$ -amilases. Também, neste trabalho foram estudadas as propriedades das  $\alpha$ -amilases presentes no trato digestivo de larvas de *Tecia solanivora*, um inseto-praga que gera um dano importante à batata (*Solanum tuberosum*). O inseto tem no mínimo três isoformas principais de  $\alpha$ -amilases digestivas, as quais apresentaram pontos isoelétricos de 5.30, 5.70 e 5.98. A atividade da  $\alpha$ -amilase digestiva tem um pH ótimo entre 7.0 e 10.0, com um pico de atividade em pH 9.0. A enzima foi inibida por inibidores de natureza protéica presentes nas sementes de *P. coccineus* (70% de inibição) e de *P. vulgaris* cv Radical (87% de inibição) em pH 6.0. Os resultados mostram também que o inibidor de  $\alpha$ -amilase de amaranto pode ser o melhor candidato para gerar batatas modificadas geneticamente resistentes a este inseto-praga. Futuras pesquisas precisam ser desenvolvidas para esclarecer se estes inibidores de  $\alpha$ -amilase são resistentes às proteases presentes no trato digestivo da lagarta de batata, *T. solanivora*. Em um ensaio subsequente, foi desenvolvido e testado um novo e sensível método espectrofotométrico para a detecção da atividade leucine aminopeptidase ( $\alpha$ -aminoacyl-peptide hydrolase, EC 3.4.11.1) proveniente do trato digestivo de larvas de *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae), fazendo uso do substrato L-leucyl-2-naphthylamide.

## ABSTRACT

Seeds of scarlet runner bean (*Phaseolus coccineus* L.) were analyzed for  $\alpha$ -amylase inhibitor ( $\alpha$ -AI) activity. By using polyclonal antibodies raised against pure  $\alpha$ -AI-1 from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) it was possible to detect the typical  $\alpha$ -AI polypeptides (Mr 14 -18 kDa) as well as a large polypeptide of Mr 32,000 Da. Differential inhibition curves lead us to suggest that the gene encoding one of the inhibitors in *P. coccineus* (in accession G35590) would be a good candidate for genetic engineering of coffee resistance towards the coffee berry borer *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Scolytidae). An in vitro proteolytic digestion treatment of pure  $\alpha$ -AI-1, resulted in a rapid loss of the inhibitory activity, seriously affecting its natural capacity to interact with mammalian  $\alpha$ -amylases.

In addition, the properties of the digestive  $\alpha$ -amylase from *T. solanivora* larvae, an important insect pest of potato (*Solanum tuberosum*), were studied. This insect has three major digestive  $\alpha$ -amylases with isoelectric points 5.30; 5.70 and 5.98 respectively, which were separated using native and isoelectric focusing gels. The  $\alpha$ -amylase activity has an optimum pH between 7.0 and 10.0 with a peak at pH 9.0. The enzyme was inhibited by proteinaceous inhibitors from *P. coccineus* (70% inhibition) and *P. vulgaris* cv. Radical (87% inhibition) at pH 6.0. The results show that the  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Amaranthus* may be a better candidate to make genetically modified potatoes resistant to this insect. However, it is necessary to know if these  $\alpha$ -amylase inhibitors are resistant to the gut proteases from *T. solanivora*. On the other hand, a simple and sensitive spectrophotometric assay to determine the activity of leucine aminopeptidase ( $\alpha$ -aminoacyl-peptide hydrolase, EC 3.4.11.1) from insect intestinal tracts of *Telchin licus* (Lepidoptera: Castniidae), using L-leucyl-2-naphthylamide as substrate, was developed.

## I. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

As pragas são responsáveis por grandes reduções na produtividade e na qualidade dos principais produtos agrícolas. Além disso, no geral o seu controle requer o uso de grande quantidade de pesticidas, os quais, além de causar danos à saúde humana e ao meio ambiente, elevam substancialmente os custos de produção. Estima-se que as perdas agrícolas causadas pela ação de insetos-praga e patógenos reduziram de 40 a 60% o total de alimentos produzidos em todo o mundo. Dentre estas pragas de importância econômica para a agricultura, encontram-se a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), a lagarta-da-batata (*Tecia solanivora*) e broca gigante da cana de açúcar, *Telchin licus* (Drury) as quais atacam culturas de grande importância econômica no Brasil, na Colômbia e em muitos outros países do mundo.

Os danos ocasionados pelo ataque das larvas da broca-do-café têm ocasionado perdas de até R\$ 40 milhões por ano (De Muner e *et al.* , 2000), como uma consequência direta 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). No caso da *T. solanivora*, o inseto diminui consideravelmente a qualidade da batata e facilita a entrada de microorganismos, os quais causam apodrecimentos secundários, ocasionando perdas de produção que podem chegar a 100 %. Por outro lado, a broca gigante, *T. licus* (Drury), é um dos problemas entomológicos de maior importância na cultura da cana-de-açúcar no Brasil e em vários países da América Central e da América do Sul. As larvas se alimentam de raízes e rizomas dessa planta, afetando severamente a germinação das gemas e a produtividade da cultura. O controle químico desses insetos-praga é dificultado pela sua especial localização natural, dificultando o controle dos diferentes estágios larvais que ficam ocultos dentro dos tecidos vegetais.

Trabalhos anteriores realizados com a broca-do-café sugerem que as amilases digestivas presentes no trato intestinal do inseto podem ser inibidas pela ação de inibidores de amilase de origem vegetal e muito especialmente pela atividade de inibidores de  $\alpha$ -amilase de feijão. A fim de explorar alternativas para o controle destes insetos praga, faz-se necessária a caracterização detalhada da atividade das enzimas digestivas presentes no intestino dos insetos em sua fase larval, visando à avaliação de potenciais inibidores com alta especificidade contra estas enzimas digestivas.

No caso específico da broca gigante da cana, *T. licus* (Drury), espera-se que sistemas complexos de proteólise, envolvendo tanto endoproteases (tripsina e quimotripsina) quanto exopeptidases (leucina-aminopeptidase), devem estar presentes no trato intestinal das larvas. Como o repertório de  $\alpha$ -amilases digestivas da lagarta-da-batata ainda é desconhecido, estudou-se, no presente trabalho, a atividade das  $\alpha$ -amilases endógenas presentes no trato intestinal desse inseto em sua fase larval.



## II - INTRODUÇÃO

### II.i. $\alpha$ -Amilases digestivas de insetos e a sua interação com inibidores específicos

As  $\alpha$ -Amilases ( $\alpha$ -1,4-glucan-4-glucanohydrolases, EC 3.2.1.1) constituem a família das endo-amilases, as quais catalisam a hidrólise das ligações  $\alpha$ -D-(1-4)-glucana no amido, glicogênio e outros carboidratos. As  $\alpha$ -amilases possuem um papel muito importante no metabolismo de carboidratos de microrganismos, plantas e animais. Numerosos insetos, especialmente aqueles que procuram o alimento em sementes ricas em amido, são altamente dependentes da atividade destas enzimas para a sua sobrevivência (Franco *et al.* , 2002). Por exemplo, os lepidópteros e coleópteros, os quais representam um dos principais problemas entomológicos para muitas plantas cultivadas no mundo todo, têm uma dieta rica em polissacarídeos, e dependem da atividade catalítica das  $\alpha$ -amilases digestivas presentes no trato intestinal para digerir e utilizar com eficiência o amido presente nas suas fontes alimentícias (Valencia *et al.* , 2000). As pesquisas envolvidas no estudo da digestão do amido como alvo no controle de insetos-praga têm sido notoriamente incrementadas nos últimos anos, pelo fato do efeito negativo mostrado pelos inibidores de  $\alpha$ -amilase presentes nas sementes de *Phaseolus vulgaris* contra o desenvolvimento larval dos insetos *Callosobruchus maculatus* e *Callosobruchus chinensis* (Ishimoto and Kitamura, 1989; Shade *et al.* , 1994).

A digestão do amido por  $\alpha$ -amilases intestinais de insetos foi demonstrada em estudos anteriores e claramente descrita em diversas espécies de insetos, tais como: *S. granarius* (Silano *et al.* , 1975); *Drosóphila melanogaster* (Doane, 1969); *Prostephanus truncatus* (Mendiola-Olaya *et al.* , 2000); *Tribolium castaneum* (Krishna e Saxena, 1962); *Epiphyas postvittana*, *Planotortrix octo* e *Ctenopseustis obliquana* (Markwick *et al.*, 1996); *Sitophilus orizae* (Yetter *et al.*, 1979); *Callosobruchus maculatus* (Campos *et al.*, 1989); *Tenebrio molitor* (Applebaum, 1964); e *Zabrotes subfasciatus* (Lemos *et al.*, 1990).

A presença de diferentes isoformas de  $\alpha$ -amilases no intestino médio dos insetos tem sido observada em *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, aparentemente em resposta a presença de compostos anti-metabólicos como os inibidores de amilase (Franco *et al.*, 2002). Outros insetos presentes nas sementes de feijão comum também têm a capacidade de modular a concentração de  $\alpha$ -glucosidases e  $\alpha$ -amilases quando crescidos em diferentes dietas (Silva *et al.*, 1999). Embora se conheça a seqüência de várias  $\alpha$ -amilases de insetos (Grossi de Sá e Chrispeels, 1997; Titarenko e Chrispeels, 2000), a única estrutura tridimensional bem determinada de uma amilase digestiva de inseto, corresponde à amilase de *T. molitor*, TMA (Strobl *et al.*, 1998).

TMA é uma enzima muito bem adaptada as condições fisiológicas ligeiramente ácidas presentes no intestino médio dos insetos (Buonocore *et al.*, 1976). Do mesmo jeito que a quase totalidade das amilases digestivas de insetos, TMA contém o íon cálcio ligado ao domínio A da enzima. O íon cálcio é muito importante não somente para a atividade da enzima, mas também para manter a integridade estrutural da proteína (Strobl *et al.*, 1998; Valee *et al.*, 1959). TMA também contém o íon cloro, o qual é capaz de ativar a enzima alostericamente pela sua proximidade com a molécula da água e dar início a digestão do substrato (Mazur *et al.*, 1994). Entretanto, demonstrou-se que, às vezes, a atividade de amilases pode ser comprometida pela presença de inibidores de amilase comumente encontrados em sementes de diversas plantas. Embora o papel fisiológico dos inibidores de  $\alpha$ -amilase nas plantas ficasse desconhecido vinte anos atrás (Gatehouse *et al.*, 1986), hoje há evidências que indicam que eles podem agir como uma reserva protéica nas sementes em que são expressos e participam dos mecanismos de resistência da planta ao ataque de insetos-praga. É importante de se destacar que os inibidores geralmente não afetam a atividade das  $\alpha$ -amilases endógenas, exceto em casos raros.

Sabe-se, também, que os inibidores de  $\alpha$ -amilases, especialmente aqueles isolados dos cereais, apresentam inibição das  $\alpha$ -amilases dos tratos intestinais do inseto (Weselake *et al.*, 1983; Chagolla-López *et al.*, 1994; Grant *et al.*, 1995; Valencia *et al.*, 2000), o que permite supor que os inibidores dessas enzimas digestivas possam desempenhar um papel protetor diante do ataque de insetos predadores, agindo como um efetivo impedimento durante a alimentação (Mendiola-Olaya *et al.*, 2000). Hoje, sabe-se que os inibidores de  $\alpha$ -amilase são altamente específicos para a sua enzima alvo. Conseqüentemente, um inibidor protéico que iniba a atividade de uma  $\alpha$ -amilase pode não ter o mesmo efeito em uma  $\alpha$ -amilase de uma fonte diferente.

Estudos feitos por Chagolla-López e colaboradores (Chagolla-López *et al.*, 1994), mostram que o inibidor de  $\alpha$ -amilase presente nas sementes de *Amaranthus hypocondriacus* inibe fortemente a atividade de  $\alpha$ -amilases das larvas de *Tribolium castaneum* e de *Prostephanus truncatus*, mas não inibe a atividade das  $\alpha$ -amilases de mamíferos. Tendo em vista esta especificidade, a validade das  $\alpha$ -amilases como alvo do controle de insetos é dependente do entendimento claro da expressão das diferentes isoformas da enzima no trato intestinal do inseto (Franco *et al.*, 2002). Além disso, a transformação genética de plantas visando à expressão de inibidores específicos para estas enzimas requer a avaliação e a caracterização detalhada das  $\alpha$ -amilases e outras enzimas digestivas presentes no trato intestinal do inseto, e o estudo do efeito de cada um destes inibidores sobre cada  $\alpha$ -amilase em particular.

## **II.ii. Inibidores de $\alpha$ -amilase de feijão (*Phaseolus* spp.) e *Amaranthus* spp**

É bem conhecido que as sementes de muitas plantas contêm uma variedade grande de inibidores de enzimas, os quais podem estar envolvidos em mecanismos de defesa natural contra insetos e patógenos. Os inibidores de  $\alpha$ -amilases de natureza protéica são comumente

encontrados em microrganismos, plantas e animais (Ryan, 1990; Silano, 1987; Iulek *et al.*, 2000). Inibidores de  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -AIs) foram detectados em diversas espécies de leguminosas e cereais (Reis *et al.*, 1997; Chagolla-Lopez *et al.*, 1994; Piergiovanni *et al.*, 1991; Giri e Kachole, 1996; Ishimoto e Chrispeels, 1996). Por exemplo, os inibidores de  $\alpha$ -amilases estão presentes principalmente em cereais como o trigo *Triticum aestivum* (Franco *et al.*, 2000), cevada *Hordeum vulgareum* (Abe *et al.*, 1993), sorghum *Sorghum bicolor* (Bloch e Richardson, 1991) e do centeio *Secale cereale* (Iulek *et al.*, 2000), mas também em leguminosas, como o guandu *Cajanus cajan* (Giri e Kachole, 1998), feijão *Vigna unguiculata* (Melo *et al.*, 1999) e o feijão comum *P. vulgaris* (Grossi de Sá *et al.*, 1997).

Estes inibidores atuam não somente sobre as  $\alpha$ -amilases presentes na saliva humana e no pâncreas de mamíferos, mas também sobre as  $\alpha$ -amilases que agem no trato intestinal de determinados insetos, tais como bruquídeos e outros insetos-praga que atacam produtos armazenados (Powers e Culbertson, 1983; Ishimoto e Kitamura, 1989; Chen *et al.*, 1992; Pueyo *et al.*, 1995; Ishimoto e Chrispeels, 1996; Chagolla-Lopez *et al.*, 1994; Valencia *et al.*, 2000). Os inibidores de  $\alpha$ -amilase têm mostrado massas moleculares monoméricas de 5 kDa (Bloch e Richardson, 1991), 9 kDa (Melo *et al.*, 1999) e 13 kDa (Feng *et al.*, 1996), massas homodiméricas e heterodiméricas de 26 kDa (Feng *et al.*, 1996) e massas tetraméricas de 50 kDa (Kasahara, 1996). É importante destacar que diferentes inibidores de origem vegetal apresentam diferentes especificidades de ação contra as  $\alpha$ -amilases provenientes de diversas fontes.

A determinação da especificidade de inibição é um passo muito importante para a descoberta de inibidores que poderiam ser úteis para a geração de plantas transgênicas resistentes ao inseto praga. Em alguns casos, os inibidores de  $\alpha$ -amilase podem agir apenas contra uma  $\alpha$ -amilase de mamífero, ou, pelo contrário, apenas contra uma  $\alpha$ -amilase de um inseto. No geral, os inibidores de amilase,  $\alpha$ -AI-2, IAA e alguns outros inibidores têm perfis

de inibição favoráveis, o que poderia ser considerada como uma arma potencial na defesa vegetal. No entanto, em geral, os inibidores de  $\alpha$ -amilase podem inibir numerosas  $\alpha$ -amilases de diversas fontes (Franco *et al.*, 2002) com baixa especificidade de ação. Como proposto na década dos anos 90, os inibidores de  $\alpha$ -amilase podem ser convenientemente classificados pelas suas estruturas terciárias em seis classes: lectin-like, knottin-like, cereal-like, Kunitz-like,  $\gamma$ -purothionin-like e Thaumatin-like (Richardson, 1990). Os inibidores  $\alpha$ -AI-1 e  $\alpha$ -AI-2 pertencem ao grupo de inibidores tipo lectina.

Relatos na literatura mostram que as sementes do feijão *P. coccineus* e outras espécies do mesmo gênero, tais como o feijão comum (*P. vulgaris*) e o feijão tepari (*P. acutifolius*) contêm uma família de proteínas homólogas de defesa que agrupa as fitohemaglutininas (PHA) e os inibidores de  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -AIs) (Chrispeels e Raikhel, 1991, Pereira *et al.*, 2006)). Importante destacar que estas três espécies de *Phaseolus* não são igualmente sensíveis aos bruquídeos, mostrando que as sementes de *P. vulgaris* são mais sensíveis do que as sementes de *P. acutifolius* ao ataque do inseto-praga do feijão, *Acanthoscelides obtectus* (Shade *et al.*, 1987). Os inibidores tipo lectina tem sido purificados e caracterizados a partir de diferentes variedades de feijão (Kasahara, 1996; Marshall e Lauda, 1975). A variante do inibidor de  $\alpha$ -amilase melhor conhecida é o inibidor  $\alpha$ -AI-1, clonado e identificado como um inibidor de  $\alpha$ -amilase homólogo a fitohemaglutinina (PHA) (Moreno e Chrispeels, 1989). Uma segunda variante do inibidor, chamada  $\alpha$ -AI-2, é encontrado em alguns acessos selvagens de feijão (Grossi de Sá *et al.*, 1997).

É claro que os  $\alpha$ -AIs existem em mais de duas isoformas, os quais apresentam alta especificidade de ação contra suas enzimas-alvo (Mirkov *et al.*, 1994; Ishimoto *et al.*, 1995). Por exemplo, o bem caracterizado inibidor de  $\alpha$ -amilases  $\alpha$ -AI-1 proveniente de sementes de feijão comum inibe a atividade de diversas  $\alpha$ -amilases pancreáticas de porco (PPA), de  $\alpha$ -amilases presentes na saliva humana (HSA) e de  $\alpha$ -amilases dos bruquídeos *C. chinensis* e *C.*

*maculatus*, mas não inibe as  $\alpha$ -amilases presentes no trato digestivo de *Z. subfasciatus* (ZSA) (Ishimoto e Kitamura, 1989; Powers e Culbertson 1983; Powers e Whitaker 1977). Entretanto, um inibidor relacionado ( $\alpha$ -AI-2), encontrado em alguns cultivares selvagens de feijão comum provenientes do México, inibe ZSA, mas não inibe PPA (Grossi de Sá *et al.*, 1997).

Uma terceira isoforma,  $\alpha$ -AIL (também conhecido como  $\alpha$ -AI-3), isolado de *P. vulgaris* cv Rico 23 é uma proteína de uma única cadeia protéica completamente inativa contra todas as  $\alpha$ -amilases testadas. Esta proteína pode representar um intermediário evolutivo entre as fitohemaglutininas, as arcelinas e os inibidores de  $\alpha$ -amilase (Finardi-Filho *et al.*, 1996). É importante ressaltar que a formação do complexo enzima-inibidor (EI) para este tipo de inibidores é dependente do pH e da concentração final do inibidor (Valencia-Jimenez *et al.*, 2000).

Por outro lado, o inibidor de  $\alpha$ -amilase presente nas sementes de *Amaranthus hypocondriacus* (IAA) é o menor inibidor de  $\alpha$ -amilases descrito até o momento, com apenas 32 resíduos e três pontes dissulfeto (Chagolla-Lopez *et al.*, 1994). A estrutura do inibidor, como determinada por RMN, revelou semelhança estrutural com outras proteínas, como o inibidor de proteinases encontrado em *Cucubirta maxima* (Bode *et al.*, 1989). O inibidor de  $\alpha$ -amilase de Amarantho (IAA) inibe especificamente  $\alpha$ -amilases de insetos, mas é inativo contra  $\alpha$ -amilases de mamífero (Chagolla-Lopez *et al.*, 1994). Esta especificidade faz do inibidor IAA um excelente candidato na geração de plantas resistentes a insetos praga em culturas economicamente importantes (Franco *et al.*, 2002).

Apesar do fato de que as isoformas do inibidor de  $\alpha$ -amilases de sementes de feijão ( $\alpha$ -AI-1 e  $\alpha$ -AI-2) encontram-se bem caracterizadas, a totalidade e o potencial biológico das diferentes isoformas dos inibidores de  $\alpha$ -amilase presentes nas sementes de *P. coccineus* – aqui denominados de  $\alpha$ -AI-Pc – ainda não foram identificados e caracterizados.

Neste contexto, os inibidores de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AIs) e de proteinases (PI) apresentam grande potencial para serem utilizados no programa de melhoramento genético de plantas. Estas proteínas com efeito inseticida devem ser ingeridas para se tornarem efetivas, sendo o sítio alvo de muitas delas, o sistema digestivo do inseto. Sendo assim, estes inibidores funcionam bloqueando a atividade catalítica das enzimas digestivas dos insetos, formando um complexo estável (EI), no qual a hidrólise dos substratos é limitada e extremamente lenta, gerando sérios problemas no metabolismo do inseto (Tiffin e Gaut, 2001).

Os inibidores também atuam gerando uma deficiência de aminoácidos e de outros compostos metabolicamente importantes, influenciando negativamente o crescimento e desenvolvimento do inseto alvo e podendo eventualmente causar a sua morte devido à inibição das enzimas digestivas ou devido à produção maciça destas enzimas, reduzindo a disponibilidade dos aminoácidos essenciais para a síntese de outras proteínas (Jongsma e Bolter, 1997; Pompermayer *et al.*, 2001). Ao tornarem mais lento o desenvolvimento dos insetos-praga, estes inibidores prolongam o período em que predadores podem ser atraídos para as plantas atacadas, por meio de compostos voláteis liberados por elas, contribuindo de forma indireta para o controle dos insetos (Baldwin, 2001).

O presente trabalho apresenta evidência eletroforética da presença ativa de inibidores de  $\alpha$ -amilase em *P. coccineus* e sua atividade biológica frente a algumas  $\alpha$ -amilases, mas também evidência eletroforética da atividade biológica do inibidor de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AI-1) expresso em sementes de tabaco (*N. tabacum*) e a sua suscetibilidade às proteases endógenas provenientes da broca de café, *H. hampei*.

### **II.iii. Plantas geneticamente modificadas expressando inibidores de enzimas digestivas de insetos**

Plantas modificadas geneticamente, expressando inibidores de enzimas digestivas de insetos, estão sendo utilizadas como uma alternativa ao uso de inseticidas químicos com o

objetivo de gerar plantas com resistência a pragas e patógenos. Neste sentido, a engenharia genética oferece a possibilidade da introdução de genes que podem tornar as plantas menos susceptíveis ao ataque dos insetos. Ênfase vem sendo dada a utilização de genes que codificam para a síntese de inibidores de enzimas digestivas com marcada atividade inseticida, devido a seu poder de reduzir o desenvolvimento do inseto-praga, o então, capaz de afetar seriamente as populações da praga.

O primeiro trabalho mostrando plantas transgênicas expressando inibidores protéicos se deu no ano 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 (*Vigna unguiculata*). Neste trabalho, a expressão do gene de interesse foi controlada pelo gene promotor 35S de expressão constitutiva do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV). As plantas transformantes revelaram níveis de expressão do inibidor CpTI de aproximadamente 1% da proteína total solúvel no tecido das sementes. Este extrato contendo o inibidor foi utilizado para a realização de bioensaios contra larvas de *Heliothis virescens*, mostrando que houve uma diminuição da sobrevivência do inseto e da biomassa total do inseto, além de uma redução de aproximadamente 50% de danos quando comparadas com as plantas controle. Este efeito também foi observado quando o inibidor foi testado contra outros lepidópteros como *Helicoverpa. zea*, *Spodoptera litoralis* e *Manduca sexta*. Este mesmo gene foi transferido para outras culturas como o arroz, demonstrando um aumento significativo da resistência contra as 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 transformadas com genes codificadores de inibidores de proteinases serínicas e inibidores de  $\alpha$ -amilase as quais passaram a apresentar resistência ao ataque da praga (Xu *et al.*, 1996; Morton *et al.*, 2000; Lecardonnell *et al.*, 1999; Irie *et al.*, 1996; Ishimoto *et al.*, 1996; Schroeder *et al.*, 1995; ). A maioria dos genes que codificam para estes inibidores mostrou efeitos deletérios contra coleópteros quando incorporados em dieta artificial (Chen *et al.*, 1992). Os primeiros relatos de plantas transgênicas utilizando inibidores de  $\alpha$ -amilases dizem respeito à produção de ervilhas transgênicas expressando o gene de  $\alpha$ AI-1 em níveis suficientes para tornar as sementes resistentes aos bruquídeos *C.maculatus*, *C. chinensis* e *B. pisorum* (Shade *et al.*, 1994; Chrispeels *et al.*, 1998).



Posteriormente, outros trabalhos demonstraram o efeito inseticida deste mesmo inibidor em plantas de feijão azuki completamente resistente ao caruncho, *C. maculatus* (Ishimoto *et al.*, 1989). Em experimentos ainda mais recentes, Morton e colaboradores (2000), mostraram que ervilhas transgênicas expressando o inibidor de  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ AI-2 mostraram-se menos protegidas ao ataque de caruncho que as ervilhas que possuem o inibidor de  $\alpha$ -amilase,  $\alpha$ AI-1.

#### **II.iv. CAFÉ (*Coffea arábica*) E A BROCA-DO-CAFÉ (*Hypothenemus hampei*).**

##### **II.iv.i. Histórico do café no Brasil**

As primeiras mudas e sementes de café chegaram ao Brasil no século XVIII, por volta de 1730, vindas de países da América Central e de Guiana, mas só a partir do início do século XIX a cultura de café despertou interesse dos grandes proprietários. A cultura de café tornou-se rapidamente a principal atividade agrícola do país, responsável por mais da metade da renda obtida como produto de exportação. Essa importância econômica fez dos produtores de café – melhor conhecidos como “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 o Vale do Paraíba, inicialmente na região fluminense e em seguida, na região paulista e no Sul do estado 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 se estendia do estado de Paraná ao estado de Espírito Santo.

No Brasil, a cafeicultura despontou entre as monoculturas exportadoras, desbancando a cana-de-açúcar e iniciando o ciclo econômico que deu sem dúvida um impulso grande a urbanização e industrialização do país. Nas primeiras cinco décadas do século XX, 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 pelos países produtores. 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.

#### **II.iv.ii. Importância do café na economia do Brasil e nos países produtores.**

O café (*Coffea* spp., Rubiaceae) é considerado como um produto agrícola estratégico para a economia de muitos países da América Latina, Ásia e África. A produção tem sido incrementada nas últimas décadas pelo uso de variedades altamente produtivas, pelo uso de fertilizantes e pelas altas densidades das plantações (Baker *et al.*, 2002). O café é hoje um dos produtos agrícolas de maior valor e dinamismo comercial em muitos países e seu cultivo gera emprego e renda para milhões de pessoas no mundo. O comércio de café no mercado internacional absorve grande parte da produção, pois o consumo ocorre principalmente em países considerados não produtores (com exceção do Brasil, país que ocupa a segunda posição em termos do consumo mundial de café).

As espécies comercialmente relevantes são a arábica e a robusta (ou conilon), as quais apresentam dinâmicas distintas de mercado. O café arábico é o mais cultivado e comercializado mundialmente, considerado um produto de qualidade superior, e de grande aceitação em todos os mercados consumidores. O café da espécie robusta representa cerca de 40% do café produzido mundialmente, possui grande resistência a pragas e menor custo de produção. Porém, é menos valorizada no mercado mundial e utilizada frequentemente na produção de café solúvel e expresso (Ormond *et al.*, 1999; United States-Department of Agriculture/USDA, 2007). Hoje o Brasil é o maior produtor mundial de café, embora sua participação no mercado mundial do produto tenha decrescido significativamente ao longo do século XX. O Vietnã, que é especializado na produção de café robusta, e a Colômbia,

tradicional produtora de café arábica, ocupam, respectivamente, a segunda e a terceira posição em relação à oferta mundial. Outros países importantes no Mercado mundial de café são Indonésia e Índia, no continente asiático, e México e Guatemala, no americano (Fonte: USDA (2007)). O Vietnã destaca-se nesse processo, pois enquanto os outros países mantiveram sua produção e exportação total de café relativamente constante, esse país passou de sexto para segundo maior produtor e exportador mundial. O continente americano atualmente responde pela maior parcela da produção e exportação de café arábica. Em termos de participação no comércio internacional, os países que se destacam são Brasil (42,6%), Colômbia (16,6%), Guatemala (5,6%), Peru (5,3%), Honduras (4,8%), México (4,3%) e Costa Rica (2%)(USDA, 2007).

É importante destacar que nas Américas também estão os dois maiores países consumidores mundiais de café. Em primeiro lugar os Estados Unidos, com consumo médio anual de 20 milhões de sacas, seguido pelo Brasil, com 16,33 milhões de sacas, representando aproximadamente um terço de todo o consumo mundial do produto (Associação Brasileira da Indústria de Café – ABIC, 2007). Por se adaptar facilmente a áreas quentes e de clima úmido, o café robusta é bastante cultivado no continente africano e no sudoeste da Ásia. Na América do Sul, somente o Brasil e o Equador o produzem de modo significativo.

Na Colômbia há preferência pelo cultivo de café Arábico. Na América Central, o México tem aumentado a sua produção, porém de forma ainda pouco significativa (Ormond *et al.*, 1999; Ponte, 2002). Em 2007, conforme dados do USDA (2007), Vietnã, Brasil, Indonésia e Índia, juntos, responderam por cerca de 70% da produção e 78% das exportações de robusta ao mercado internacional. À exceção do Brasil, no qual apenas um terço da produção refere-se à espécie robusta, os demais países são especializados nesse tipo de café. Embora o café arábico seja o mais comercializado, nos últimos anos a demanda por café robusta tem aumentado.

Entre 1995 e 2006, sua produção e exportações cresceram à taxa anual média de 3,4% e 2,1% respectivamente, enquanto as de arábica foram 1,2% e 1,4%. Os preços mais baixos e o aumento de sua utilização pelas companhias processadoras na elaboração de “blends” têm contribuído para as taxas de crescimento maiores do que as de arábica. O cultivo do café, embora não tenha a mesma dimensão de meados do século XX, tem forte influência na economia de muitos dos países que o produzem e tem também importante participação na geração de renda. Na Colômbia e alguns países centro-americanos, é o principal produto de exportação, onde grande parte da produção é realizada em áreas menores que dois hectares e, muitas vezes, em regiões de difícil acesso. Essas características, somadas à ampla diversidade de clima, solo e recursos naturais, fazem com que a produção de café seja organizada de distintas formas, resultando em diversos sistemas produtivos (Verissimo, 2003).

#### **II.iv.iii. Produção e áreas de café no Brasil para o ano 2008.**

Segundo a CONAB, a produção nacional de café para o ano 2008 superou os 45 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado, superior em 35% (11.804 milhões sacas de café beneficiado) à safra do ano 2007 passada (Tabela II.iv.iii.).

**Tabela II.iv.iii. Café Beneficiado Safra 2008. Previsão de produção**

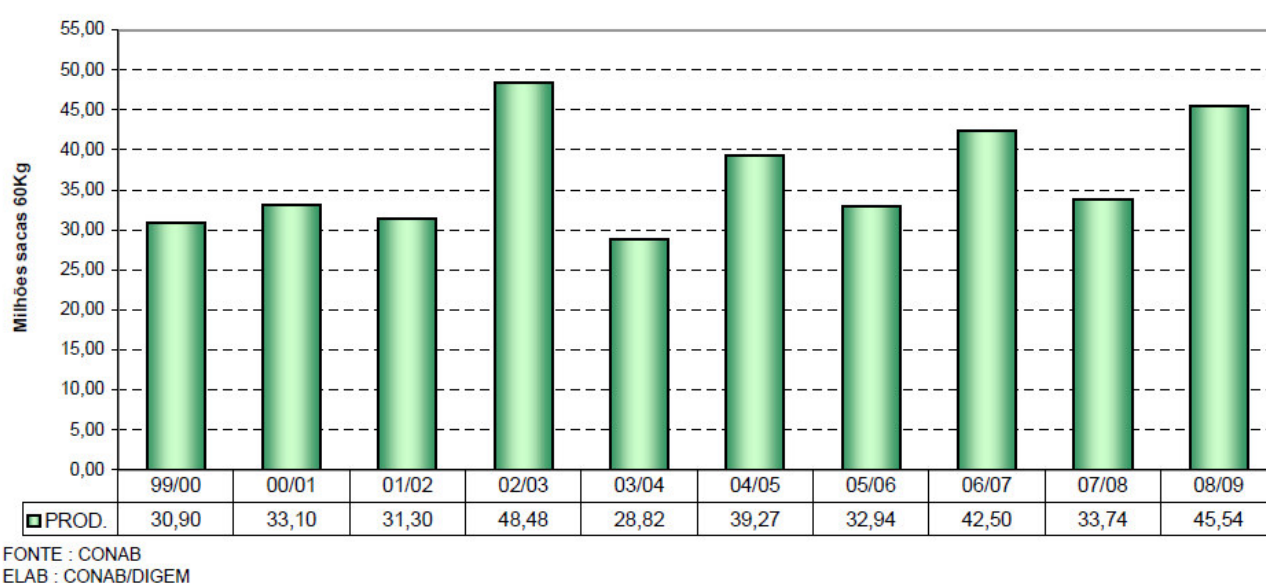
UF/ REGIÃO	PRODUÇÃO (Mil sacas beneficiadas)		
	Arábica	Conilon	Total
<b>Minas Gerais</b>	22.865	35	22.900
Sul e Centro-Oeste	12.054	-	12.054
Cerrado - Triângulo, Alto Paranaíba e Noroeste	4.474	-	4.474
Zona da Mata - Jequitinhonha, Mucuri, Rio Doce, Central e Norte	6.337	35	6.372
<b>Espírito Santo</b>	2.672	7.850	10.522
<b>São Paulo</b>	4.720	-	4.720
<b>Paraná</b>	2.360	-	2.360
<b>Bahia</b>	1.656	612	2.268
<b>Rondônia</b>	-	1.694	1.694
<b>Mato Grosso</b>	13	163	176
<b>Pará</b>	-	233	233
<b>Rio de Janeiro</b>	251	13	264
<b>Outros</b>	163	244	407
<b>BRASIL</b>	<b>34.700</b>	<b>10.844</b>	<b>45.544</b>

CONVÊNIO : MAPA - SPAE / CONAB mai/08

O referido acréscimo deve-se basicamente à recuperação parcial das lavouras com a regularização das chuvas associados aos bons tratamentos culturais nas principais regiões produtoras. Esse incremento poderia ser bem maior se não fosse pela estiagem registrada nas regiões cafeeiras do Brasil. A produção do café arábica representa 76,19% (34.700 mil sacas de café beneficiado) da produção total do país, tendo como maior produtor o Estado de Minas Gerais com 65,89% (22.865 mil sacas de café beneficiados).

O café conilon participa da produção nacional com 23,81% (10.844 mil sacas de café beneficiado). O Estado do Espírito Santo se destaca como o maior produtor dessa variedade com 72,39% (7.850 mil sacas de café beneficiado). A área cultivada com café no Brasil é estimada em cerca de 2,2 milhões de hectares, o que é superior à safra do ano 2008 em 1,08% (24,50 mil hectares).

A área ocupada com café arábica é estimada em 1,748 milhões de hectares, representando 76,37% da área cultivada com café no país. Os 23,64% (541 mil hectares) restantes são de café conilon (Acompanhamento da Safra Brasileira Café Safra 2008, segunda estimativa, maio/2008/ Companhia Nacional de Abastecimento. - Brasília: Conab, 2008). Nos últimos dez anos, o Brasil tem incrementado significativamente a produção total de café, passando de 30,9 milhões de sacas (60 Kg) no ano 2000 até atingir um total de 45,54 milhões de sacas no ano 2008 (Figura II.iv.iii.).



**Figura II.iv.iii.** Evolução da produção Brasileira dos ultimo dez anos.

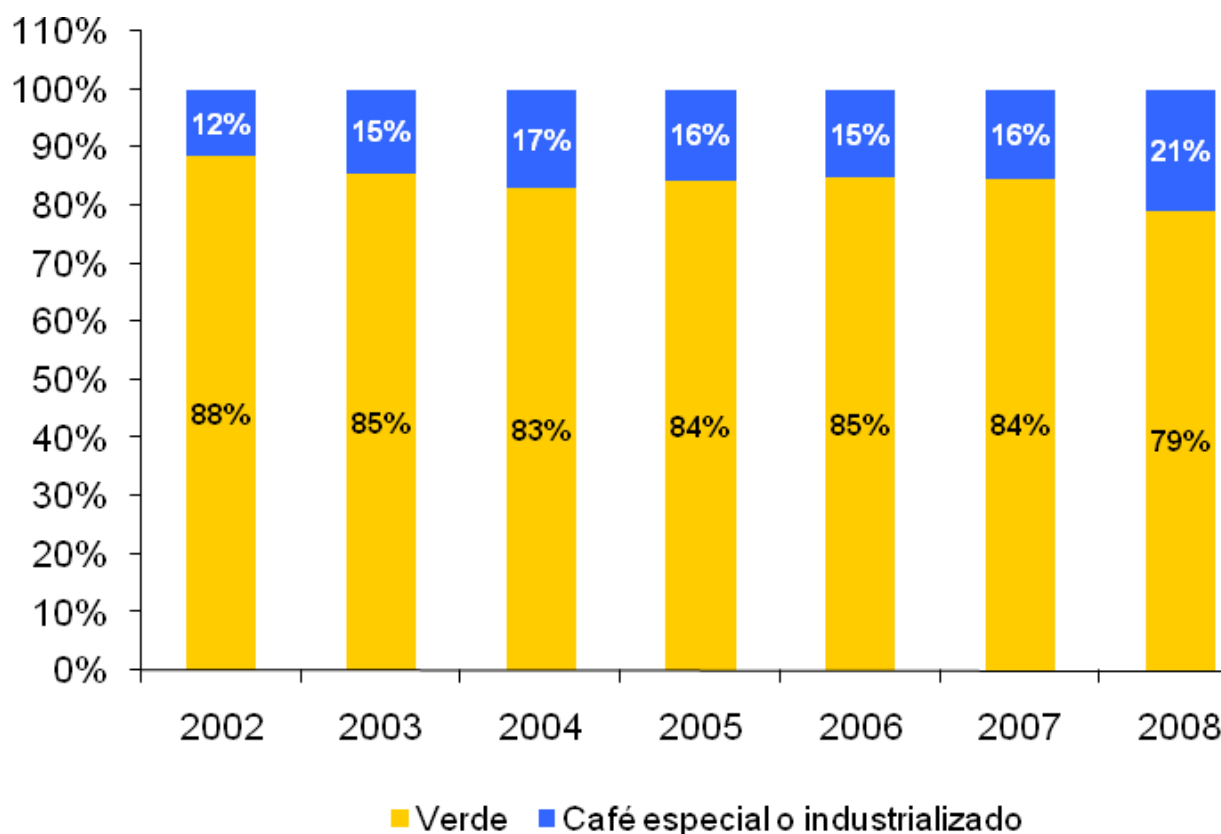
#### **II.iv.iv. Importância do Café na Economia da Colômbia.**

O ano 2008 foi recorde como um dos períodos mais atípicos na cafeicultura da Colômbia. Embora a produção de café tivesse uma queda de 9 %, as exportações do produto só caíram 2 % e em termos de ingressos, o valor da safra alcançou um novo recorde chegando a 1.953 milhões de dólares, nível não visto desde o ano 1997. Nesse mesmo ano, as exportações de café pela Colômbia alcançaram os 11 milhões e 103 mil sacas de 60 Kg, o que representou uma queda de 2%, ou seja, 198 mil sacas a menos vendidas ao exterior, comparado com as exportações do ano 2007.

A queda nas exportações de café da Colômbia foi compensada pelo comportamento dos preços internacionais do café, ainda nos meses nos quais se apresentou uma grande confusão financeira, devido principalmente à queda dos mercados econômicos mundiais. Além disso, a taxa de câmbio contribuiu no segundo semestre do ano e a sua recuperação permitiu melhorar as condições do preço para o cafeicultor. Apesar destas condições, o valor estimado da safra é de 1.953 milhões de dólares.

Também contribuíram o reconhecimento da qualidade do café da Colômbia, pelo qual se pagaram até 0.25 cêntimos de dólar a mais por cada libra de café ofertado na bolsa. Como resultado da política de valor agregado estabelecida pela federação de cafeiteiros da Colômbia desde o ano 2002, as exportações de café industrializado e especiais representaram 21 % dos embarques totais do grão colombiano no ano 2008 (Figura II.iv.iv.).

Esta tendência tem se traduzido em uma diminuição importante das exportações de café verde e tem pressionado o aumento no preço dos cafés de menor qualidade, contribuindo para melhorar o ingresso dos produtores de café na Colômbia (Federação Nacional de Cafeiteiros da Colômbia, 2009).



**Figura II.iv.iv.** Participação pelo tipo de café no total das exportações de Café da Colômbia no período 2000 – 2008.

#### **II.iv.v. Broca do café**

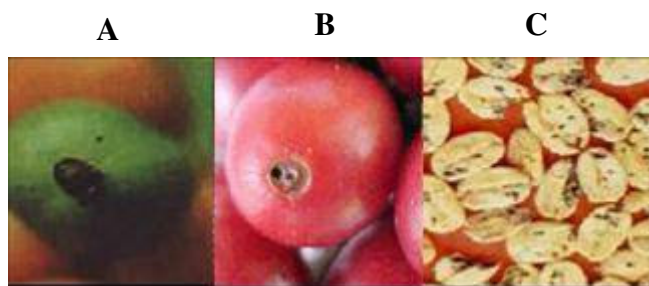
A broca-do-café, *H. hampei*, (Ferrari) (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae), originária da África Equatorial, onde foi referida como praga em 1901 no Congo, foi introduzida na América do Sul em 1913 (Oliveira Filho 1927). Em 1988, chegou à Colômbia, onde tem causado sérios prejuízos (Baker 1985), de forma semelhante ao que ocorre no México (Baker 1984, Klein-Koch *et al.*, 1988).

A broca-do-café foi introduzida no Brasil pelo município de Campinas, Estado de São Paulo, por volta de 1913, em sementes de café importadas da África e de Java (Souza e Reis, 1993). A partir daí, o inseto disseminou-se por todos os Estados produtores de café do país, inclusive Minas Gerais, maior produtor brasileiro da atualidade, causando não só grandes



prejuízos econômicos ao café brasileiro, mais gerando reflexos negativos sobre a economia nacional (Souza e Reis, 1997). A broca-do-café é considerada uma praga monófaga, tendo como hospedeiro somente o cafeeiro, *Coffea* spp.

O inseto ataca os frutos de todas as espécies de café, nos diferentes estágios de maturação (Figura II.iv.v.i); seja verde (chumbinhos), maduro (cerejas) ou seco, podendo inclusive atingir proporções epidêmicas e gerar perdas econômicas bastante significativas (Baker, 1999). O inseto, considerado um dos principais insetos praga do cafeeiro no mundo (Baker, 1999), tem sido encontrado em muitos países produtores do grão no mundo (Figura II.iv.v.ii). O ataque de *H. hampei* tem gerado grandes perdas econômicas e afetado a economia de mais de 20 milhões de famílias rurais no mundo (Vega *et al.*, 2003). Nos últimos anos tem sido reportados níveis de infestação muito elevados em vários países: Uganda 80%, Colômbia 60%, Jamaica 58–85%, Tanzânia 90%, Malásia 50–90% e no México 60% (Vega, 2004).



**Figura II.iv.v.i.** Diferentes estágios de maturação do café: A: verde; B: maduro; e C: secos. As fotos foram retiradas da página (<http://www.agrobyte.com.br/cafe.htm>).



Fonte: J. Jaramillo e colaboradores, 2006

**Figura II.iv.v.ii.** Países do mundo com presença da broca do café, *H. hampei*. Pontos escuros sinalizam os países que possuem a cultura do café atacada pela broca-do-café.

A biologia e a ecologia da broca do café, *H. hampei* têm sido amplamente revisadas por Damon (2000). As fêmeas (1,4-1,6 milímetros) atacam os grãos de café em desenvolvimento oito semanas após a floração até a colheita (> 32 semanas) (Baker, 1999). O dano gerado na cultura do café vai desde a queda dos grãos até graves perdas na qualidade e na quantidade total de grãos que são produzidos na lavoura. Cada fruto é atacado por uma única fêmea adulta, referida como a “fêmea colonizadora”, e a oviposição no interior das galerias ocorre durante um período de 20 dias, estabelecendo-se de dois a três ovos em cada grão de café (Bergamin, 1943). A dinâmica da população e dos padrões de infestação de *H. hampei* estão estreitamente relacionados com fatores climáticos como a precipitação e a umidade relativa do ar (Baker *et al.*, 1992), bem como com a fisiologia da planta de café (Salazar *et al.*, 1993).

No Brasil, *H. hampei* apresenta quatro gerações por ano com o desenvolvimento dos frutos, entre dezembro e maio, mas pode atingir até cinco gerações se o período da colheita for mais longo. Além disso, o ciclo da broca é interrompido pela falta de frutos adequados para oviposição, entre a colheita e o aparecimento de frutos em início de maturação da safra seguinte, quando os adultos presentes se desenvolvem em frutos secos da última colheita (Cure *et al.*, 1998). Essas brocas perfuram grãos verdes ou em estado de chumbinho e ali permanecem, sem ovipositar, até que o fruto atinja o grau de maturidade necessário à oviposição. Os conhecimentos existentes da biologia de *H. hampei* mostram que medidas de controle devem acontecer entre o final de uma safra e o aparecimento dos primeiros frutos em início de maturação da safra seguinte, concentrando o controle nos adultos, antes da oviposição (Baker 1984, Cure *et al.*, 1998).

Visto que o inseto gera enormes prejuízos na cultura de café, novos métodos biotecnológicos de controle genético estão sendo empregados para introduzir genes de diferentes origens que confirmam resistência à broca-do-café. Com este intuito, várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas com os genes *cry*, que codificam toxinas Bt (Sayyed *et al.*, 2000) e genes que codificam inibidores de  $\alpha$ -amilase e proteinases, que vem surgindo como uma ferramenta promissora para o controle desta e outros insetos praga. As pesquisas com os inibidores protéicos vêm sendo desenvolvidas em função dos resultados obtidos por Valencia e colaboradores (1994), ao mostrar a presença da atividade proteolítica da tripsina e quimotripsina no intestino de larvas de *H. hampei*; e por Valencia e colaboradores (2000), ao mostrar a presença da atividade proteolítica da  $\alpha$ -amilase na larva e inseto adulto de *H. hampei*. Como descrito anteriormente, estas proteínas com poder inseticida atuam sobre as enzimas digestivas, causando sérios danos ao desenvolvimento da larva, podendo inclusive ocasionar a sua morte.

## **II.v. BATATA (*Solanum tuberosum*) E A LAGARTA-DA-BATATA (*Tecia solanivora*)**

### **II.v.i Importância da batata na Colômbia**

O cultivo da batata é a principal atividade agrícola das zonas andinas na Colômbia, sendo desenvolvido por cerca de 90.000 famílias. A cultura da batata caracteriza-se pelo uso intensivo de fertilizantes e praguicidas, pela alta demanda de mão-de-obra rural não qualificada, por ser um cultivo isolado e pelo fato de ser realizado por produtores com acesso limitado a tecnologias (Luján, 1970). Atualmente, cultivam-se na Colômbia cerca de 170.000 hectares de batata, segundo estatísticas do Ministério da Agricultura do país. A produção comercial é feita entre 2.000 e 3.500 m de altitude, e a zona de produção ótima é determinada em função da quantidade e da qualidade do produto. Cerca de 90% da produção comercial da batata é feita em terrenos com declives e 10% em solos planos mecanizáveis ([www.cevipapa.org.co](http://www.cevipapa.org.co)).

### **II.v.ii. A lagarta-da-batata (*Tecia solanivora*).**

A lagarta-da-batata *T. solanivora*, tornou-se uma das pragas de maior importância econômica para o cultivo de batatas nas zonas produtoras da Colômbia. Esta praga, originária da América Central, foi registrada na Costa Rica em 1970 e, posteriormente, no Panamá e em Honduras. Na América do Sul, chegou em 1983 por intermédio de uma importação de batatas não certificadas provenientes da Costa Rica, feita pelo governo da Venezuela, com destino às zonas de cultivo no Estado da Táchira (Torres, 1996).

Dois anos depois, constatou-se a presença da lagarta-da-batata na Colômbia, especificamente no município de Chitagá (Norte de Santander), na variedade denominada Atzimba, oriunda do México e trazida da Venezuela. Atualmente, esta praga encontra-se disseminada pelas principais zonas produtoras da Colômbia (Cundinamarca, Boyacá, Antioquia e Norte de Santander) (Rodríguez, 1996).

Esta rápida disseminação geográfica da praga se explica pelo comércio do tubérculo infestado com o inseto, pelo uso contínuo de pacotes contendo diferentes estádios da praga, pela capacidade do inseto de se mover e pelo livre trânsito das sementes entre os países produtores. Atualmente, este inseto é reconhecido como a praga entomológica mais danosa na maioria das zonas produtoras de batata na Colômbia. A lagarta-da-batata é um inseto que ataca o tubérculo, tanto em campo como em armazenamento (Trillos, 1994), sendo o tubérculo da batata o único hospedeiro da lagarta identificado até o momento.

Depois da eclosão dos ovos, os quais ficam na superfície da batata, as larvas geram severos danos econômicos ao penetrar nos tubérculos para se alimentar, formando galerias inicialmente superficiais, que vão tornando-se mais profundas. Desta maneira, o inseto diminui consideravelmente a qualidade da batata e facilita a entrada de microorganismos, principalmente fungos e bactérias, os quais causam apodrecimentos secundários, ocasionando perdas de produção que podem alcançar até 100%. Os tubérculos severamente afetados pela praga não podem ser utilizados para o consumo humano ou animal (Figura II.v.ii.).



**Figura II.v.ii.** Danos causados aos tubérculos da batata (*Solanum tuberosum*) pelas lagartas da-batata (*Tecia solanivora*), ao penetrar nos tubérculos para se alimentar, formando galerias inicialmente superficiais, que vão tornando-se mais profundas.

Sérios danos causados por este inseto têm sido relatados na Colômbia, onde as perdas de peso em tubérculos armazenados atingem até 100% (Botero *et al.*, 1995). O impacto negativo das larvas de *T. solanivora* em tubérculos da batata, tanto na América central como na América do Sul, faz deste inseto um alvo muito importante para o estudo, especialmente se a proposta é a geração de plantas de batata transgênica que expressem inibidores de enzimas digestivas. Porém, é necessário que sejam bem caracterizados, tanto as  $\alpha$ -amilases digestivas presentes no trato intestinal do inseto, como também os inibidores de  $\alpha$ -amilase com potencial para inibir este tipo específico de enzima.

## **II.vi. A CANA-DE-AÇÚCAR E A BROCA GIGANTE DA CANA E DA BANANA (*T. licus*)**

### **II.vi.i. Importância da cana de açúcar e da broca gigante da cana**

A colheita total da safra de cana de açúcar no Brasil em 2008 é a maior da história, estimada em torno de 620 milhões de toneladas, em 7,8 milhões de hectares, o que representa 2,8% da área cultivada do País. Estimulada pela forte expansão do álcool no mercado e pelas perspectivas de crescimento nas exportações, a indústria brasileira vai moer em torno de 569 milhões de toneladas de cana-de-açúcar em 2008, sendo 316 milhões para a fabricação do combustível e 253 milhões de toneladas para o açúcar. Além da quantidade da matéria-prima transformada pela indústria, serão destinadas para outros fins, como sementes e mudas, cachaça, rapadura e alimentação animal, 50 milhões de toneladas de cana. A região centro-sul é responsável por cerca de 90% da produção total de cana. Pela projeção da Conab (2008), o Brasil vai fabricar neste ano em torno de 27 bilhões de litros de álcool. Desses, 4,2 bilhões de litros deverão ser exportados, a maioria (2,5 bilhões de litros) para os Estados Unidos.

A broca gigante cana, *T. licus* é um dos problemas entomológicos de maior importância na cultura da cana na região Nordeste do Brasil, especialmente nos estados de Alagoas, Pernambuco, Paraíba e Rio Grande do Norte. Em Rondônia, está assumindo importância como uma "nova praga" da bananeira, por causar sérios prejuízos às lavouras atacadas. A broca gigante é considerada uma "nova praga" da bananeira porque só recentemente foi verificado um ataque intenso em plantio de bananeira situado no campo Experimental da Embrapa Rondônia, em Porto Velho. Porém, sua primeira ocorrência foi constatada em 1994, em um plantio de cana no Bairro Candelária, também em Porto Velho. Situação semelhante de dano a cana ocorre em vários outros países da América do Sul e da América Central, entre os quais estão Bolívia, Colômbia, Panamá, Trinidad-Tobago e as Guianas (Mendonça, 1996).

A broca gigante da cana é uma lagarta que atinge oito centímetros de comprimento, tamanho muito maior que o observado para a larva da broca-do-rizoma ou do moleque-da-bananeira (*Cosmopolites sordidus*), pragas muito conhecidas da cultura de banana. Outra diferença entre estas pragas é que o adulto da broca-gigante é uma mariposa, enquanto que o da broca-do-rizoma é um besouro. A broca-gigante penetra no pseudocaule da planta em quase toda sua extensão, mais comumente na altura de 1 a 1,5m a partir do solo. Devido ao ciclo de vida longo da lagarta, que pode chegar a 10 meses e ao seu tamanho avantajado, esta praga é capaz de gerar grandes danos no interior do pseudocaule, comprometendo severamente a germinação de gemas e a produtividade da cultura, devido ao tombamento e a posterior morte da bananeira. Nas socarias, as lagartas se alimentam do rizoma e das raízes, reduzindo bastante o poder germinativo.

Nas plantas jovens da cana-de-açúcar, a broca gigante passa do rizoma para os rebentos, causando o secamento e posterior apodrecimento da "olhadura". Em cana adulta, a lagarta perfura os entrenós da base do colmo, justamente os locais mais ricos em sacarose (Esquivel, 1980; Mendonça *et al.*, 1996).

O controle químico desse inseto-praga é dificultado pela sua localização natural, no interior do colmo da cana-de-açúcar, durante quase todo o seu ciclo de desenvolvimento, que é de aproximadamente 120 dias. Em consequência disto, vem sendo realizado o controle mecânico, através da captura de lagartas e crisálidas. Muitas vezes, as mariposas são capturadas com o uso de redes entomológicas (Mendonça, 1996).

A fim de explorar alternativas de controle da broca gigante da cana, faz-se necessário caracterizar em detalhes a atividade das enzimas digestivas presentes no intestino do inseto em sua fase larval, bem como as interações dessas enzimas com inibidores de sua atividade. Como o repertório de enzimas digestivas de *T. licus* é desconhecido, estudou-se no presente trabalho a atividade proteolítica endógena do trato intestinal desse inseto na fase larval. Espera-se que sistemas complexos de proteólise, envolvendo tanto endoproteases (tripsina e quimotripsina) quanto exopeptidases (LAP, leucine aminopeptidase), estejam presentes no trato intestinal de larvas de *T. licus*.



### **III. JUSTIFICATIVA**

Os novos avanços na biotecnologia, especialmente na engenharia genética de plantas, têm proporcionado o estabelecimento de inúmeros processos visando à melhoria das características agronômicas de culturas de interesse econômico. Desta forma, processos biotecnológicos que visam desenvolver a resistência de plantas a patógenos e insetos-praga têm sido obtidos para muitas culturas importantes, tais como batata, tomate, colza, algodão e soja, entre outras. A engenharia genética de plantas, que busca o desenvolvimento de materiais vegetais com características importantes, como a resistência a insetos, tem o potencial de superar muitas das limitações típicas dos métodos convencionais de controle, além das limitações próprias dos métodos clássicos de melhoramento.

A transferência genética constitui um método alternativo ao uso de agrotóxicos para auxiliar no controle de insetos-praga e doenças, com vantagem adicional em termos de custos, baixo impacto ambiental e bem-estar para a saúde humana. Plantas transformadas que expressam inibidores de enzimas hidrolíticas específicas têm grande potencial no controle e na redução de danos causados por pragas a culturas economicamente importantes, não só para o Brasil, mas também para a Colômbia e outros países em desenvolvimento. Com os avanços biotecnológicos, genes de diferentes origens que conferem resistência a insetos podem ser introduzidos em plantas de interesse econômico para reduzir sua susceptibilidade e aumentar a produção.

## **IV. OBJETIVOS**

### **IV.i. Objetivo Geral**

O objetivo principal deste trabalho é a avaliação da atividade de enzimas digestivas, presentes no trato digestivo da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), da lagarta-da-batata (*Tecia solanivora*) e da broca gigante da cana (*T. licus*) e a identificação de fatores protéicos com atividade inibitória contra as  $\alpha$ -amilases destes insetos-praga.

### **IV.ii. Objetivos Específicos**

- Estudo da atividade de  $\alpha$ -amilases presentes no trato digestivo da broca-do-café e a lagarta-da-batata.
- Varredura de possíveis inibidores de  $\alpha$ -amilases de *Phaseolus* spp com atividade biológica contra a broca-do-café.
- Varredura de possíveis inibidores de  $\alpha$ -amilases de *Phaseolus* spp com atividade biológica contra a lagarta-da-batata.
- Caracterização bioquímica da principal  $\alpha$ -amilase da lagarta-da-batata.
- Estudo da atividade de aminopeptidases e outras enzimas presentes no trato da lagarta-da-batata e da broca gigante da cana.

# **CAPITULO 1 - Atividade biológica de inibidores de $\alpha$ -amilase presentes em *Phaseolus coccineus* e a digestão proteolítica do inibidor de $\alpha$ -amilase $\alpha$ AI-1.**

## **1.1. Resumo do primeiro capítulo.**

Sementes de feijão (*P. coccineus*) foram analisadas em função da presença e atividade de isoformas do inibidor de  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -AI). Por meio do uso de anticorpos policlonais gerados contra o inibidor  $\alpha$ -AI-1 do feijão comum (*P. vulgaris*), foi possível detectar polipeptídios típicos deste inibidor (Mr. 14 – 18 kDa), além de um polipeptídeo (Mr. 32 kDa), geralmente referenciado como inibidor de  $\alpha$ -amilase. Mediante o uso de zimogramas, que são ensaios semi-quantitativos que permitem a separação e a identificação das diferentes isoformas do inibidor – e com a ajuda de ensaios quantitativos contra  $\alpha$ -amilases de saliva humana,  $\alpha$ -amilase de pâncreas de porco e  $\alpha$ -amilases digestivas da broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), - foi possível analisar a atividade biológica dos inibidores de  $\alpha$ -amilases presentes nas diferentes cultivares de *P. coccineus*. As diferentes curvas de inibição permitem sugerir que o gene que codifica um dos inibidores presentes nas sementes de *P. coccineus* 35590 seria o melhor candidato para a transformação genética do café visando à geração de plantas com resistência a larvas da broca-do-café. A digestão proteolítica *in vitro* do inibidor de  $\alpha$ -amilases  $\alpha$ -AI-1 puro causou uma perda rápida da atividade inibitória, afetando seriamente sua capacidade natural de interagir com as  $\alpha$ -amilases.

## **1.2. Materiais e Métodos**

### **1.2.1. Insetos e Sementes**

As larvas da broca-do-café, *H. hampei*, foram obtidas no Brasil e mantidas em insetário na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. As sementes de *P. coccineus* (G35590 e G35018) e *P. lunatus* (L) foram fornecidas pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT - Palmira, Colômbia) e propagadas em casa de vegetação em Manizales, Colômbia. As sementes de tabaco transgênico expressando o inibidor recombinante  $\alpha$ -AI-1, foram um presente do Dr. Maarten J. Chrispeels (University of Califórnia, USA).

### **1.2.2. Procedimentos de extração das proteases do inseto.**

Vinte tratos intestinais da broca-do-café foram separados com a ajuda de um microscópio e homogeneizados num tubo de microcentrífuga, com 20  $\mu$ L de tampão citrato 0.1 M, pH 3.0; em seguida, o extrato foi centrifugado a 15000 x g, durante 20 minutos, a 4° C. Somente os componentes solúveis no sobrenadante foram usados como fonte de atividade proteolítica.

### **1.2.3. Ensaio de atividade $\alpha$ -amilase e atividade inibitória de $\alpha$ -amilase**

A  $\alpha$ -amilase do pâncreas de porco foi obtida da Sigma-Aldrich (Corporation). Os extratos crus contendo as  $\alpha$ -amilases de *H. hampei* foram obtidos a partir da homogeneização dos tratos intestinais do inseto com uma solução de NaCl 10 mM, contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM, e centrifugado a 10,000 x g, durante 30 minutos a 4° C. O sobrenadante foi liofilizado e o pó obtido foi utilizado como fonte da enzima. Nas mensurações da atividade biológica da  $\alpha$ -amilase, foi usado o protocolo descrito previamente por Valencia (Valencia *et al.*, 2000). Uma alíquota (50  $\mu$ L) do extrato contendo a enzima foi incubada durante 15 minutos, a 30° C

com 650  $\mu\text{L}$  de tampão succínico (50 mM; pH 5.0) contendo 10 mM de NaCl, 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 500  $\mu\text{L}$  de uma solução 0.125% de amido (Sigma) em 50 mM tampão succínico, pH 5.0. A reação foi interrompida pela adição de 5 mL de uma solução de iodine/iodide (0.5%  $\text{I}_2$  e 5% KI). A atividade inibitória da  $\alpha$ -amilase foi mostrada como porcentagem residual quando comparada com o controle do teste.

A formação do complexo de cor azul foi medida a 580 nm, usando-se o espectrofotômetro Unicam UV2. A inibição da atividade da  $\alpha$ -amilase foi determinada mediante a pré-incubação da enzima com o extrato contendo o inibidor de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AI), durante 15 minutos a 35° C, em tampão de atividade (tampão succínico 50 mM, pH 5.0, contendo 10 mM de NaCl e 20 mM de  $\text{CaCl}_2$ ). Os resultados foram comparados com os obtidos nos ensaios de atividade da enzima na ausência do inibidor ( $\alpha$ -AI).

#### **1.2.4. Ensaios de atividade proteolítica**

A atividade proteolítica total do trato intestinal da broca-do-café foi medida usando-se o método descrito por Lenney (1975) e Blanco Labra e colaboradores (1996). A hemoglobina bovina foi preparada em água e destilada com uma solução 6.0N de HCl, pH 1.0. A solução final de hemoglobina (0.083 %) foi preparada com o uso do tampão citrato 0.1 M pH 3.0. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como um incremento de 0.001 na absorbância a 280 nm.

#### **1.2.5. Ensaio de digestão proteolítica do inibidor de $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AI-1) puro**

Para estudar o efeito das proteases intestinais da broca-do-café *H. hampei* na atividade biológica do inibidor de  $\alpha$ -amilases  $\alpha$ -AI-1, incubou-se 1  $\mu\text{L}$  deste inibidor puro (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) com 1  $\mu\text{L}$  do extrato proteolítico cru contendo 4.0, 2.0 e 0.0 unidades de atividade da enzima, durante duas (2) horas, a 36° C, e então estocado a -80° C como fonte do inibidor digerido.

Foram utilizados 4  $\mu$ L desta solução contendo o inibidor digerido pela ação das proteases do inseto para a realização da focalização isoeletrica em Phastgel (3-9) e avaliados pela atividade inibitória residual, conforme descrito anteriormente.

#### **1.2.6. Obtenção dos extratos contendo o inibidor de $\alpha$ -amilases a partir de sementes de feijão e tabaco.**

Os extratos protéicos das sementes de tabaco (*Nicotiana tabacum*) e do feijão *P. coccineus* contendo os inibidores de  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -AIs) foram obtidos a partir da homogeneização da farinha destas sementes com cinco volumes de uma solução de NaCl 100 mM, durante 3 horas, a 4° C. Os extratos foram centrifugados a 12,000 x g, durante 60 minutos, e o sobrenadante foi dialisado contra água para permitir a precipitação das globulinas. Depois da centrifugação (12,000 x g durante 20 minutos), o sobrenadante foi liofilizado e o pó resultante usado como fonte do inibidor de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AI) para os diferentes ensaios de inibição.

#### **1.2.7. Purificação parcial do inibidor de $\alpha$ -amilases (AI-1)**

A purificação do inibidor de  $\alpha$ -amilases foi feita seguindo a metodologia descrita por Valencia e colaboradores (2000). Neste caso, 30 g das sementes de *P. coccineus* foram triturados e o pó resultante misturado com 350 mL de água destilada e deixado sob agitação durante 6 horas, a 4° C. O homogeneizado foi centrifugado durante 30 minutos a 10000 x g, e o pH do sobrenadante ajustado a 4.0, usando-se solução de HCL 1 M. As proteínas foram removidas por centrifugação (20 minutos a 12000 x g) e o pH do sobrenadante ajustado até 7.0 com solução de fosfato de potássio 1 M. As proteínas presentes no sobrenadante foram precipitadas por adição gradual de sulfato de amônio saturado (4.1M), até atingir 85% de saturação e deixadas durante 5 horas no gelo.

Posteriormente, as proteínas foram coletadas por centrifugação a 12000 x g, durante 20 minutos. O precipitado foi dissolvido em água, dialisado contra água durante 36 horas e depois dialisado contra uma solução de fosfato de potássio 20 mM, pH 7.0, durante 12 h. A solução contendo as proteínas foi aplicada numa coluna de DEAE-cellulose (120 x 16 mm) e lavada com 200 mL de tampão fosfato. A proteína retida na coluna foi eluída com um gradiente linear de NaCl (0 a 100 mM) e depois foi testada cada uma das frações pela atividade inibitória.

#### **1.2.8. Immunoblot dos inibidores de $\alpha$ -amilase**

A eletroforese SDS-PAGE foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Laemmli (1970), usando-se o equipamento PhastSystem (GE Healthcare Life Sciences), operado com um Phastgel em gradiente 8-25%, conforme as instruções do fabricante e mantendo a temperatura do platô a 15° C. As proteínas foram detectadas em membranas de nitrocelulose com o uso de anticorpos policlonais gerados contra o inibidor  $\alpha$ -AI-1, os quais foram obtidos segundo o protocolo descrito por Moreno e Chrispeels (1989). Um anticorpo anti-coelho ligado a peroxidase foi usado como anticorpo secundário.

#### **1.2.9. Separação eletroforética e detecção da atividade biológica dos inibidores de $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -AIs) em géis nativos e de focalização isoeletrica (IEF)**

As proteínas extraídas das sementes de tabaco (*N. tabacum*) e *P. coccineus* foram separadas via eletroforese em géis de gradiente (Phastgel 8-25%) e géis de focalização isoeletrica (Phastgel IEF 3-9). Os zimogramas foram obtidos por meio da incubação dos géis de eletroforese numa solução de amido 1.5%, preparada em tampão succínico 50 mM pH 5.0, que contém 10 mM de NaCl e 20 mM de CaCl<sub>2</sub>, durante uma hora, a 4° C.

Após este tratamento, os géis foram incubados durante 20 minutos a 30° C com  $\alpha$ -amilase de saliva humana dissolvida no mesmo tampão, lavada com água destilada e posteriormente colorida com uma solução de KI-I<sub>2</sub> (0.5% I<sub>2</sub> e 5% KI) durante 10 minutos. Este tratamento revelou bandas de cor azul intenso num fundo claro.

#### **1.2.10. Efeito da temperatura na atividade biológica do inibidor de $\alpha$ -amilase.**

A atividade biológica dos inibidores de  $\alpha$ -amilase presentes nas sementes de *P. coccineus* foram medidas pela incubação do extrato contendo o inibidor tratado durante 5, 10, 15, 30 e 60 minutos, a 80° C. Após este tratamento, alíquotas de 50  $\mu$ L do inibidor tratado termicamente foram resfriadas num banho com água gelada para a posterior medição da atividade do inibidor. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

#### **1.2.11. Quantificação das proteínas.**

A quantificação da concentração de proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976). A albumina de soro bovino foi usada como padrão.

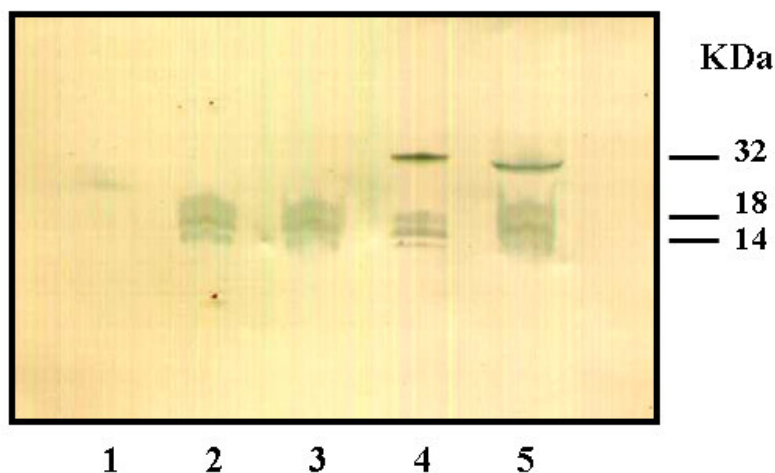
### **1.3. Resultados e Discussão**

#### **1.3.1. Análise do Immunoblot**

Para estudar a relação existente entre a atividade inibitória de  $\alpha$ -amilases presente em sementes de *P. coccineus* e a possível presença de polipeptídeos em sementes de fumo transgênico – as quais reagem com o anti-soro policlonal contra o inibidor  $\alpha$ -AI-1, foram analisados os extratos de sementes de *P. coccineus* e as sementes de tabaco transgênico que expressam o gene  $\alpha$ -AI-1 de *P. vulgaris*. As proteínas presentes nos diferentes extratos foram separadas via SDS-PAGE e testadas com anticorpos que foram produzidos contra o inibidor  $\alpha$ -AI-1.



A especificidade deste anti-soro é mostrada na figura 1.3.1, na qual a proteína  $\alpha$ -AI-1 recombinante extraída das sementes transgênicas de tabaco foi reconhecida. Os anticorpos gerados contra o inibidor  $\alpha$ -AI-1 reagem com pequenos polipeptídeos de massa molecular entre 14 e 18 kDa. Dois dos extratos contiveram um grande polipeptídeo (32 kDa) que reage com os anticorpos gerados contra o inibidor  $\alpha$ -AI-1.



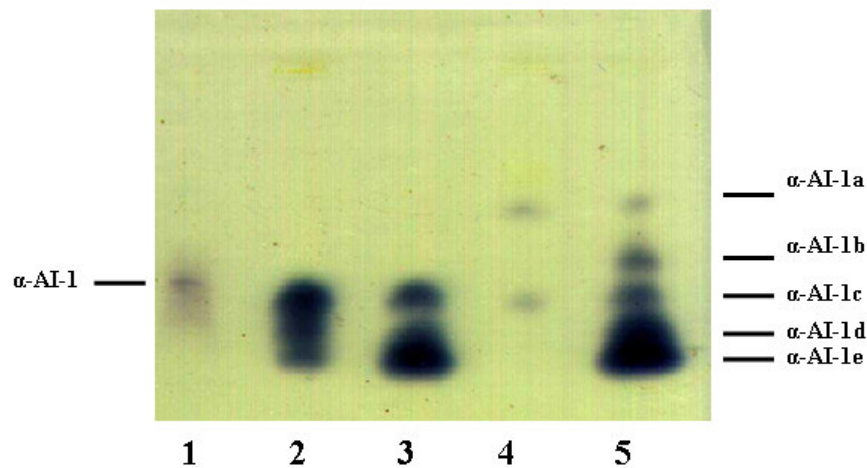
**Figura 1.3.1.** Western blotting dos extratos protéicos de diferentes acessos de *P. coccineus*; mediante o uso de anticorpos policlonais que foram gerados contra o inibidor de  $\alpha$ -amilases de *P. vulgaris*  $\alpha$ -AI-1. Linha 1, extrato das sementes de tabaco transgênico; contendo o inibidor de  $\alpha$ -amilase recombinante  $\alpha$ -AI-1. Linha 2, *P. coccineus* (G35514). Linha 3, *P. coccineus* (G35590). Linha 4, *P. coccineus* (G35018). Linha 5, *P. coccineus* (G35619). As flechas indicam a massa molecular aproximada (14, 18 e 32 kDa). A separação eletroforética foi desenvolvida em géis nativos em gradiente (Phastgel 8-25%).

A proteína que foi detectada pertence à família lectina ou a outra molécula não processada nesta mesma família de proteínas (Pueyo *et al.*, 1993, Dayler *et al.*, 2005). As moléculas com igual massa molecular também têm propriedades de defesa da planta (por exemplo, as arcelinas), o que pode explicar a sensibilidade diferencial que apresenta *P. coccineus* aos vários insetos-praga.

### **1.3.2. Zimogramas de inibidores de $\alpha$ -amilase em sementes de *P. coccineus* e em sementes de tabaco transgênico.**

As proteínas extraídas de diferentes sementes de *P. coccineus* foram analisadas por meio de eletroforese em géis nativos (gradiente 8-25%) e de focalização isoelétrica (IEF 3-9), visando à detecção de possíveis isoformas do inibidor de  $\alpha$ -amilases. Isto permitiu que as diferentes isoformas do inibidor fossem separadas pela carga iônica e depois detectadas em função de sua atividade biológica no gel.

Os inibidores de  $\alpha$ -amilase foram localizados primeiramente pela incubação do gel com uma solução de amido (tampão succínico 50 mM;  $\text{CaCl}_2$  20 mM; pH 5.0) e então digerido o amido mediante a incubação do gel com uma solução contendo  $\alpha$ -amilase humana. De acordo com este método, a  $\alpha$ -amilase digere o amido em todas as partes, exceto onde o inibidor é encontrado. Posteriormente, o gel foi tratado com solução de iodine/iodide (0.5%  $\text{I}_2$  e 5% KI) durante 10 minutos. Este tratamento produz bandas azuis no fundo claro. O zimograma (Fig. 1.3.2.1) mostra que as sementes de *P. coccineus* diferem significativamente no nível da atividade inibitória e na sua especificidade.

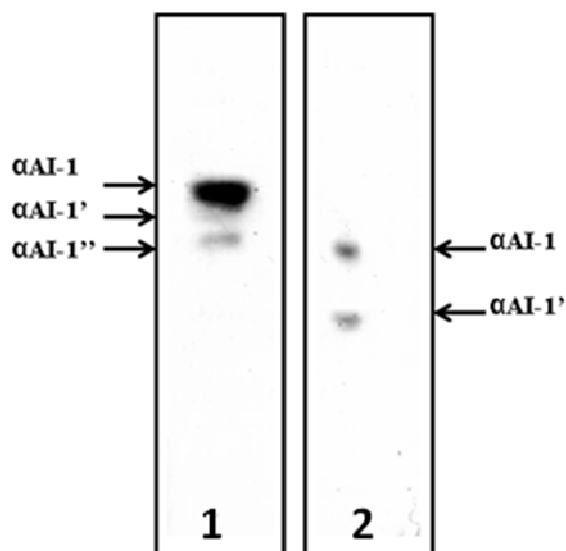


**Figura 1.3.2.1.** Separação eletroforética dos inibidores de  $\alpha$ -amilase presentes nas sementes de *Phaseolus coccineus* e de sementes de tabaco transgênico. Linha 1, extrato de sementes de tabaco transgênico contendo o inibidor de  $\alpha$ -amilase recombinante  $\alpha$ -AI-1. Linha 2, *P. coccineus* (G35514). Linha 3, *P. coccineus* (G35590). Linha 4, *P. coccineus* (G35018). Linha 5, *P. coccineus* (G35619). A separação eletroforética foi feita em géis de gradiente nativos (Phastgel 8-25%). Após a eletroforese, o Phastgel foi incubado com uma solução de amido 1% durante 60 minutos, seguido pela incubação com a solução contendo a  $\alpha$ -amilase salival humana durante 15 minutos, a 30° C. Finalmente, a detecção das bandas de inibição foi feita por coloração do gel de eletroforese com uma solução de KI-I<sub>2</sub> (0.5% I<sub>2</sub> e 5% KI) durante 10 minutos.

O feijão comum (*P. vulgaris*) contém somente uma isoforma do inibidor de  $\alpha$ -AI (Valencia *et al.*, 2000), o que corresponde à banda de atividade detectada nas sementes de tabaco transgênico (linha 1). Em trabalhos anteriores de pesquisa, tem sido reportado que as sementes de *Cajanus cajan* tem pelo menos quatro isoformas do inibidor de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AIs) (Giri e Kachole, 1996), mostrando claramente que a expressão deste tipo de proteína é diferente para cada um das fontes vegetais das quais o inibidor é proveniente.

A análise dos inibidores de  $\alpha$ -amilase, feita após a separação das proteínas presentes nas sementes de *P. coccineus* (G35590 e G35018) por meio de focalização isoeletrica (IEF) (Fig. 1.3.2.2) mostrou a presença de várias bandas inibitórias com as mesmas diferenças na atividade inibitória encontradas nos testes anteriores. Estas diferenças na migração eletroforética dos iso-inibidores podem refletir diferenças na seqüência dos aminoácidos na estrutura primária da proteína e nas propriedades inibitórias, tanto *in situ* como *in vitro* (Valencia *et al.*, 2000).

Estes resultados indicam que as diferentes sementes de *P. coccineus* contêm diversas isoformas dos inibidores de  $\alpha$ -amilase, os quais poderiam ser usados na geração de culturas resistentes aos insetos, mediante o uso da biotecnologia. Utilizando as mesmas metodologias na detecção da atividade biológica destes inibidores, não foi possível detectar atividade inibitória em extratos de sementes de *Phaseolus lunatus*.



**Figura 1.3.2.2.** Focalização isoeletrica dos inibidores de  $\alpha$ -amilase presentes em dois cultivares de *P. coccineus*. Linha 1, extrato protéico das sementes de Pc-35590. Linha 2, extrato protéico das sementes de Pc-35018. A separação eletroforética foi feita em géis de focalização isoeletrica (Phastgel IEF 3-9).

### 1.3.3. Inibição das $\alpha$ -amilases do pâncreas do porco, saliva humana e da broca-do-café, *H. hampei*.

As sementes de *P. coccineus* contêm inibidores de  $\alpha$ -amilases com potencial para inibir tanto  $\alpha$ -amilases de insetos quanto de mamíferos (Ishimoto e Chrispeels, 1996). Para confirmar este fato, proteínas extraídas de *P. coccineus* foram testadas com intuito de verificar sua atividade inibitória contra a atividade de  $\alpha$ -amilases puras do pâncreas de porco, saliva humana e de um extrato total de larvas da broca-do-café, *H. hampei* (Fig. 1.3.3). Foram usados extratos do inseto inteiro devido à dificuldade de se obter uma quantidade suficiente desta enzima para todos os ensaios, a partir do trato intestinal.

Entretanto, foi demonstrado claramente que a atividade desta enzima no extrato completo do inseto corresponde à mesma atividade encontrada no extrato do intestino de *H. hampei* (Valencia *et al.*, 2000).

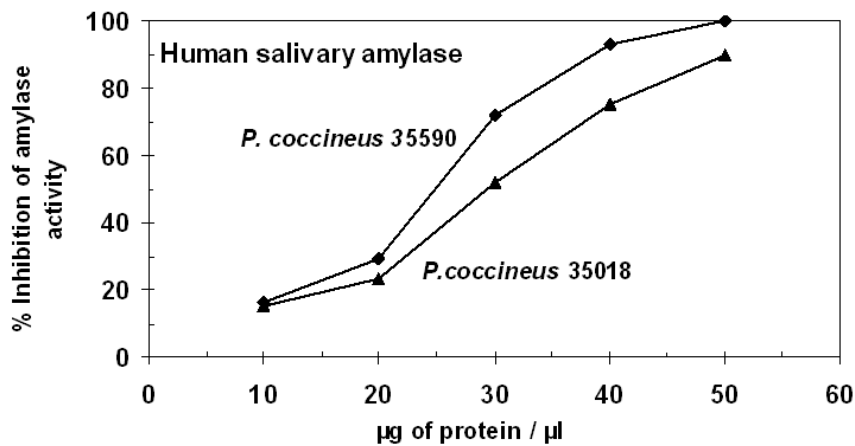


Fig. 1.3.3a

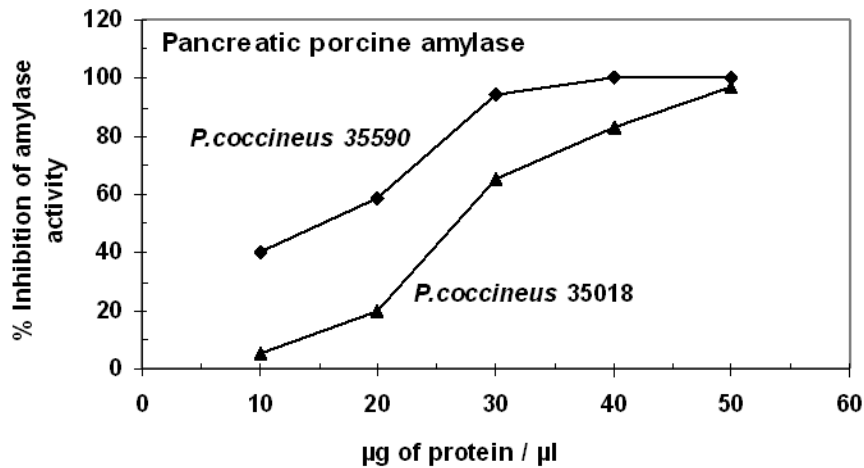


Fig. 1.3.3b

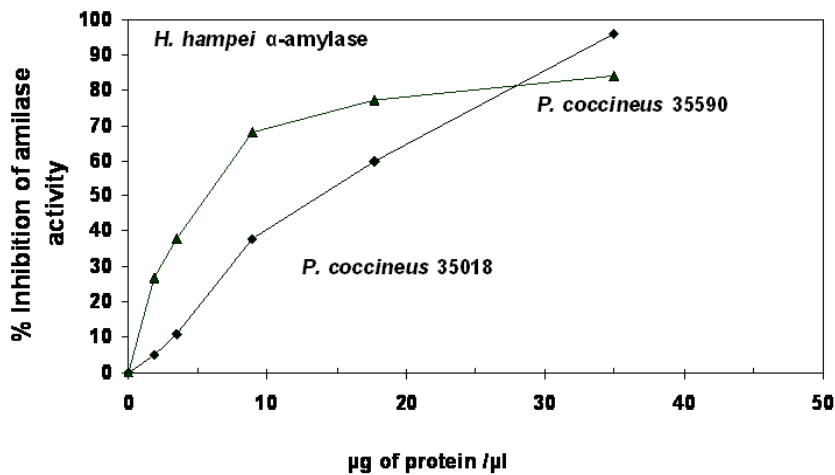


Fig. 1.3.3c

**Figura. 1.3.3.** Efeito de dois extratos crus de proteínas extraídas de sementes de *P. coccineus* contendo o inibidor de  $\alpha$ -amilases  $\alpha$ -AI-Pc, na atividade de  $\alpha$ -amilases de diferentes fontes. (a) Inibição da  $\alpha$ -amilase salival humana. (b) Inibição da  $\alpha$ - $\alpha$ -amilase do pâncreas de porco. (c) Inibição das  $\alpha$ -amilases digestivas da broca-do-café, *H. hampei*. As enzimas e os inibidores foram pré-incubados durante 15 minutos antes da adição do amido. A inibição (%) é mostrada como um valor relativo do ensaio controle (na ausência do extrato contendo o inibidor).

O extrato protéico extraído das sementes de *P. coccineus* contendo os inibidores de  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -AI-Pc) inibiu não só as  $\alpha$ -amilases de mamíferos, como foi sugerido previamente por Ishimoto e Chrispeels (1996), mas também as  $\alpha$ -amilases da broca-do-café, *H. hampei*. A adição de 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  da proteína extraída da semente do feijão (Inibidor cru Pc-355590) inibiu completamente as  $\alpha$ -amilases de mamíferos. No entanto, a mesma quantidade do inibidor  $\alpha$ -AI (expressado como proteína crua), inibiu 85% da atividade da  $\alpha$ -amilase de *H. hampei*. Diferenças interessantes foram mostradas nas concentrações mais baixas da proteína. A adição de 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  da proteína extraída de *P. coccineus* 35018 inibiu 20% da atividade das  $\alpha$ -amilases de porco e humana. Entretanto, inibiu 60% da atividade das  $\alpha$ -amilases presentes no trato intestinal de *H. hampei*.

As proteínas presentes nos extratos de sementes de *P. coccineus* 35590 inibiram diferencialmente as duas  $\alpha$ -amilases de mamíferos (30% de inibição para a  $\alpha$ -amilase salival e 60% para a  $\alpha$ -amilase do pâncreas de porco) e mostraram uma inibição de 75% da atividade  $\alpha$ -amilase proveniente de *H. hampei*. Em uma concentração mais baixa da proteína (10  $\text{mg}/\text{mL}$ ), a tendência foi a mesma, mas as diferenças tornaram-se ainda mais pronunciadas. Na mesma concentração, este extrato de *P. coccineus* 35590 inibiu 68% da atividade da  $\alpha$ -amilase do pâncreas de porco e da  $\alpha$ -amilase da broca-do-café, *H. hampei*.

Um trabalho anterior mostrou que o inibidor do feijão comum é mais eficaz na inibição da  $\alpha$ -amilase de saliva do que da  $\alpha$ -amilase extraída do trato digestivo de *H. hampei* (Valencia *et al.*, 2000). Quedo claramente mostrado que as sementes de *P. coccineus* contêm diferentes isoformas do inibidor de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AI), os quais apresentam maior atividade inibitória contra as  $\alpha$ -amilases de *H. hampei*, quando comparada com a inibição gerada pelos inibidores presentes nas sementes do feijão comum, *P. vulgaris*.

É muito bem conhecido que a formação do complexo entre a enzima e o inibidor depende de um grande número de resíduos de aminoácidos presentes na interface das duas proteínas (Bompard-Gilles *et al.*, 1996), além de depender do pH, com um ótimo que varia entre 4 e 5 (Marshall e Lauda, 1975, Powers e Whitaker, 1977). Tanto nos ensaios feitos com os inibidores como nos ensaios de detecção da atividade da  $\alpha$ -amilase, foi usada uma solução tampão de pH 5.0, visando manter sempre a condição natural do pH encontrada no intestino da broca-do-café (*H. hampei*), o qual, conforme previamente relatado, encontra-se entre 4.5 e 5.2 (Valencia *et al.*, 2000).

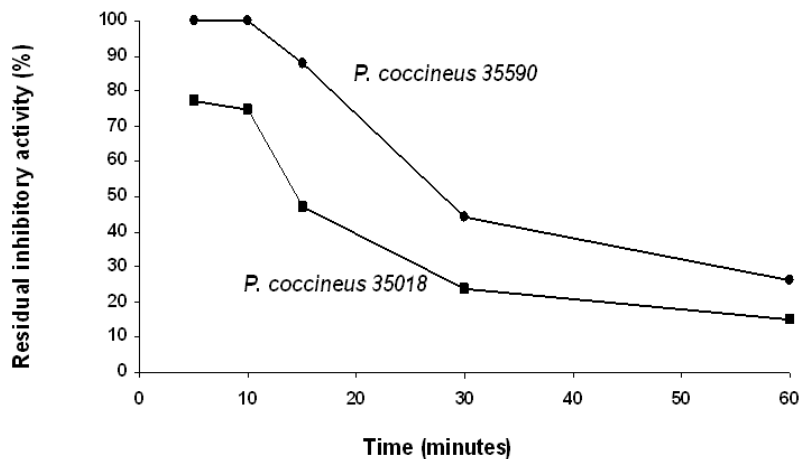
Conseqüentemente, neste trabalho, foi postulado que a diferença observada nos efeitos inibitórios obtidos com as proteínas parcialmente purificadas do feijão é causada por diferenças de afinidade entre o inibidor e a  $\alpha$ -amilase neste pH. A constatação de que as diferenças entre os dois acessos (35018 e 35090) são maiores nos zimogramas do que no teste quantitativo reflete a natureza semi-quantitativa dos zimogramas. Em trabalhos anteriores, tem sido reportado que os extratos obtidos a partir das sementes de *P. coccineus* podem inibir as  $\alpha$ -amilases de *C. chinensis* e a  $\alpha$ -amilase do pâncreas do porco, mas não inibem a atividade das  $\alpha$ -amilases de *A. obtectus* e *Z. subfasciatus* (Ishimoto e Chrispeels, 1996).

#### **1.3.4. Inativação térmica do inibidor de $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AI).**

Os extratos de sementes de *P. coccineus* (G35590 e G35018) foram incubados a 80° C durante 60 minutos, a fim de verificar o efeito da temperatura na atividade inibitória presente nestas sementes. O resultado mostrou que os inibidores de  $\alpha$ -amilase das sementes de *P. coccineus* são estáveis a 80° C, durante 10 minutos (figura 1.3.4). Contrariando este resultado, outro trabalho mostrou que o aquecimento do inibidor de  $\alpha$ -amilase presente em sementes de *P. peã*, nas mesmas condições, conseguiu destruir a atividade biológica do inibidor (Giri e Kachole, 1996). No geral, os resultados indicaram que os inibidores presentes



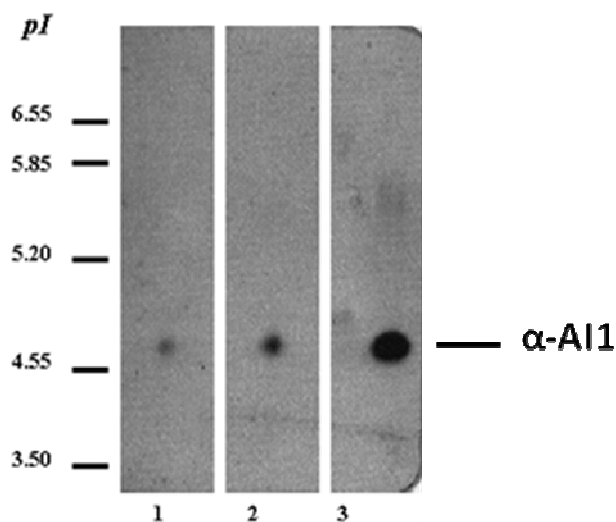
nas sementes de *P. coccineus* mostram resistência ao calor. Após uma hora nestas circunstâncias experimentais, os extratos continuam mantendo entre 20-30% de sua atividade inibitória.



**Figura 1.3.4.** Ensaio de inativação térmica do inibidor de  $\alpha$ -amilases presente em sementes de *P. coccineus* em função do tempo de incubação a 80° C. A estabilidade térmica foi determinada pela medição da atividade residual do inibidor após 60 minutos. Cada ponto representa a média de três medidas de atividade.

### 1.3.5. Ensaio de digestão proteolítica do inibidor de $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -AI-1)

Em outro ensaio, constatou-se que as proteases digestivas do trato intestinal da broca de café podem gerar uma inativação rápida do inibidor puro de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AI), mostrando uma quase completa abolição da atividade biológica deste inibidor depois de duas (2) horas a 36° C, quando usado uma concentração final de 4 unidades/ $\mu$ L de atividade proteolítica (Fig. 1.3.5).



**Figura 1.3.5.** Ensaio de digestão proteolítica do inibidor de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AI1) proveniente de *P. vulgaris*, com diferentes concentrações de proteases intestinais de larvas da broca-do-café, *H. hampei*. Linha 1, 4.0 unidades de atividade protease/ $\mu$ L. Linha 2, 2.0 unidades de atividade protease / $\mu$ l. Linha 3, 0.0 unidades de atividade protease/ $\mu$ l. Após a digestão, 1  $\mu$ L da amostra contendo o inibidor de  $\alpha$ -amilase foi aplicado num PhastGel (IEF 3 – 9). Finalmente, a detecção das bandas de inibição foi feita por coloração do gel de eletroforese com uma solução de KI-I<sub>2</sub> (0.5% I<sub>2</sub> e 5% KI) durante 10 minutos.

Resultado contrário ao presente trabalho foi observado em outro estudo, no qual um tratamento proteolítico ainda mais prolongado do inibidor de  $\alpha$ -amilase ( $\alpha$ -AI) presente em extratos de sementes de *C. cajan* culminou na formação de novos fragmentos do inibidor; com uma notória resistência a proteases (Giri e Kachole, 1998). Tal fato pode ter ocorrido em função da diferença na atividade biológica entre as duas fontes do inibidor. Com base nos resultados que se apresentam neste trabalho, é muito evidente que o tratamento de digestão proteolítica, ao qual foi submetido o inibidor de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AIs), gerou uma perda rápida da atividade biológica, afetando seriamente sua capacidade natural de interagir com as  $\alpha$ -amilases de mamíferos.

No entanto, a interação natural do inibidor de  $\alpha$ -amilases com as proteases endógenas extraídas do trato intestinal do inseto deveria ser testada tanto com diferentes concentrações do inibidor de  $\alpha$ -amilases como da protease intestinal do inseto. Assim, uma completa inibição da  $\alpha$ -amilase de um inseto depende não somente da potência do inibidor, mas também da sua resistência natural à digestão, que acontece pela atividade de proteases intestinais do inseto.

#### **1.4. Conclusões**

Os dados que aqui se apresentam permitem formular quatro conclusões importantes:

- Primeiro, existe uma considerável especificidade e variação nas atividades dos inibidores presentes nas sementes de *P. coccineus*, com relação à  $\alpha$ -amilase alvo extraída das diferentes fontes biológicas.
- Segundo, as diferentes isoformas do inibidor de  $\alpha$ -amilases provavelmente correspondem ao tipo  $\alpha$ -AI-1 presente nas sementes de *P. vulgaris*.
- Terceiro, é muito provável que os genes que controlam a expressão de um dos inibidores de  $\alpha$ -amilase em *P. coccineus* (G35590) sejam melhores candidatos para a geração de plantas de café com resistência a *H. hampei*, quando comparados com um gene de *P. coccineus* (G35018).
- Quarto, a atividade biológica do inibidor de  $\alpha$ -amilases  $\alpha$ -AI-1 pode ficar seriamente comprometida quando uma protease endógena se apresenta nas mesmas condições biológicas e fisiológicas do trato intestinal da broca do café.

## **CAPITULO 2 - $\alpha$ -Amilases presentes no trato digestivo de larvas de *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae): resposta ao pH, à temperatura e aos inibidores de $\alpha$ -amilase de origem vegetal**

### **2.1. Resumo do Segundo Capítulo**

Neste trabalho, foram estudadas as propriedades das  $\alpha$ -amilases presentes no trato digestivo de larvas de *T. solanivora*, um inseto-praga que gera danos importantes à batata (*Solanum tuberosum*). Os resultados mostram que este inseto possui, no mínimo, três isoformas principais de  $\alpha$ -amilases digestivas, as quais foram separadas por meio de géis nativos e de focalização isoeletrica (IEF), e apresentaram pontos isoeletricos de 5.30, 5.70 e 5.98. A atividade da  $\alpha$ -amilase digestiva apresenta um pH ótimo entre 7.0 e 10.0, com um pico de atividade em pH 9.0. A enzima é estável quando aquecida a 50° C e foi inibida por inibidores de natureza protéica presentes nas sementes de *P. coccineus* (70% de inibição) e de *P. vulgaris* cv Radical (87% de inibição) em pH 6.0. Os resultados mostram também que os inibidores de  $\alpha$ -amilase presentes em sementes de amaranto (*Amaranthus* spp.) inibiram 80% da atividade em pH 9.0 e que o inibidor de  $\alpha$ -amilase de amaranto pode ser um bom candidato para gerar plantas de batata modificadas geneticamente resistentes a este inseto-praga. Futuras pesquisas precisam ser desenvolvidas para esclarecer se estes inibidores de  $\alpha$ -amilase são resistentes às proteases presentes no trato digestivo da lagarta de batata, *T. solanivora*.

## **2.2. Materiais e Métodos.**

### **2.2.1. Insetos e inibidores vegetais.**

O inseto *T. solanivora* (Lepidóptera: Gelechiidae) foi obtido na Colômbia e multiplicado em tubérculos inteiros da batata em uma unidade de cria para insetos de CORPOICA em Santa fé de Bogotá, Colômbia. *P. vulgaris* cv. Radical é uma variedade comercial na Colômbia. As diferentes sementes de *P. coccineus* foram cedidas pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Palmira-Colômbia). As sementes de amaranto (*Amaranthus hypocondriacus*) foram obtidas numa loja em Santa Bárbara, CA, EUA.

### **2.2.2. Procedimentos para a extração das $\alpha$ -amilases do inseto**

Dois procedimentos diferentes de extração foram avaliados. Primeiramente, as larvas inteiras de *T. solanivora* foram homogeneizadas a 4° C com cinco volumes de uma solução de extração contendo 100 mM de NaCl e 20 mM de CaCl<sub>2</sub>. Depois da extração, o extrato foi filtrado e centrifugado a 10.000 x g, durante 30 minutos, a 4° C e o sobrenadante foi usado como fonte da enzima. Um segundo procedimento foi a obtenção de tratos intestinais do inseto a partir de larvas do quarto instar. Os tratos digestivos foram separados com a ajuda de um microscópio e homogeneizados em um tubo de microcentrífuga com uma solução de NaCl 10 mM. Todos os procedimentos foram feitos a 4° C.

### **2.2.3. Preparação dos extratos protéicos crus contendo os inibidores.**

As sementes de feijão foram lavadas, secadas e moídas até a obtenção de um pó fino. Os lipídios foram extraídos do pó com acetona, e o pó foi secado e pulverizado novamente. As proteínas presentes no pó das sementes de *P. vulgaris* e *P. coccineus* foram extraídas a 4° C com cinco volumes de uma solução de NaCl 0.1M. O extrato foi então centrifugado a 12.000 x g durante uma hora e o sobrenadante dialisado contra água destilada para permitir a

precipitação das globulinas. Este procedimento foi realizado quatro vezes, sendo que cada operação teve a duração de 12 horas. Após a centrifugação (12.000 x g por 30 minutos), o sobrenadante foi liofilizado e usado como fonte do inibidor para os ensaios de inibição de  $\alpha$ -amilases intestinais. O inibidor de  $\alpha$ -amilases presente nas sementes de Amarantho foi purificado como descrito por Valencia (Valencia *et al.*, 2000).

O extrato cru foi aquecido a 70° C durante 30 minutos, e o pH da solução foi aumentado de 6.8 para 8.4 com uma solução de NaOH 0.1M. O precipitado resultante foi removido por centrifugação e as proteínas precipitadas foram então dissolvidas com um tampão fosfato 20 mM, pH 8.4. Este precipitado conteve o inibidor de amaranto parcialmente puro, como mostrado por SDS-PAGE (dados não mostrados) (mencionado daqui por diante como o inibidor parcialmente puro do amaranto).

#### **2.2.4. Ensaios da atividade de $\alpha$ -amilases.**

A atividade das  $\alpha$ -amilases foi determinada pelo uso do método descrito por Valencia e colaboradores (2000). De maneira geral, 20  $\mu$ L da solução da enzima foram incubados durante 15 minutos, a 30° C com 680  $\mu$ L de tampão Glicina (50 mM, pH 9.0) contendo 10 mM de NaCl e 20 mM de CaCl<sub>2</sub>. A reação enzimática foi iniciada pela adição de 500  $\mu$ L da solução 0.125% de amido solúvel (Sigma); em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 5 mL da solução de iodo/iodide (0.5% I<sub>2</sub> e 5% KI). A absorbância foi determinada a 580 nm usando-se um espectrofotômetro Unicam UV2. A atividade biológica do inibidor de  $\alpha$ -amilase foi medida como descrito previamente mais, neste caso, a enzima e o inibidor foram pré-incubados juntos durante 15 minutos antes da adição do amido.

### **2.2.5. pH ótimo para a atividade da $\alpha$ -amilase**

O pH ótimo para a atividade das  $\alpha$ -amilases presentes no trato digestivo de larvas de *T. solanivora* foi determinado pelo uso de diferentes soluções tamponantes. Os tampões utilizados foram: citrato (pH 3.0 e 5.0), succinato (pH 4.0 e 6.0), fosfato (pH 11.0 - 12.0) e Tris (pH 7.0 - 9.0). Cada um dos tampões foi preparado numa concentração 50 mM, contendo 10 mM de NaCl e 20 mM de CaCl<sub>2</sub>.

### **2.2.6. Estabilidade térmica das $\alpha$ -amilases**

A estabilidade térmica das  $\alpha$ -amilases foi determinada na presença de NaCl e de CaCl<sub>2</sub>, incubando o extrato enzimático com o tampão de atividade (glicina 50 mM; pH 9.0) durante 10, 25, 30, 40, 50 e 60 minutos, a 70° C. Cada ensaio de atividade foi feito com quatro repetições.

### **2.2.7. Separação por eletroforese das diferentes formas moleculares da $\alpha$ -amilase em géis nativos e por focalização isoeletrica (IEF)**

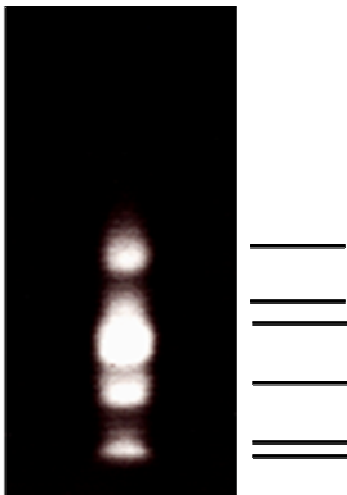
As proteínas foram separadas com o uso do equipamento de eletroforese PhastSystem, da Pharmacia, seguindo as instruções dadas pelo fabricante. Os zimogramas de atividade das  $\alpha$ -amilases foram realizados em condições nativas (7.5%) e por focalização isoeletrica, mediante o uso de IEF-Phastgels (escala de pH 3.0 - 9.0). Após a separação, os géis foram colocados em uma solução de amido 1.5% em tampão glicina (50 mM; pH 9.0), que contém 10 mM de NaCl e 20 mM de CaCl<sub>2</sub>, durante uma hora, a 4 ° C. Depois de uma hora, o gel foi enxaguado com água destilada e incubado por mais uma hora no mesmo tampão. A atividade da enzima  $\alpha$ -amilase apareceu na matriz de poli(acrilamida-amido) como uma banda clara em um fundo azul-colorido, após do tratamento com uma solução KI/I<sub>2</sub> durante 10 minutos.

Os géis foram lavados a fim de remover o excesso da solução inicial de iodo e finalmente fotografados. Os pontos isoelétricos foram calculados usando-se proteínas padrão com pontos isoelétricos conhecidos e o software ImageMaster VDS.

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Características das $\alpha$ -amilases intestinais da lagarta da batata, *T. solanivora*

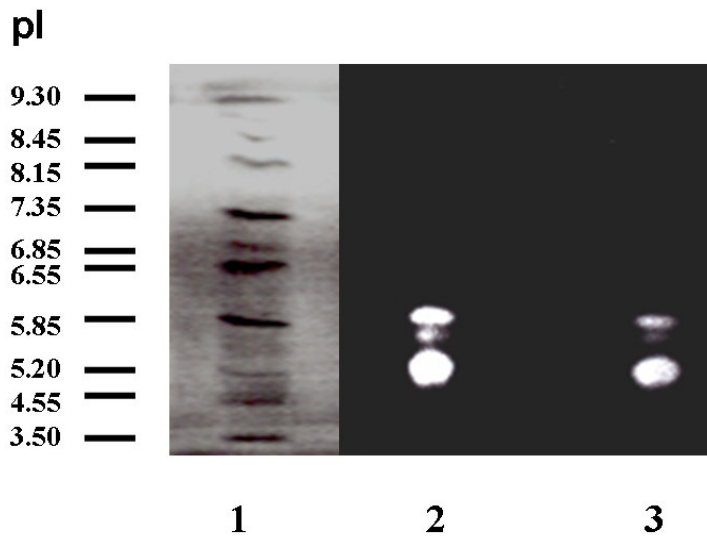
Inicialmente, para determinar a presença de diferentes formas moleculares de  $\alpha$ -amilase no inseto, ambos os extratos larvais, assim como os conteúdos do trato intestinal, foram analisados em géis nativos de poliacrilamida (7.5%) e em géis de focalização isoelétrica (IEF). Foram observadas três bandas de atividade da  $\alpha$ -amilase no extrato obtido a partir das larvas inteiras, e o mesmo padrão também foi observado para o extrato obtido a partir do trato intestinal (Fig. 2.3.1), indicando a natureza digestiva destas isoformas de  $\alpha$ -amilase.



**Figure 2.3.1.1.** Padrão eletroforético de diferentes isoformas de  $\alpha$ -amilase presentes em larvas completas de *T. solanivora*, separadas em Phastgel nativo (7.5 %).



O padrão obtido por focalização isoelétrica mostrou as mesmas três bandas de atividade detectadas em Phastgel 7.5% (Fig. 2.3.1.2). Os pontos isoelétricos calculados, usando-se proteínas com pIs conhecidos e o software (imagem VDS mestre), foram 5.30, 5.70 e 5.98.



**Figure 2.3.1.2** Determinação do ponto isoelétrico (pI) das principais  $\alpha$ -amilases digestivas de *T. solanivora*, com o uso de IEF-Phastgel numa escala de pH entre 3.0 e 9.0. Linha 1, mostra os marcadores de ponto isoelétrico (pI). Linha 2, representa as  $\alpha$ -amilases provenientes do inseto completo (Larvas). Linha 3, representa as  $\alpha$ -amilases provenientes do trato intestinal da larva.

### 2.3.2. Efeito do pH e da temperatura na atividade da $\alpha$ -amilase

Mediante provas preliminares, foram determinadas algumas propriedades das  $\alpha$ -amilases intestinais de larvas de *T. solanivora*. Os resultados encontrados mostram que a atividade das  $\alpha$ -amilases presentes no trato intestinal de *T. solanivora* ocorre numa ampla faixa de pH, que vai de 7.0 a 10.0, com um pico ótimo de atividade em pH 9.0 (Fig. 2.3.2a).

Para determinar a estabilidade térmica, a atividade da enzima foi monitorada após a pré-incubação da enzima em uma solução tampão de atividade (glicina 50 mM; pH 9.0), durante 10 minutos, a temperaturas que variaram de 25 a 70° C (Fig. 2.3.2b). Observou-se que a enzima é estável após ser aquecida até 50° C. A estabilidade térmica constatada é similar à verificada na maioria das  $\alpha$ -amilases de insetos, as quais mostram uma diminuição rápida na atividade em temperaturas acima de 40° C (Valencia *et al.*, 2000; Mendiola-Olaya *et al.*, 2000).

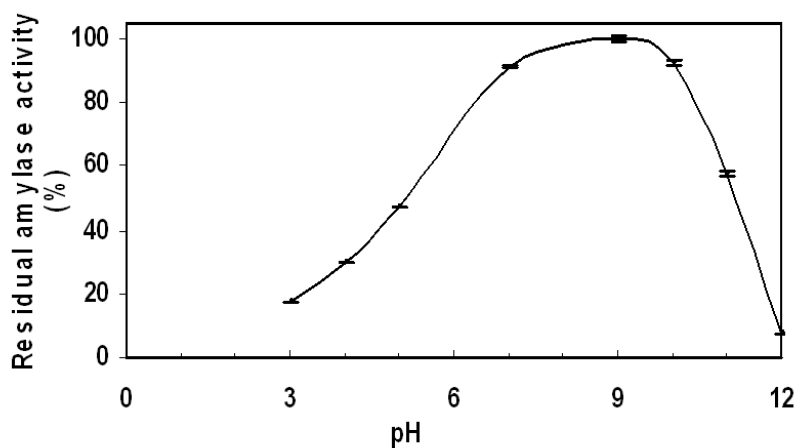
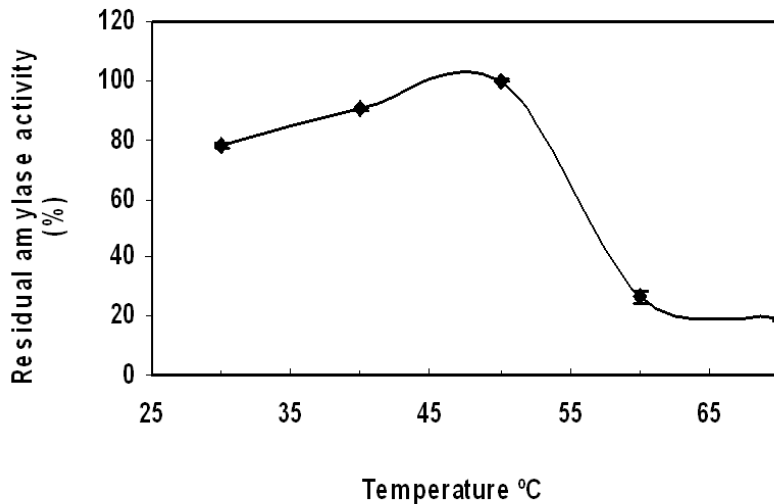


Figura 2.3.2a



**Figura 2.3.2b**

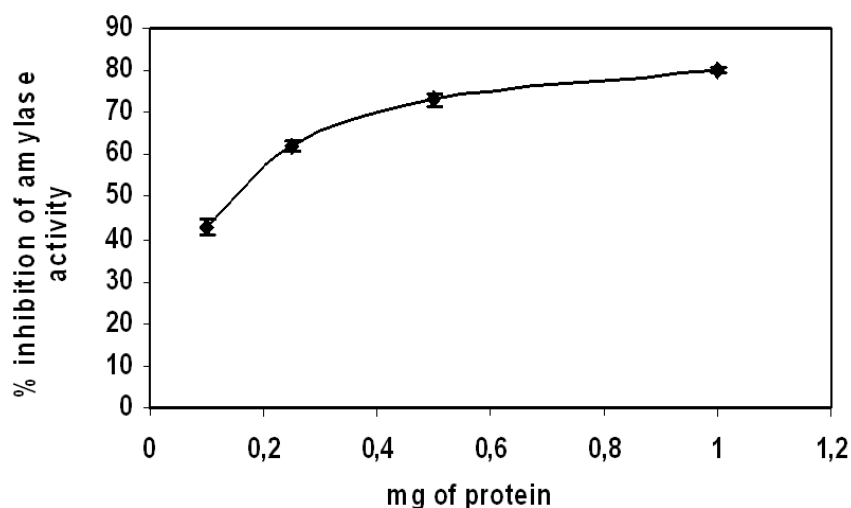
**Figura 2.3.2** (a) Curva de pH para a atividade de  $\alpha$ -amilases provenientes de larvas de *T. solanivora*. (b) Efeito da temperatura sobre a estabilidade das  $\alpha$ -amilases digestivas de *T. solanivora*. A estabilidade térmica foi determinada por meio da medição da atividade residual de  $\alpha$ -amilases, depois de 10 minutos de incubação em cada uma das temperaturas. Cada um dos pontos representa a média de três ensaios de atividade. As barras representam dois vezes o desvio padrão.

### 2.3.3. Efeito biológico dos inibidores de $\alpha$ -amilase

Relatou-se que as sementes do amaranto contêm um inibidor de  $\alpha$ -amilases (Chagolla-Lopez *et al.*, 1994) que é ativo contra as  $\alpha$ -amilases provenientes de *Prostephanus truncatus* (Mendiola-Olaya *et al.*, 2000), mas com menor atividade contra a broca do café, *H. hampei* (Valencia *et al.*, 2000). No presente trabalho, verificou-se o efeito deste inibidor na atividade de  $\alpha$ -amilases provenientes das larvas da lagarta da batata, *T. solanivora*, usando-se o inibidor purificado como descrito por Valencia (Valencia *et al.*, 2000).

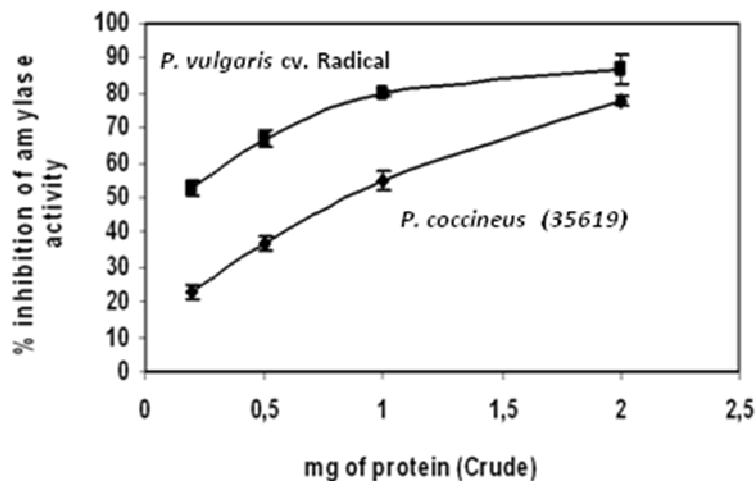
Os resultados indicam que o inibidor purificado das sementes de amaranto não teve efeito inibitório na atividade da enzima em pH 6.0 (dados não mostrados), mas mostrou elevada atividade inibitória em pH 9.0, que é o pH ótimo para a ação desta enzima.

A atividade máxima mostrada pelo inibidor de amaranto contra as  $\alpha$ -amilases digestivas de *T. solanivora* foi de 80% (Fig. 2.3.3.1).



**Figura 2.3.3.1.** Inibição das  $\alpha$ -amilases de *T. solanivora* na presença do inibidor obtido de sementes de *Amaranthus* spp. A enzima-alvo e o inibidor foram pré-incubados durante 15 minutos antes da adição do amido. Cada um dos pontos representa a média de três ensaios de atividade. As barras representam dois valores do desvio padrão.

Foi verificado o efeito das proteínas de *P. coccineus* 35619 e de *P. vulgaris* cv Radical na atividade das  $\alpha$ -amilases de *T. solanivora*, a fim de verificar uma possível diferença na atividade inibitória das proteínas provenientes das duas diferentes espécies de feijão. Os resultados (Fig. 2.3.3.2) mostraram que o inibidor de *P. vulgaris* não causa inibição em pH 9,0, mas causa inibição de 87% da atividade da  $\alpha$ -amilase em pH 6,0.



**Figura 2.3.3.2.** Inibição das  $\alpha$ -amilases de *T. solanivora* na presença do inibidor cru proveniente de sementes de *P. vulgaris* cv. Radical e *P. coccineus* 35619, em pH 6.0. A enzima-alvo e o inibidor foram pré-incubados durante 15 minutos antes da adição do amido. Cada um dos pontos representa a média de três ensaios de atividade. As barras representam dois valores do desvio padrão.

O inibidor obtido de sementes *P. coccineus* 35619 apresentou uma inibição de 78% em pH 6.0. O gene para o inibidor de  $\alpha$ -amilase de *P. vulgaris* ( $\alpha$ AI-1), o qual é um potente inibidor das  $\alpha$ -amilases digestivas de insetos, é, sem dúvida, uma importante ferramenta com potencial para produzir plantas transgênicas com resistência a insetos.

#### 2.4. Discussão

As análises feitas com as  $\alpha$ -amilases digestivas indicam que o inseto *T. solanivora* expressa diversas isoformas de  $\alpha$ -amilases, similares às que já foram encontradas em outros insetos-praga como: *C. maculatus*, *H. hampei* e *P. truncatus* (Campos *et al.*, 1989; Valencia *et al.*, 2000; Mendiola-Olaya *et al.*, 2000). Os pontos isoelétricos determinados por meio de Phastgel nativo e de focalização isoelétrica (IEF) foram diferentes dos relatados para as  $\alpha$ -amilases de outros insetos. Por exemplo, três  $\alpha$ -amilases reportadas previamente em *H.*

*hampei* têm pontos isoelétricos mais ácidos (Valencia *et al.*, 2000). Similarmente, o ponto isoelétrico da principal  $\alpha$ -amilase isolada de *P. truncatus* é 4.7 (Mendiola-Olaya *et al.*, 2000).

Os resultados mostram que as  $\alpha$ -amilases presentes no intestino de larvas de *T. solanivora* têm um pico ótimo de atividade em pH alcalino, o que é consistente com o pico de atividade reportado para outras espécies de lepidópteros (Abraham *et al.*, 1992; Markwick *et al.*, 1996). Entretanto, as  $\alpha$ -amilases digestivas de diversos insetos da ordem *Coleoptera* são muito ativas em pH ligeiramente ácido. Como exemplo, pode-se citar as  $\alpha$ -amilases obtidas de larvas de *H. hampei*, que mostram um pico ótimo de atividade em pH 5.0 (Valencia *et al.*, 2000); um ótimo pH entre 5.2 e 5.4 para *C. chinensis* (Podoler e Applebaum, 1971), e para *T. castaneum* (Applebaum e Konijn, 1965); pH 6.0 para a  $\alpha$ -amilase de *Prostephanus truncatus* (Mendiola-Olaya *et al.*, 2000); pH 4.5 e 5.5 para *Sitophilus zeamais* e *S. granarius*, respectivamente (Padeiro, 1983).

Alguns autores tais como Biggs e McGregor (1996), têm indicado a importância de se ter informações a respeito do pH no trato intestinal do inseto alvo, assim como do pH ótimo para a atividade de uma  $\alpha$ -amilase digestiva. Caso seja necessário usar um inibidor de  $\alpha$ -amilase contra *T. solanivora*, o inibidor deve inibir a enzima substancialmente no pH encontrado no trato digestivo do inseto e, além disso, deve ser efetivo em baixa concentração. Baseado nas provas de inibição feitas com  $\alpha$ -amilases digestivas de *T. solanivora*, é possível acreditar que os inibidores provenientes de *P. coccineus* e de *P. vulgaris* são candidatos mais promissores para a transformação da batata do que o inibidor do amaranto. Neste contexto, é importante comentar que o inibidor de amaranto sempre mostrou uma inibição elevada em pH alcalino.

É bem conhecido que a máxima formação do complexo entre a  $\alpha$ -amilase e o inibidor é dependente do pH, evidenciando uma melhor inibição em valores de pH entre 4.0 e 5.5 (Powers and Whitaker, 1977; Lajolo and Finardi-Filho, 1985) e pouca formação do complexo em pH 7.0 ou em valores de pH ainda mais elevados.

Um trabalho recente feito por nosso grupo, em colaboração com o grupo do Dr. M.J. Chrispeels (Universidade da Califórnia, San Diego, EUA), mostra que o inibidor  $\alpha$ AI-1 do feijão é mais potente inibindo a atividade de  $\alpha$ -amilases digestivas de *H. hampei* do que o inibidor amaranto (Valencia *et al.*, 2000), provavelmente porque, neste caso, o complexo enzima-inibidor (EI) tem um Kd mais baixo.

Em nossa opinião, esta é uma clara indicação do grau elevado de especificidade dos inibidores de  $\alpha$ -amilase, os quais reconhecem de maneira específica as  $\alpha$ -amilases dos diferentes insetos. É de interesse particular não só a exata determinação do pH ótimo para a formação do complexo entre o inibidor de amaranto e as  $\alpha$ -amilases digestivas de *T. solanivora*, mas também saber se todos estes inibidores têm mostrado resistência ao ataque das proteases intestinais do inseto. Dessa forma, será possível determinar qual é o melhor inibidor de  $\alpha$ -amilase que pode ser usado para a transformação da batata, visando obter uma cultura que consiga se proteger dos graves danos causados pelo inseto *T. solanivora*.

## **CAPITULO 3 - Caracterização parcial de enzimas proteolíticas intestinais de larvas de broca gigante da cana, *Telchin licus*.**

### **3.1. Resumo do terceiro Capítulo**

A fim de caracterizar a atividade de proteases digestivas em larvas de *T. licus*, intestinos de larvas de último estágio foram embebidos em tampão adequado, homogeneizados e centrifugados. O sobrenadante contendo as proteases intestinais de *T. licus* (extrato intestinal) foi coletado e congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ , até o uso. As atividades de quimotripsina e de tripsina do extrato intestinal foram determinadas por métodos espectrofotométricos já descritos. Os ensaios da atividade de quimotripsina e de tripsina do extrato intestinal, na presença de inibidores químicos, foram feitos utilizando-se o inibidor PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*). A atividade de leucina-aminopeptidase (LAP) foi medida utilizando-se um substrato sintético, em combinação com o cromóforo *Fast Black K*. Quanto à atividade de enzimas intestinais de larvas de *T. licus*, concluiu-se, por meio dos presentes estudos, que: (i) a atividade de tripsina representa 30% da atividade de quimotripsina; (ii) ambas as atividades foram completamente inibidas na presença de PMSF 2 mM; (iii) a atividade de LAP é considerável e sua cinética de atividade é linear durante os primeiros quatro minutos, nas condições testadas; e (iv) a atividade de LAP é uma função linear da quantidade de proteínas intestinais de larvas de *T. licus*. Portanto, as quimotripsinas e as LAPs intestinais de *T. licus* são candidatos promissores na busca de inibidores com potencial para controlar essa praga. Em ensaios futuros, a caracterização da atividade de serina-proteases intestinais será também avaliada por zimogramas. A caracterização da atividade de cisteína-proteases intestinais será também realizada, a fim de avaliar quão promissoras seriam as estratégias da utilização de inibidores específicos contra as cisteína-proteases intestinais da larva para o controle da praga.



## **3.2. Material e Métodos**

### **3.2.1. Insetos**

Larvas de *T. licus* foram coletadas em campos agrícolas de cana-de-açúcar (*Sacharum officinarum* L.) da Região Nordeste do Brasil. As larvas foram mantidas em fragmentos de colmo de cana e acondicionadas em câmara de crescimento.

### **3.2.2. Obtenção dos extratos intestinais**

Para a caracterização de proteases de *T. licus*, tratos intestinais foram removidos de larvas e colocados em tampão de atividade. Os intestinos foram homogeneizados (1 intestino/200 µL de tampão de atividade) e então centrifugados a 10.000g, durante 30 minutos, e o sobrenadante foi estocado a -80° C até o uso.

### **3.2.3. Determinação da concentração de proteínas**

A concentração de proteínas nos extratos intestinais foi medida de acordo como método de Bradford (1976). A albumina de soro bovino foi usada como padrão.

### **3.2.4. Ensaio de atividade de quimotripsina**

O tampão de reação consistiu de Tris-HCl 0,5M, pH 8,0, contendo CaCl<sub>2</sub> 0,68M e metanol 35%. Uma unidade de atividade de quimotripsina foi definida como sendo o incremento de 0,01 na absorbância por minuto, a 36° C, sob as condições experimentais adotadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando-se os devidos controles negativos.

### **3.2.5. Ensaio de atividade de tripsina**

O tampão de reação consistiu de Tris-HCl 0,15M, pH 8.1, contendo CaCl<sub>2</sub> 0,05M. Os ensaios enzimáticos foram realizados de acordo com Schwertz e Takenaka (1955). Uma unidade de atividade de tripsina foi definida como sendo o incremento de 0,01 na absorbância por minuto, a 36° C, sob as condições experimentais adotadas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, utilizando-se os devidos controles negativos.

### **3.2.6. Ensaio de atividade de leucina-aminopeptidase (LAP)**

A atividade de LAP foi medida com o uso do substrato sintético L-leucil-2-naftilamida. Para o ensaio enzimático, o substrato sintético e o cromóforo *Fast Black K* foram diluídos em tampão fosfato 100 mM, pH 7.0, contendo 0,5mM de MgCl<sub>2</sub>. Inicialmente foram misturados 200 µL de tampão 100 mM, pH 7.0 e 5 µL de extrato intestinal (equivalente a 0.025g de intestino) e pré-incubados a 36° C durante 15 minutos, depois dos quais foram adicionados 5 µL de *Fast Black K* 24 mM. As reações foram iniciadas pela adição de 5 µL do substrato sintético L-leucil-2-naftilamida 14 mM e levado para incubação a 36° C durante 5 minutos, no escuro. A atividade de LAP foi medida pelo monitoramento da reação a 590 nm. Para a medição de absorbância a 590 nm, foi utilizado um espectrofotômetro Unicam UV2. Para todos os ensaios, três ensaios independentes foram feitos.

### **3.2.7. Substratos e inibidores de proteases**

A atividade de serina-proteases foi testada utilizando-se o substrato BTEE (N-benzoil-tiretil éster) para proteases tipo quimotripsina e utilizando-se o substrato BAEE (N-benzoil-l-arginina etil éster) para proteases tipo tripsina. Ambas proteases foram incubadas na presença do inibidor de proteases PMSF (*Phenylmethanesulfonyl fluoride*). Os substratos foram dissolvidos de acordo com as instruções do fabricante.

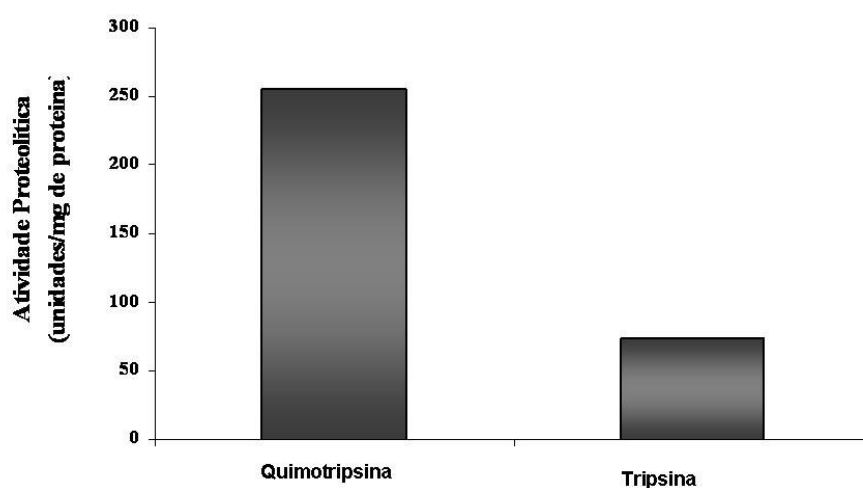
O substrato BTEE foi usado na concentração final de 5 mg/10 mL de tampão de atividade (1.6mM), enquanto o substrato BAEE foi usado na concentração final de 5 mg/500 µL de tampão de atividade (0.03M). Cada ensaio foi realizado em triplicata e as médias das atividades proteolíticas estão apresentadas nas figuras.

### 3.3. Resultados e Discussão

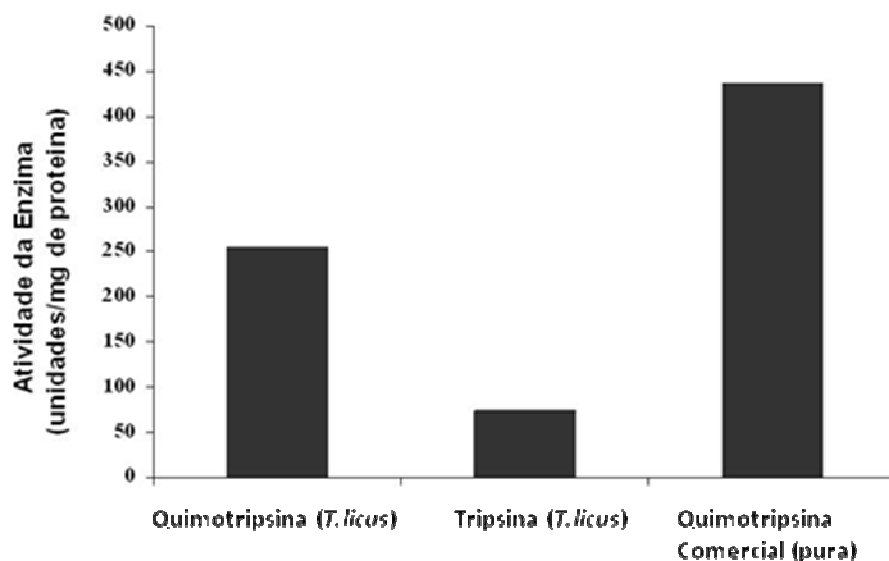
#### 3.3.1. Atividade de quimotripsina e tripsina

Os ensaios enzimáticos feitos com extratos intestinais de *T. licus* mostraram a presença de atividade específica de quimotripsina da ordem de 255,70 unidades/mg de proteína e de atividade específica de tripsina da ordem de 73,90 unidades/mg de proteína (Figura 3.3.1a). A atividade endógena de tripsina de tratos intestinais de *T. licus* representa cerca de 30% da atividade endógena de quimotripsina digestiva do inseto. Ambas as atividades enzimáticas endógenas foram comparadas com a atividade de preparações de quimotripsina pura comercial, que contém 436,30 unidades/mg de proteína (Figura 3.3.1b).

A



**B**



**Figura 3.3.1.** Atividades específicas de quimotripsina e de tripsina. **A.** Atividades específicas de quimotripsina e de tripsina endógenas de extratos intestinais de larvas de *T. licus*. **B.** Atividades específicas de quimotripsina e de tripsina endógenas de extratos intestinais de larvas de *T. licus* comparadas à atividade específica de quimotripsina pura comercial, usada como controle. Em todos os ensaios, uma unidade foi definida como sendo o incremento de 0,001 na absorvância a 590 nm por minuto, a 36° C. Cada ensaio enzimático foi feito em triplicata e as médias das atividades proteolíticas observadas são apresentadas nas figuras.

### 3.3.2. Efeito de inibidores de proteases *in vitro*

As atividades de quimotripsina e tripsina de extratos intestinais de larvas de *T. licus* foram testadas na presença de PMSF (Phenylmethyl sulphonyl fluoride). Ambas as atividades de quimotripsina e de tripsina foram 100% inibidas pelo inibidor PMSF (dados não mostrados).

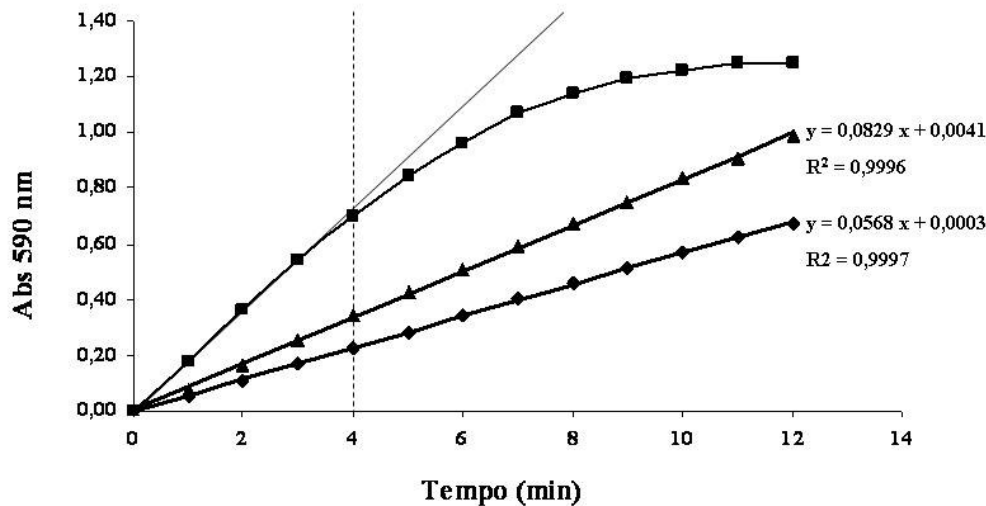
### 3.3.3. Atividade de leucina-aminopeptidase (LAP)

Diversos métodos enzimáticos para a detecção da atividade de LAP foram descritos previamente, sendo os mais adotados: (i) detecção de absorvância a 405 nm do produto de

reação *p*-nitroanilina (Arima *et al.*, 2005; Nisbet e Billingsley, 2002; Cristofolletti *et al.*, 2003); (ii) medições espectrofotométricas contínuas a 412 nm da hidrólise de L-leucina tiobenzil éster, na presença de 5,5-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (Beattie *et al.*, 1987); e (iii) hidrólise de substratos peptidil fluoro-gênicos (Mccarthy *et al.*, 2004). Apesar de esses ensaios serem devidamente funcionais, são muito laboriosos e em alguns casos, geram um significativo ruído, além de demandarem demasiado tempo para a sua realização.

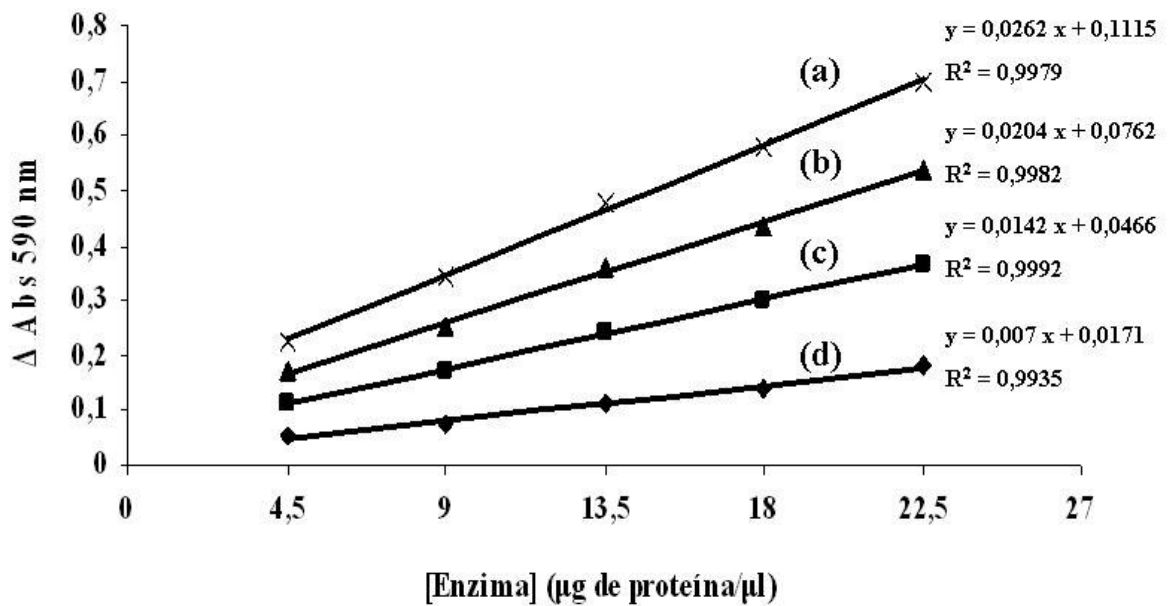
Ademais, não há muitos ensaios espectrofotométricos para testar atividade de LAP que permitam testar a enzima sob diferentes condições biológicas e na presença de compostos naturais interferentes. Nossos estudos iniciais foram feitos a fim de estabelecer condições ótimas de determinação de 2-naftilamina derivada de L-leucil-2-naftilamida na presença de LAP. No nosso ensaio espectrofotométrico, 5 µL de extrato intestinal de larva de *T. licus* foram adicionados a 0,2 mL de tampão fosfato (100 mM; pH 7.0) e então pré-incubados durante 15 minutos a 36° C. Depois da adição de 5 µL de *Fast Black K* 24 mM, a reação foi iniciada pela incorporação de 5 µL de L-leucil-2-naftilamida 14 mM.

Como mostrado na Figura 3.3.3.1, o desenvolvimento da coloração do complexo formado entre 2-naftilamina e *Fast Black K* ocorre em menos de 10 minutos na presença de 5 µL (22,5 µg de proteína total) de extrato intestinal de larva de *T. licus*. A curva do progresso de absorvância indica que ocorreu uma rápida conversão do substrato L-leucil-2-naftilamida no início da reação enzimática e subsequente decréscimo da taxa de conversão do substrato levando a um platô no fim da curva. Os valores de absorvância a 590 nm aumentaram linearmente na curva entre o tempo zero e 4 minutos da reação enzimática, porém a curva exibiu valores decrescentes (curvatura descendente) em tempos superiores a 4 minutos de reação. Baseando-se nesses resultados, estabeleceu-se um protocolo no qual a coloração se desenvolve durante os primeiros 4 minutos de reação.



**Figura 3.3.3.1** Atividade leucina-aminopeptidase (LAP) do trato intestinal de larvas de *T. licus* determinada com o substrato sintético L-leucil-2-naftilamida. Ensaio padrão (Michaelis-Menten): 0,2mL de tampão fosfato 100 mM, pH 7,0, contendo 5 µL de extrato intestinal (equivalente a 0,025 do intestino) pré-incubado durante 15 minutos a 36° C, e 5 µL de *Fast Black K* 24 mM. Após a subsequente adição de 5 µL de L-leucil-2-naftilamida 14 mM, mudanças nos valores de absorvância a 590 nm foram registradas. (▲) Corresponde a 3 µL de extrato intestinal enzimático. (■) Corresponde a 1 µL de extrato intestinal enzimático.

Em um ensaio subsequente, o efeito da concentração da enzima intestinal na conversão enzimática *in vitro* de L-leucil-2-naftilamida foi examinada sob diferentes tempos da reação. Nesse ensaio, a mudança total na absorvância a 590 nm foi registrada para quatro ensaios espectrofotométricos padrão, separadamente. Em todos os tempos testados, a taxa inicial de hidrólise de L-leucil-2-naftilamida medida espectrofotometricamente pela liberação de 2-naftilamina foi uma função linear da quantidade de proteína do trato intestinal de larvas de *T. licus* (Figura 3.3.3.2). É muito importante ressaltar que a atividade enzimática sobre L-leucil-2-naftilamida não foi afetada pela adição de *Fast Black K*, feita no primeiro passo da reação enzimática.



**Figura 3.3.3.2.** Curva do progresso da absorvância a 590 nm ( $\Delta Abs.$  590 nm) em função da concentração da enzima leucina-aminopeptidase (LAP) do intestino de larvas de *T. licus*. Os valores das taxas foram determinados para quatro tempos de reação. A atividade de LAP intestinal de larvas de *T. licus* foi determinada com o uso do substrato sintético L-leucil-2-naftilamida. Após a adição de 5  $\mu L$  de L-leucil-2-naftilamida 14 mM, a reação enzimática prosseguiu até 4 minutos, e a partir de então a absorvância a 590 nm foi registrada. As curvas da figura mostram o resultado de regressão linear dos dados obtidos. (a), (b), (c) e (d) correspondem, respectivamente, a 4, 3, 2 e 1 minuto (s) de reação enzimática.

## V- CONCLUSAO GERAL

Baseados nos resultados obtidos no presente trabalho e possível afirmar que quase a totalidade das diferentes sementes de *P. coccineus* que foram avaliadas, contém numerosas isoformas de inibidores de  $\alpha$ -amilase, as quais poderiam ser usadas na geração de culturas de batata e café com resistência a lagarta de batata, *T. solanivora* e a broca de café, *H. hampei* respectivamente, mediante o uso de técnicas de transformação de plantas. As sementes de *P. coccineus* testadas no presente trabalho apresentam maior atividade inibitória contra as  $\alpha$ -amilases da broca do café, *H. hampei* quando comparada com a inibição gerada pelos inibidores presentes nas sementes do feijão comum, *P. vulgaris*. Este fato faz dos inibidores de  $\alpha$ -amilase presentes nas sementes de *P. coccineus* uma ferramenta bastante útil na procura de plantas de café com resistência ao inseto praga.

E muito importante ressaltar que e preciso um maior estudo dos fatores que afetam a interação do inibidor com a enzima alvo, dado que foi mostrado claramente no presente trabalho, que as diferenças em quanto a os efeitos inibitórios obtidos com as proteínas parcialmente purificadas do feijão, tem sido geradas por diferenças de afinidade entre o inibidor e a  $\alpha$ -amilase, especialmente quando o pH mudou. Alem disso, e claro que as proteases presentes no trato digestivo dos insetos alvo podem gerar uma inativação rápida do inibidor de  $\alpha$ -amilases ( $\alpha$ -AI), gerando uma quase completa abolição da atividade biológica deste inibidor, o qual poderia se constituir numa grande dificuldade na hora que o inibidor inicie a sua atividade biológica nas condições do trato digestivo do inseto. Neste contexto, e importante ressaltar que uma completa inibição da atividade biológica de uma  $\alpha$ -amilase de um inseto depende não somente da potência do inibidor, mas também da sua resistência natural à digestão proteolítica que acontece pela atividade natural das proteases intestinais do inseto alvo.



Neste trabalho se reporta por primeira vez a presença no trato digestivo da lagarta da batata, numerosas isoformas de  $\alpha$ -amilase altamente ativas na digestão do amido, as quais poderiam ser alvo de inibição por parte dos inibidores de  $\alpha$ -amilase presentes nas sementes de *P. coccineus* e *Amaranthus* spp. Os resultados obtidos no presente trabalho, indicam que o inibidor purificado das sementes de amaranto não teve efeito inibitório na atividade da enzima em pH 6.0, mas mostrou elevada atividade inibitória em pH 9.0, que é o pH ótimo para a ação desta enzima. Este é um fato importante que condicionaria o uso e a atividade biológica de um inibidor de  $\alpha$ -amilase na hora que precise atuar dentro do trato digestivo do inseto.

Caso seja necessário usar um inibidor de  $\alpha$ -amilase para o controle da lagarta da batata, o inibidor deveria inibir a enzima substancialmente no pH biológico encontrado no trato digestivo do inseto e, além disso, deve ser efetivo em baixa concentração. A inclusão de um inibidor de protease em conjunto com o inibidor de  $\alpha$ -amilase poderia gerar um maior nível de resistência da planta ao ataque do inseto-praga. É importante comentar que o inibidor de amaranto sempre mostrou uma inibição elevada em pH alcalino quando comparado com o pH ótimo de atividade para o inibidor obtido das sementes de *P. coccineus*. Queda bem evidenciado neste trabalho que a máxima formação do complexo entre uma  $\alpha$ -amilase e o inibidor vai depender muito do pH encontrado no trato intestinal do inseto. Não considerar este fato na hora de selecionar um inibidor para o controle de um inseto-praga, poderia gerar um fracasso total da planta transformada com o inibidor de  $\alpha$ -amilase expresso. Por outro lado, os ensaios enzimáticos feitos com extratos intestinais de *T. licus* mostraram a presença de atividade quimotripsina e de atividade tripsina. Esta última atividade enzimática representa cerca de 30% da atividade endógena de quimotripsina digestiva presente nos tratos intestinais do inseto.

Baseado neste importante fato, o controle do inseto mediante o uso de inibidores de protease deveria mesmo ser encaminhado preferencialmente para o uso de inibidores de quimotripsina, o então, o uso de inibidores bifuncionais contra as duas atividades enzimáticas. Além da detecção da atividade de proteases presentes no intestino da broca gigante da cana, foi possível também a detecção da atividade total de leucina-aminopeptidase (LAP), mediante o uso de uma técnica espectrofotométrica nova desenvolvida durante a execução deste trabalho, que combina o substrato sintético L-leucil-2-naftilamida e o cromóforo *Fast Black K*. A técnica desenvolvida para a detecção desta peptidase é muito mais rápida de executar, quando comparada com outras técnicas previamente reportadas na literatura. A técnica aqui reportada poderia inclusive ser de utilidade em estudos de interação de aminopeptidases, as quais se sabem atuam como receptores específicos de toxinas Cry obtidas de *Bacillus thuringiensis*. Um método para a detecção da atividade LAP, como o apresentado neste trabalho, poderia ser de grande utilidade no estudo da interação destas duas proteínas de interesse biológico. De outro lado, os dados aqui apresentados constituem uma valiosa ajuda no desenho de estratégias voltadas a geração de plantas resistentes aos insetos-praga estudados. Numa próxima etapa, diferentes isoformas tanto dos inibidores como das  $\alpha$ -amilases serão purificadas visando o estudo, ainda mais detalhado dos fatores que favorecem e controlam a interação destas duas proteínas no trato digestivo do inseto alvo. Além disso, vai ser preciso iniciar o estudo de inibidores específicos da atividade de proteases endógenas e seus inibidores visando à geração de plantas com maiores níveis de resistência ao inseto-praga. Fazendo uso de primers específicos se procedera à clonagem não só das  $\alpha$ -amilases digestivas, mais também dos inibidores de  $\alpha$ -amilase com maior potencial para a geração de plantas resistentes aos insetos alvo de controle. Um trabalho neste sentido encontra-se em desenvolvimento no laboratório de interação molecular Planta-Praga (LIMPP) do CENARGEN, liderado pela Dra. Fátima Grossi de Sá.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, J. I., Sidenius, U. and Svensson, B. (1993) Arginine is essential for the  $\alpha$ -amylase inhibitory activity of the  $\alpha$ -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. *Biochem. J.* 293, 151-155.
- Abraham, E.G., J. Nagaraju, and R.A. Datta. (1992) Biochemical studies of amylases in the silkworm, *Bombix mori* L.: comparative analysis in diapausing and non-diapausing strains. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 22, 867-873.
- Applebaum, S.W. (1964) The action pattern and physiological role of *Tenebrio* larval amylase. *J. Insect Physiol.* 10, 897-906.
- Applebaum, S.W., and A.M. Konijn. (1965) The utilization of starch by larvae of the flour beetle, *Tribolium castaneum*. *J. Nutr.* 85, 275-282.
- Arima, J.; Uesugi, Y.; Iwabuchi, M.; Hatanaka, T. (2005) Alteration of leucine aminopeptidase from *Streptomyces septatus* TH-2 to phenylalanine aminopeptidase by site-directed mutagenesis, *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, p.7229–7235.
- Baker, P.S. (1984) Some aspects of the behavior of the coffee berry borer in relation to its control in Southern Mexico (Coleoptera: Scolytidae). *Fol. Entomol. Mex.* 61: 9-24.
- Baker, J.E. (1991) Purification and partial characterization of  $\alpha$ -amylase allozymes from the lesser grain borer, *Rhizopertha dominica*. *Insect Biochem.* 21(3), 303-311.
- Baker, P.S., Ley, C., Balbuena, R. & Barrera, J.F. (1992) Factors affecting the emergence of *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae) from coffee berries. *Bulletin of Entomological Research* 82, 145–150.
- Baker, P. S. Colombia Coffee IPM. (1999) *Biocontrol News and Information*, v.20, p.72-73.

- Baker, P.S., Jackson, J.A.F. & Murphy, S.T. (2002) Natural enemies, natural allies. Project completion report of the integrated management of coffee berry borer project, CFC/ICO/02 (1998–2002). The commodities press. CABI commodities, Egham UK and Cenicafe, Chinchina, Colombia.
- Baldwin, I. T. (2001) An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. *Plant Physiology*, v.127, n.4, p.1449-58.
- Beattie, R. E.; Guthrie, D. J. S.; Elmore, D. T.; Williams, C. H.; Walker, B. (1987) An improved spectrophotometric assay for leucine aminopeptidase. *Biochemistry Journal*, v.242, p.281-283.
- Bergamin, J. (1943) Contribuição ao conhecimento da biologia da broca do café (*Hypothenemus hampei*). Ferrari. 1867. *Arquivos do Instituto Biológico* 14, 31–72.
- Biggs, D.R., and P.G. McGregor. (1996) Gut pH and amylase and protease activity in larvae of the New Zealand grass grub (*Costelyra zealandica*; Coleoptera: Scarabaeidae) as a basis for selecting inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 69-75.
- Blanco-Labra, A., Cardoso, L. S., Olaya, E. M., Rodriguez, S. V., López, M. G. (1996) Purification and characterization of glycoprotein alpha-amylase inhibitor from tepary bean seeds (*Phaseolus acutifolius* A. Gray). *J. Plant Physiol.* 149, 650-656.
- Bloch Jr, C. and Richardson, M. (1991) A new family of small (5 kD) protein inhibitors of insect  $\alpha$ -amylase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) have sequence homologies with wheat  $\gamma$ -purothionins. *FEBS Lett.* 279, 101-104.
- Bode, W., Geyerling, H. J., Huber, R., Otlewski, J. and Wilusz, T. (1989) The refined 2.0 Å X-ray crystal structure of the complex formed between bovine trypsin and CMTI-I, a trypsin inhibitor from squash seeds (*Cucurbita maxima*). Topological similarity of the squash seed inhibitors with the carboxypeptidase A inhibitor from potatoes. *FEBS Lett.* 242, 285-292.

- Bompard-Gilles, C., Rousseau, P., Rouge, P., Payan, F. (1996) Substrate mimicry in the active center of a mammalian  $\alpha$ -amylase structural analysis of an enzyme-inhibitor complex. *Structure* 4, 1441-1452.
- Botero, E.M.E., Londono, Z.M.E., Trillos, G.O., Arias, R.J.A. & Jaramillo Pelaez, J.A. (1995) Detection of the Potato Moth *Tecia solanivora* in the Department of Antioquia (Colombia). 19 pp. Medellin, Colombia, ICA-CORPOICA.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254,
- Buonocore, V., Poerio, E., Pace, W., Petrucci, T., Silano, V. and Tomasi, M. (1976) Interaction of *Tenebrio molitor* L.  $\alpha$ -amylase with wheat our protein inhibitor. *FEBS Lett.* 67, 202±206.
- Campos, F.A.P., J. Xavier-Filho, C.P. Silva, and M.B. Ary. (1989) Resolution and partial characterization of proteinases and  $\alpha$ - amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F). *Comp. Biochem. Physiol. B. Comp. Biochem.* 92, 51-57.
- Chagolla-López, A., Blanco-Labra, A., Pathy, A., Sánchez, R., Pongor, S. (1994) A novel alpha-amylase inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypocondriacus*) seeds. *Journal of Biological Chemistry* 269, 23675-23680.
- Chen, M. S., Feng, G., Zen, K. C., Richardson, M., Valdes-Rodriguez, S., Reek, G. R., Kramer, K. J. (1992)  $\alpha$ -Amylases from three species of stored grain coleoptera and their inhibition by wheat and corn proteinaceous inhibitors. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 22: 261-268.

- Chen, M.; Johnson, B.; Wen, L.; Muthukrisnan, S.; Kramer, K.; Morgan, T.; Eeck, G. (1992) 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.
- Chrispeels, M. J., Raikhel, N. V. (1991) Lectins, lectin genes and their role in plant defense. *Plant Cell*. 3: 1-19.
- Chrispeels, M. J.; Groosi de Sá, M.F.; Higgins, T.J.V. (1998) Genetic engineering with  $\alpha$ -amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. *Seed Science Research*, v.8, p.257-263.
- Cristofolletti, P. T.; Ribeiro, A. F.; Deraison, C.; Rahbe, Y.; Terra, W. R. (2003) Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology*, v.49, p.11-24.
- Cure, J.R, R.H.S. Santos, J.C. Moraes, E.F. Vilela & A.P. Gutierrez. (1998) Fenologia e dinâmica populacional da broca do café *Hypothenemus hampei* (Ferr.) relacionadas às fases de desenvolvimento do fruto. *An. Soc. Entomol. Brasil* 27: 325-335.
- Dayler, C.S.A.; Mendes, P.A.M.; Prates, M.V.; Bloch Jr, C. Franco, O.L. & Grossi de Sa, M.F. (2005) Identification of a novel bean  $\alpha$ -amylase inhibitor with chitinolytic activity. *FEBS Letters*, 579 (25) 5616-2560.
- De Muner, L.H.; Martins, D. dos S.; Fornazier, M.J.; Arleu, R.J.; Benassi, V.L.R.M. (2000) Programa de manejo da broca-do-café no Estado do Espírito Santo. EMCAPER (Documentos). Vitória/ES, p.6.
- Doane, W.W. (1969) Amylase variants in *Drosophila melanogaster*: linkage studies and characterization of enzyme extracts. *J. Exp. Zool.* 171, 321-342.
- Esquivel, E.A. (1980) Basic studies on sugarcane resistant varieties to the giant borer *T. licus* Drury in Panamá. *Entomol. News* 1. 8: 8-9.

- Finardi-Filho, F., Mirkov, T. E. and Chrispeels, M.J. (1996) A putative precursor protein in the evolution of the bean  $\alpha$ -amylase inhibitor. *Phytochemistry* 43, 57-62.
- Feng, G. H., Richardson, M., Chen, M. S., Kramer, K. J, Morgan, T. D. and Reeck, G. R. (1996)  $\alpha$ -Amylase inhibitors from wheat: a sequences and patterns of inhibition of insect and human  $\alpha$ -amylases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26, 419-426.
- Franco, O. L., Rigden, D. J., Melo, F. R., Bloch Jr, C., Silva, C. P. and Grossi de Sa , M. F. (2000) Activity of wheat  $\alpha$ -amylase inhibitors towards bruchid  $\alpha$ -amylases and structural explanation of observed specificities. *Eur. J. Biochem.* 267 (8), 1466-1473.
- Gatehouse, A. M. R.; Hilder, V. A.; Boulter, D. (1992) 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.
- Gatehouse, A.M.R., K.A. Fenton, I. Jepson, and D.J. Pavey. (1986) The effects of  $\alpha$ - amylase inhibitors on insect storage pests: inhibition of  $\alpha$ -amylase *in vitro* and effects on development *in vivo*. *J. Sci. Food Agric.* 37, 727-734.
- Giri, P. A., Kachole, S. M. (1996) Detection of electrophoretically separated amylase inhibitors in starch-polyacrylamide gels. *J. Chrom A.* 752: 261-264.
- Giri, P. A., Kachole, S. M. (1998) Amylase inhibitors of pigeonpea (*Cajanus cajan*) seeds, *Phytochemistry.* 47: 197–202.
- Grant, G., E.J. Edwards, and A. Pusztai. (1995) Alpha amylase inhibitors levels in seeds generally available in Europe. *J. Sci. Food Agric.* 67, 235-238.
- Grossi de Sa, M. F., Mirkov, T. E., Ishimoto, M., Colucci, G., Bateman, K. S., Chrispeels, M. J. (1997) Molecular characterization of a bean  $\alpha$ -amylase inhibitor that inhibits the  $\alpha$ -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*. *Planta* 203, 295-303.

- Grossi de Sa, M.F. and Chrispeels, M.J., (1997) Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*)  $\alpha$ -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 27, pp. 271–281.
- Hilder VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE, Barker RF, Boulter D (1987) A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 300: 160-163
- Iulek, J., Franco, O. L., Silva, M., Slivinski, C. T., Bloch Jr, C., Rigden, D. J. and Grossi de Sa, M. F. (2000) Purification, biochemical characterisation and partial primary structure of a new  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Secale cereale* (Rye). *Inter. J. Biochem.Cell Physiol.* 32, 1195-1204.
- Irie K, Hosoyama H, Takeuchi T, Iwabuchi K, Watanabe H, Abe M, Abe K, Arai S (1996). Transgenic rice established to express corn cystatin exhibits strong inhibitory activity against insect gut proteinases. *Plant Mol. Biol.* 30:149-157.
- Ishimoto, M., Chrispeels, M. J. (1996) Protective mechanism of the Mexican Bean Weevil against High levels of  $\alpha$ -amylase inhibitor in the common bean. *Plant Physiology.* 111: 393 – 401.
- Ishimoto, M., Kitamura, K. (1989) Growth inhibitory effects of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from kidney bean, *Phaseolus vulgaris* (L) on three species of bruchids (Coleoptera: Bruchidae). *Applied Entomology and Zoology* 24, 281-286.
- Ishimoto, M., Susuki, K., Iwanaga, M., Kikuchi, F., Kitamura, K. (1995) Variation of seed  $\alpha$ -amylase inhibitors in the common bean. *Theoretical and Applied Genetics* 90, 425-429.
- Jaramillo, J., C. Borgemeister and P. Baker. (2006) Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae): searching for sustainable control strategies. *Bulletin of Entomological Research* (2006) 96, 1–12.



- Jongsma, M. A.; Bolter, C. (1997) The adaptation of insects to plant protease inhibitors. *Journal Insect Physiology*, v.43, p.885-895.
- Kasahara, K., Hayashi, K., Arakawa, T., Philo, J. S., Wen, J., Hara, S. and Yamaguchi, H. (1996) Complete sequence, subunit structure and complexes with pancreatic  $\alpha$ -amylase of an  $\alpha$ -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney beans. *J. Biochem.* 120, 177-183.
- Klein-Koch, C., O. Spinosa, A. Tandazo, P. Cisneiros and D. Delgado. (1988) Factores naturales de regulacion y controle biologico de la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferr.). *San. Veg.* 3: 5-50.
- Krishna, S.S., and K. Saxena. (1962) Digestion and absorption of food in *Tribolium castaneum* (Herbst). *Physiol. Zoöl.* 53, 66-78.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lajolo, F.M., and F. Finardi-Filho. (1985) Partial characterization of the amylase inhibitor of black beans (*Phaseolus vulgaris*), variety Rico 23. *J. Agric. Food Chem.* 33, 132-138.
- Lecardonnell A, Chauvin L, Jouanin LO, Beaujean A, Prevost G, Sangwan-Novrreel B (1999). Effect of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. *Plant Sci.* 140:71-79.
- Lemos, F.J.A., F.A.P. Campos, C.P. Silva, and I. Xavier-Filho. (1990) Proteinases and amylases of larval midgut of *Zabrotes subfasciatus* (Boh) (Coleoptera: Bruchiidae) reared in Cowpea (*Vigna unguiculata* L.) seeds. *Entomol. Exp. Appl.* 56, 219-227.
- Lenney, J. F. (1975) Three yeast proteins that specifically inhibit yeast proteases A, B and Can. *J. Bacteriol.* 122: 1265-1273.
- Luján, Lauro. (1970) El cultivo de la batata en Colômbia. En: *Revista Agronomía Tropical*. Vol. XXVI. No. 6.

- Markwick, N.P., W.A. Laing, J.T. Christeller, S.T. Reid, and M.R. Newton. (1996)  $\alpha$ -Amylase activities in larval midgut extracts from four species of Lepidoptera (Tortricidae and Gelechiidae): Response to pH and to inhibitors from wheat, Barley, Kidney bean, and *Streptomyces*. J. Econ. Entomol. 89 (1), 39-45.
- Marshall, J.J., and C.M. Lauda. (1975) Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of  $\alpha$ -amylase, from the kidney bean *Phaseolus vulgaris*. J. Biol. Chem. 250, 8030-8037.
- Mazur, A.K., Haser, R. & Payan, F. (1994) The catalytic mechanism of  $\alpha$ -amylases based upon enzyme crystal structures and model binding calculations. Biochem. Biophys. Res. Com. 204, 297-302.
- Mccarthy, E.; Stack, C.; Donnelly, S. M.; Doyle, S.; Mann, V. H.; Brindley, P. J.; Stewart, M.; Day, T. A.; Maule, A. G.; Dalton, J. P. (2004) Leucine aminopeptidase of the human blood flukes, *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. International Journal of Parasitology, v.34, p.703-714.
- Melo, F. R., Sales, M. P., Silva, L. S., Franco, O. L., Bloch, C. Jr and Ary, M. B. (1999)  $\alpha$ -Amylase from cowpea seeds. Prot. Pept. Lett. 6, 387-392.
- Mendiola-Olaya, E., A. Valencia-Jiménez, S. Valdés-Rodríguez, J. Délano-Frier, and A. Blanco-Labra. (2000) Digestive amylase from the larger grain borer, *Prostephanus truncatus* Horn. Comp. Biochem. Physiol. B. 126, 425-433.
- Mendonça, A.F., J.A. Viveiros, & F. Sampaio Filho. (1996) A broca gigante da cana-de-açúcar, *T. licus* Drury, (Lepidoptera: Castniidae), p. 133–167. In A.F. Mendonça (ed.), Pragas da cana-de-açúcar. Maceió, Insetos & Cia, 239 p.
- Mendonça, A.F. (1996) Guia das principais pragas da cana-de-açúcar na América Latina e Caribe, p. 1 - 48. In A.F. Mendonça (ed.), Pragas da cana-de-açúcar. Maceió, Insetos & Cia, 239p.

- Mirkov, E. T., Wahlstrom, M. J., Hagiwara, K., Finardi-Filho, F. (1994) Evolutionary relationships among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin- $\alpha$ -amylase inhibitor family of the common bean and its relatives. *Plant. Mol. Biol.* 26: 1103-1113.
- Moreno, J., Chrispeels, M. J. (1989) A lectin gene encodes  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7885-7889.
- Morton, R.L., Schroeder, H.E., Bateman, K.S., Chrispeels, M.J., Armstrong, E. and Higgins, T.J.V., 2000. Bean  $\alpha$ -amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, pp. 3820–3825.
- Nisbet, A. J.; Billingsley, P. F. (2002) Characterization of aminopeptidase activity in scab mites (*Psoroptes spp.*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v.32, p.1123-1131.
- 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. Disponível em:  
<<http://www.bndes.gov.br/conhecimento/bnset/set1001.pdf>>.
- Pereira, R., Nogueira, J.A., Brilhante, O., Zangrando, E.L., Valencia-Jimenez, A. & Grossi-de-As, M.F. (2006). An  $\alpha$ -amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *Phytochemistry*, 67, 2009-2016.
- Piergiorganni, A. R., Sonnante, G., Della Gatta, C., Perrino, P. (1991) Digestive enzyme inhibitors and storage pest resistance in cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds. *Euphytica* 54: 191-194.
- Podoler, H., and S.W. Applebaum. (1971) The  $\alpha$ - amylase of the beetle *Callosobruchus chinensis*: Properties. *Biochem. J.* 121, 321-325.

- Pompermayer, P.; Lopes, A. R.; Terra, W. R.; Parra, J. R. P.; Falco, M. C.; Silva, M. C. (2001) Effects of soybean proteinase inhibitor on development, survival and reproductive potential of the sugarcane borer, *Diatrea saccharalis*. Entomol. Exp. Appl. v. 99, p.79-85.
- Powers, J. R., Culbertson, J. D. (1983) Interaction of a purified bean (*Phaseolus vulgaris*) glycoprotein with an insect amylase. Cereal Chemistry. 60, 427-429.
- Powers, J. R., Whitaker, J. R. (1977) Effect of several experimental parameters on combination of red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*)  $\alpha$ -amylase inhibitor with porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase. Journal of Food Biochemistry 1, 239-260.
- Pueyo, J. J., Dale, C.H., Chrispeels, M. J. (1993) Activation of Bean (*Phaseolus vulgaris*)  $\alpha$ -amylase inhibitor requires proteolytic processing of the proprotein. Plant Physiology. 101: 1341–1348.
- Pueyo, J. J., Morgan, T. D., Ameenuddin, N., Liang, C., Reek, G. R., Chrispeels, M. J. (1995) Effects of bean and wheat  $\alpha$ -amylase inhibitors on  $\alpha$ -amylase activity and growth of stored product insect pests. Entomol. Exper. Appl. 75: 237-244.
- Ryan, C. A. (1990) Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 28, 425-449.
- Reis, M. C., Calvet, M. M., Sales, V. K., Valdirene, G. M., Xavier-Filho, J. (1997)  $\alpha$ -Amylase inhibitors of legume seeds and their involvement in the resistance to bruchid beetles. Arq. Biol. Tecnol. 40 (2): 413-418.
- Rodriguez, B. A. (1996) Plagas de la papa. En: Vademécum del cultivo de la papa. FEDEPAPA. 18-18 p.
- Salazar, M.R., Arcila, J., Riano, N. & Bustillo, A.E. (1993). Crecimiento y desarrollo del fruto de café y su relacion com la broca. Avance Tecnico No. 194, Cenicafe, Chinchina, Colombia.

- Sayyed, A. H., Haward, R., Herrero, S., Ferre, J. and Wright, D. J. (2000) Genetic and biochemical approach for characterization of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac in a field population of the diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Appl Environ Microbiol* 66, 1509-16.
- Schwartz, G. W.; Takenaka, Y. (1955) A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochimica Biophysica Acta*. V.16, p.570–575.
- Shade, R. E., Pratt, R. C., Pomeroy, M. A. (1987) Development and mortality of the bean weevil, *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae), on mature seeds of tepary beans, *Phaseolus acutifolius*, and common beans, *Phaseolus vulgaris*. *Environ. Entomol.* 16: 1067-1070.
- Shade, R.E., Schroeder, H.E., Pueyo, J.J., Tabe, L.L., Murdock, T.J.V., Higgins, M.J. & Chrispeels, M.J. (1994) Transgenic pea seeds expressing the  $\alpha$ -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles. *Bio/Technol.* 12, 793-796.
- Schroeder HE, Gollasch S, Moore A, Tabe LM, Craig S, hardie DC, Chrispeels MJ, Spencer D, Higgins TJV (1995). Bean  $\alpha$ -amylase inhibitors confers resistance to pea weevil (*Bruchus pisorum*) in transgenic peas (*Pisum sativum* L.) *Plant Physiol.* 107:1233-1239.
- Silano, V., M. Furia, L. Gianfreda, A. Macri, R. Palescandolo, A. Rab, V. Scardi, E. Stella, and F. Valfr. (1975) Inhibition of amylases from different origins by albumins from the wheat kernel. *Biochim. Biophys. Acta.* 391, 170-178.
- Silano, V. (1987)  $\alpha$ -Amylase inhibitors. In *Enzymes and Their Role in Cereal Technology* (Kruger, J. & Lineback, D., eds), pp. 141-199. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MD, USA.

- Silva, C.P., Terra, W.R., Xavier-Filho, J., Grossi-de-Sa, M.F., Lopes, A.R. & Pontes, E.G. (1999) Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera:Bruchidae) with emphasis on alpha-amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 355-366.
- Souza, J. C.; Reis, P. R. (1997) Broca-do-café: histórico, reconhecimento, biologia, prejuízos, monitoramento e controle. EPAMIG, 40p. (Boletim Técnico nº 50).
- Souza, J.C. y Reis, P.R. (1993) Broca-do-café: histórico, reconhecimento, biología, prejuizos, Monitoramento e controle. Belo Horizonte. Brasil. EPAMIG, Boletín Técnico, Nº 40. 28p.
- Strobl, S., Maskos, K., Betz, M., Wiegand, G., Huber, R., Gomis-Ruth, F.X. and Glockshuber, R. (1998) Crystal structure of yellow mealworm  $\alpha$ -amylase at 1.64 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 278, 617-628.
- Tiffin, P.; Gaut, B. S. (2001) Molecular evolution of the wound-induced serine protease inhibitor *Wip1* in *Zea* and related genera. *Mol. Biol. Evol.* 18, 2092-2101.
- Titarenko, E. & Chrispeels, M.J. (2000) cDNA cloning, biochemical characterization and inhibition by plant inhibitors of the  $\alpha$ -amylases of the Western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 979-990.
- Torres, W. F. (1996) Biología y manejo de la polilla de la batata, *T. solanivora* en Venezuela. En: XXIII Congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología. Pp. 2-8.
- Trillos, G. O. (1994) La polilla guatemalteca de la batata y su control. Boletín informativo. ICA-CORPOICA. 16 pp.
- USDA – United States Department of Agriculture. Tropical Products: coffee. Disponible em: [http://www.fas.usda.gov/tropical\\_arc.asp](http://www.fas.usda.gov/tropical_arc.asp).
- Valee, B.L., Stein, E.A., Summerwell, W.N. & Fisher, E.H. (1959) Metal content of alpha-amylases of various origins. *J. Biol. Chem.* 234, 2901-2905.

- Vega, F.E., Rosenquist, E. & Collins, W. (2003) Global Project needed to tackle coffee crisis. Nature 435, 343.
- Vega, F.E. (2004) Coffee berry borer *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae). pp. 575–576 in Capinera, J.L. (Ed.) Encyclopedia of Entomology, Vol 1. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
- Valencia-Jimenez, A., Ruiz, S.L., Gonzalez, G.M.T., Riano, H.N.M., Posada, F.F.J., (1994) Efecto de inhibidores de proteinasas sobre la actividad tripsina y quimitripsina de la broca de café, *H. hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Cenicafe 45, 51-59.
- Valencia-Jiménez, A., Bustillo, A. E., Ossa, G. A., Chrispeels, M. J., (2000)  $\alpha$ -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 207-213.
- Weselake, J.R., W.A. MacGregor, D.R. Hill, and W.H. Duckworth. (1983) Purification and characteristics of an endogenous amylase inhibitor from barley kernels. Plant Physiol. 73, 1008-1012.
- Xu D, Xue Q, McElroy D, Mawal Y, Hilder V, Wu R (1996). Constitutive expression of a cowpea trypsin inhibitor gene, CpTi, in transgenic rice plants confers resistance to two major rice insect pests. Mol. Breed. 2:167-173.
- Yetter, M.A., R.M. Saunders, and H.P. Boles. (1979)  $\alpha$ -Amylase inhibitors from wheat kernels as factor in resistance to postharvest insects. Cereal Chem. 56, 243-244.

## V II- ANEXOS

### VII. i. Artigo em fase de submissão (1º Autor).

A novel and sensitive assay for leucine aminopeptidase: evidence of enzymatic activity in the intestinal tract of *T. licus*.



## **VII. ii. Artigos publicados (1º Autor).**

- 1. Detection of alpha-amylase inhibitors by a zymography method, performed in isoelectric focusing electrophoretic PhastGels.** Arnubio Valencia-Jimenez, Jorge W. Arboleda V, Maria Fatima Grossi-de-Sa. *Analytical Biochemistry* 366 (2007) 113-115.
  
- 2. Digestive  $\alpha$ -amylases from *Tecia solanivora* larvae (Lepidoptera: Gelechiidae): response to pH, temperature and plant amylase inhibitors.** Arnubio Valencia-Jimenez, Jorge W. Arboleda V, Aristobulo Lopez Avila and Maria Fatima Grossi-de-Sa. *Bulletin of Entomological Research* (2008) 98, 575–579.
  
- 3. Activity of  $\alpha$ -Amylase Inhibitors from *Phaseolus coccineus* on Digestive Amylases of the Coffee Berry Borer.** Arnubio Valencia-Jimenez, Jorge W. Arboleda V, Maria Fatima Grossi-de-Sa. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56, 2315–2320.

**VII. iii. Artigos publicados (co-autor).**

**1. A recombinant form of chagasin from *Trypanosoma cruzi*: inhibitory activity on insect cysteine proteinases.** Ana Carolina dos Santos Monteiro, Osmundo Brilhante de Oliveira Neto, Rafael Perseghini Del Sarto, Mariana Torquato Q de Magalhaes, Janaina Nascimento Lima, Ariane Ferreira Lacerda, Raquel Sampaio Oliveira, Julio Scharfstein, Maria Cristina Mattar da Silva, Jorge W Arboleda Valencia, **Arnubio Valencia Jimenez** and Maria Fatima Grossi-de-Sa. *Pest Manag Sci* 64:755–760 (2008).

**2. An  $\alpha$ -amylase inhibitor gene from *Phaseolus coccineus* encodes a protein with potential for control of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*).** Railene de Azevedo Pereira, Joao Aguiar Nogueira Batista, Maria Cristina Mattar da Silva, Osmundo Brilhante de Oliveira Neto, Edson Luiz Zangrando Figueira, **Arnubio Valencia Jimenez** and Maria Fatima Grossi-de-Sa. *Phytochemistry* 67 (2006) 2009–2016.

**3. Effect of a Bowman-Birk inhibitor on *Hypothenemus hampei* gut proteinases.** Railene de Azevedo Pereira, **Arnubio Valencia Jimenez**, Claudio Picanco Magalhaes, Maura Vianna Prates, Jorge Alex Taquita Melo, Liziane Maria de Lima, Mauricio Pereira de Sales, Erich Yukio Tempel Nakasu, Maria Cristina Mattar da Silva and Maria Fatima Grossi-de-Sa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55 (2007) 10714-10719.

**4. Identification of a novel b-N-acetylhexosaminidase (Pcb-NAHA1) from marine Zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa, Zoanthidea).** Djair S.L. Souza, Maria F. Grossi-de-Sa, Luciano P. Silva, Octavio L. Franco, José E. Gomes-Junior, Gustavo R. Oliveira, Thales L. Rocha, Claudio P. Magalhaes, Brenner M. Marra, Maira Grossi-de-Sa, Eduardo Romano, Cesar Martins de Sa, Erich Kombrink, **Arnubio V. Jimenez** and Luiz R.D. Abreu. *Protein Expression and Purification*. 58 (2008) 61-69.

**VII. iv. Artigos em fase de submissão (co-autor).**

**1. Inhibitory action of Cerrado plants against mammalian and insect  $\alpha$ -amylases.**

Everton M. Silva, Arnubio Valencia Jimenez, Maria Fatima Grossi-de-Sa, Thales L. Rocha, Jose E. De Paula, Laila S. Espindola. Submetido para Pest Management Science.

**VII. v. Lista de artigos em fase de preparação (1º Autor)**

**1. Identification and characterization of cellulolytic enzymes from western corn rootworm, *Diabrotica v. virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae.**

**2. Cell-Free Expression of a recombinant endoglucanase from intestinal tract of *Diabrotica v. virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae) larvae.**

**VII. vi. Lista de artigos em fase de preparação (co-autor)**

**1. RNAi knockdown of a digestive endoglucanase gene function in *Diabrotica v. virgifera* by intra-abdominal injection.**