

FOL 05252
1999
FL-05252

ISSN 1516-4349

Número 02

Outubro, 1999

INIBIDORES PROTEICOS DE PLANTAS E SUAS ATIVIDADES CONTRA INSETOS

Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia

República Federativa do Brasil
Presidente

Fernando Henrique Cardoso

Ministério da Agricultura e do Abastecimento
Ministro

Marcus Vinícius Pratini de Moraes

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa

Diretor - Presidente

Alberto Duque Portugal

Diretores - Executivos

Elza Angela Battaggia Brito da Cunha

José Roberto Rodrigues Peres

Dante Daniel Giacomelli Scolari

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Chefe Geral – Interino

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Arthur da Silva Mariante

Chefe Adjunto de Comunicação, Negócios e Apoio

José Manuel Cabral de Sousa Dias

Chefe Adjunto de Administração

Maria Viana de Almeida

INIBIDORES PROTÉICOS DE PLANTAS E SUAS ATIVIDADES CONTRA INSETOS

Francislete Rodrigues Melo

Octávio Luiz Franco

Maria Cristina Mattar da Silva

Maria Fátima Grossi de Sá

FOL 5252

Embrapa

Recursos Genéticos e Biotecnologia

Brasília, DF

1999

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
Circular Técnica, N.º 02

Exemplares desta publicação podem ser solicitados a:

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Parque Estação Biológica – PqEB – W/5 Norte

CEP: 70770-900 Caixa Postal: 02372

PABX: 0 (XX) 61 340-3600 Tel.: 0(XX) 61 448-4700

Fax: 0 (XX) 61 340-3624

Comitê de Publicações

Presidente: José Manuel Cabral de Sousa Dias

Secretária Executiva: Miraci de Arruda Camara Pontual

Membros: Antônio Emídio Dias Feliciano da Silva

Marcos Rodrigues de Faria

Marisa de Goes

Marta Aguiar Sabo Mendes

Rui Américo Mendes

Suplentes: Maria Isabel de Oliveira Penteadó

Sueli Corrêa Marques de Mello

Tratamento Editorial: Miraci de Arruda Camara Pontual

Normalização Bibliográfica: Maria Iara Pereira Machado

Editoração Eletrônica: Rita de Cássia Sales Santana

Tiragem: 250 exemplares.

MELO, F.R.; FRANCO, O.L.; SILVA, M.C.M. da; SÁ, M.F.G. de,
Inibidores proteicos de plantas e suas atividades conta insetos. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. 50p. il. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Circular Técnica, 2)

ISSN 1516-4349

1.Planta 2.Inibidor de proteína 3.Inseto I. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia II. Série III. Título

CDD 581.13345

© Embrapa – 1999



APRESENTAÇÃO

As pragas agrícolas são responsáveis pela perda de produção e de produtividade em todas as plantas cultivadas. Para combatê-las são usados agrotóxicos em grande quantidade, mas mesmo assim, estima-se que ainda haja um volume de perdas que chega a 37% de toda a produção agrícola mundial.

Diversos outros métodos estão sendo desenvolvidos e utilizados para o controle das pragas e muitos deles têm como objetivo principal, reduzir ou até mesmo eliminar o uso de produtos químicos no controle de insetos, doenças e plantas invasoras. Dentre esses métodos encontram-se o controle biológico, o controle cultural e a utilização de cultivares e variedades vegetais menos susceptíveis ao ataque das pragas. Está ganhando espaço, tanto conceitualmente quanto na prática, a combinação de vários métodos, no que se convencionou chamar de manejo integrado de pragas (MIP).

Dentre os métodos que integram o MIP, encontra-se a utilização de plantas geneticamente modificadas que contêm genes de resistência a insetos ou a patógenos e que poderão diminuir, sensivelmente as quantidades de produtos químicos utilizados.

A Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia vem trabalhando há mais de quinze anos com metodologias de controle biológico de insetos e de transformação genética de plantas e, nos últi-

mos tempos, tem sido realizado trabalhos para desenvolvimento de produtos e de tecnologias reunindo as duas áreas de trabalho.

Um dos projetos que o Centro vem desenvolvendo há alguns anos, busca identificar fatores de resistência presentes em diversas plantas selvagens e cultivadas em fungos e bactérias contra o ataque de grupos de insetos, com o intuito de identificar os genes responsáveis por essa resistência e avaliar a possibilidade de transferi-los para outras espécies de interesse econômico

A presente Circular Técnica reúne e apresenta as informações disponíveis sobre um grupo de substâncias genericamente denominados de "inibidores protéicos" e discute as possibilidades de vários compostos como potenciais candidatos a ser transferidos para a produção de plantas transgênicas.

O Centro Nacional de Pesquisa de Recursos Genéticos e Biotecnologia espera que esta publicação permita uma visão de conjunto das pesquisas executadas nos diversos laboratórios que se dedicam ao assunto e possa servir de referência para os laboratórios brasileiros que se dedicam ao estudo dos inibidores protéicos visando a obtenção de plantas resistentes a insetos.

José Manuel Cabral de Sousa Dias
Chefe Geral - Interino
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| Resumo | 07 |
| 1. Introdução | 08 |
| 2. α -amilases | 09 |
| 3. Inibidores de α -amilases | 10 |
| 4. Proteinases | 18 |
| 5. Inibidores de proteinases de plantas | 20 |
| 5.1. Inibidores de proteinases serínicas | 21 |
| 5.2. Inibidores de proteinases cisteínicas (cistatinas) | 23 |
| 6. Plantas transformadas com genes de inibidores | 25 |
| 7. Referências Bibliográficas | 34 |

Inibidores proteicos de plantas e suas atividades contra insetos

Francislete Rosdrigues Melo¹
Octávio Luiz Franco²
Maria Cristina Mattar da Silva³
Maria de Fátima Grossi de Sá⁴

RESUMO

As pragas e os patógenos (fungos, bactérias e vírus) são responsáveis por grandes perdas da agricultura, causando injúrias e doenças, além de se alimentarem dos tecidos de plantas. As perdas na produção da agricultura mundial, devido ao ataque de pragas e doenças chegam a 37%, sendo que 13% desta perda é causada por insetos (Gatehouse *et al.*, 1992). As plantas, possuem entretanto, um certo grau de resistência a insetos e há muitos anos, tem-se estudado a biossíntese e a regulação de compostos químicos de plantas associados com essas defesas. Atualmente, sabe-se que esses defensivos são encontrados em vários tecidos vegetais e entre esses compostos, estão incluídos antibióticos, alcalóides, terpenos e proteínas. Entre as proteínas, estão incluídas enzimas tais como as quitinases, as lectinas e os inibidores de enzimas digestivas (Ryan, 1990). Atualmente, genes que conferem resistência a insetos podem ser introduzidos em plantas de interesse para reduzir sua susceptibilidade. Esses genes podem ser obtidos de plantas, bactérias ou de outra origem (Schuler *et al.*, 1998). Os inibidores de enzimas (α -amilases e de proteinases) serão aqui descritos e estudados, relacionando-se suas funções como compostos de defesas de plantas contra insetos e seu potencial como ferramenta na obtenção de plantas resistentes a pragas.

¹ Bolsista, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

² Bolsista, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

³ Bolsista, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

⁴ Bióloga Ph.D., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

1. INTRODUÇÃO

Pragas e patógenos (fungos, bactérias e vírus) são responsáveis por grandes perdas da agricultura, causando injúrias e doenças, além de se alimentarem dos tecidos de plantas. Os insetos, principalmente suas larvas, atacam preferencialmente folhas e sementes (Brzin e Kidrie, 1995). As perdas na produção da agricultura mundial, devido ao ataque de pragas e doenças chegam a 37%, sendo que 13% desta perda é causada por insetos (Gat-house *et al.*, 1992). As plantas, possuem entretanto, um certo grau de resistência a insetos e apenas um número limitado destes são hábeis a alimentarem-se de cada espécie, individualmente. Essa resistência inerente, é baseada nos vários mecanismos de defesa, desenvolvidos pelas plantas, durante a evolução (Schuler *et al.*, 1998).

Há muitos anos, tem-se estudado a biossíntese e a regulação de compostos químicos de plantas associados com essas defesas. No início, essas substâncias químicas foram consideradas como compostos secundários de plantas, os quais não tinham suas funções bem estabelecidas. Atualmente, sabe-se que esses defensivos são encontrados em vários tecidos vegetais, na forma de componentes constitutivos, fazendo parte do plano de desenvolvimento normal da planta ou então sintetizados em resposta ao ataque de pragas ou patógenos. Entre esses compostos, estão incluídos antibióticos, alcalóides, terpenos e as proteínas. Entre as proteínas, estão incluídas enzimas, lectinas e inibidores de enzimas (Ryan, 1990), entre outras.

Mesmo na presença destes fatores de defesa, os bruquídeos são capazes de infestar sementes de leguminosas. Questiona-se desta maneira, o porquê destas defesas serem ineficientes à predação destes insetos. Em muitos casos, estes compostos estão presentes em altos níveis nas linhagens selvagens. Quando

domesticadas estas linhagens perdem ou reduzem a capacidade de sintetizar estas moléculas de defesa. Outro fato importante é a co-evolução dos insetos teorizada por Ehrlich & Raven (1964), o qual sugere que a produção e o acúmulo de uma toxina pela planta é seguida de uma resposta do predador, tal como, a detoxificação ou a excreção da toxina pelo mesmo, o que o capacita de alimentar-se da planta alvo. Desta maneira a adaptação da planta é seguida por uma contra-adaptação do predador. Estas linhagens de insetos tornam-se resistentes aos compostos de defesa presentes na planta e rapidamente tornam-se dominantes, como observado com os carunchos do feijão. Atualmente, genes que conferem resistência a insetos podem ser introduzidos em plantas de interesse para reduzir sua susceptibilidade. Esses genes podem ser obtidos de plantas, bactérias ou podem ainda ter uma outra origem (Schuler *et al.*, 1998). Aqui, inibidores de α -amilase e de proteinase serão descritos, relacionando-se suas funções como compostos de defesa de plantas contra insetos e seu potencial como ferramenta para a obtenção de plantas cultivadas resistentes.

2. α -AMILASES

As α -amilases são enzimas monoméricas que constituem uma família de endoamilases e que catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 do amido, glicogênio e outros carboidratos. Essas enzimas tem um papel importante no metabolismo de carboidratos em plantas, animais e outros organismos. Por serem essenciais para o crescimento e desenvolvimento de muitos insetos, especialmente daqueles que vivem em sementes e grãos ricos em amido, muitos estudos têm sido feitos no intuito de desvendar o funcionamento das α -amilases (Chrispells & Raikel, 1991, Grossi de Sá & Chrispells, 1997, Strobl *et al.*, 1998^a, Da Silva *et al.*, 1999). Os mamíferos e alguns insetos como o *Callosobruchus maculatus* (Campos *et al.*, 1989) e *Zabrotes subfasci-*

atus (Ishimoto *et al.*, 1996) apresentam diferentes formas de α -amilase (Silva *et al.*, 1999). A praga do trigo *Tenebrio molitor* expressa uma forma majoritária desta enzima denominada TMA. Esta α -amilase apresenta massa molecular de 51,3 kDa (Strobl *et al.*, 1997) e foi recentemente cristalizada em complexo com o inibidor de α -amilase de feijão *Phaseolus vulgaris* (α -AI) (Nahoum *et al.*, 1999). A cristalização desse complexo comparado com outros complexos α -amilase/inibidor trouxeram maiores esclarecimentos dos aminoácidos envolvidos nessa interação. O mecanismo enzimático das α -amilases é complexo e sua estrutura/função ainda não foi totalmente elucidado. Estudos cristalográficos (Strobl *et al.*, 1998^b) e de modelagem molecular (Silva *et al.*, 1999) têm sido realizados para a determinação das estruturas de amilases isoladas assim como daquelas complexadas com inibidores específicos.

3. INIBIDORES DE α -AMILASE

Em plantas, inúmeras proteínas tem a capacidade de inibir enzimas hidrolíticas. Os inibidores de α -amilase constituem uma importante família destas proteínas e podem ser encontrados em cereais como o trigo (Garcia-Maroto *et al.*, 1991, Feng *et al.*, 1996), a cevada (Abe *et al.*, 1993) e o centeio (Garcia-Maroto *et al.*, 1994), em leguminosas tais como o feijão comum (Marshall & Lauda, 1975; Ishimoto *et al.*, 1996; Grossi de Sá *et al.*, 1997) e o feijão-de-corda (Melo, 1997) e em outras famílias de vegetais (Marshall, 1975). Estas proteínas podem apresentar massa molecular de: 5 kDa (Bloch Junior. & Richardson, 1991), 13 kDa (monômeros), 26 kDa (dímeros) e 50 kDa (tetrâmeros).

Entre os inibidores de α -amilase mais estudados estão os inibidores encontrados em trigo (*Triticum aestivum*), 0.19, 0.53, 0.28 nomeados de acordo com sua mobilidade eletroforética, e os

inibidores de α -amilase de sementes de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) denominados, α -AI1 e α -AI2.

Os inibidores proteicos de α -amilase e proteinase são muito abundantes no endosperma do trigo e representam uma fração substancial das albuminas e globulinas (Feng *et al.*, 1996). Entre os inibidores de α -amilase encontrados neste cereal, observa-se diferentes especificidades contra as α -amilases de diferentes fontes. Um dos inibidores de α -amilase do trigo mais estudado é o inibidor dimérico 0.19, ativo contra α -amilases de *T. molitor*, *Sitophilus oryzae*, *Tribolium castaneum* (Feng *et al.*, 1996) e contra os bruquídeos *C. maculatus*, *Z. subfasciatus* e *A. obtectus* (Franco *et al.*, 1999). Além do inibidor 0.19, o inibidor 0.53, também dimérico, é ativo contra α -amilase de saliva humana (HSA) e contra a α -amilase dos carunchos de feijão comum e do feijão de corda (Franco *et al.*, 1999). Estes dois inibidores (0.19 e 0.53) são os únicos fatores de resistência, ativos contra o bruquídeo *A. obtectus*, encontrados até o momento (Franco *et al.*, 1999). Muitos estudos tem sido feitos no intuito de desvendar as propriedades do inibidor monomérico 0.28, ativo contra TMA (Garcia-Maroto *et al.*, 1991). Além destes inibidores acima citados, com suas referentes isoformas, existem no trigo inibidores de α -amilase tetraméricos (Kasahara *et al.*, 1996) e inibidores com dupla função (Yamagata *et al.*, 1998).

Os inibidores com dupla função, apresentam, além da atividade inibitória contra α -amilase, outro sítio ativo com diferente especificidade. No trigo, o inibidor WASI (Wheat α -Amylase/Subtilisin Inhibitor), também conhecido como PK13 apresenta atividade inibitória para α -amilase endógena e de diferentes insetos, como também para proteinase K (Zemke *et al.*, 1991; Gvozdeva *et al.*, 1993). Em outros cereais, inibidores semelhantes são encontrados. Os inibidores BASI (Barley α -Amylase/Subtilisin Inhibitor) encontrados em cevada são capazes de inibir α -amilase endógena e também a enzima subtilisina, uma

protease serínica de *Bacillus subtilis* (Rodenburg *et al.* 1995). As proteínas TASI de *Triticale* e RASI (Rice α -Amylase/Subtilisin Inhibitor) de arroz (Yamagata *et al.*, 1998) são inibidores homólogos aos inibidores BASI e WASI. O inibidor bifuncional de Ragi, encontrado em *Eleusina coracana*, é uma proteína monomérica, com dois sítios independentes, sendo um deles capaz de inibir a α -amilase de *Tenebrio molitor* e o outro capaz de inibir a tripsina do pâncreas bovino (Strobl *et al.*, 1998^b). Além desses inibidores com a capacidade de inibir dois tipos de enzimas diferentes, os inibidores encontrados em sementes de lágrima de Jó (*Coix lachryma-jobi*) possuem a capacidade de inibir α -amilase de intestino de gafanhoto e também possuem atividade endoquitinásica (Ary *et al.*, 1989).

Análises estruturais têm se mostrado como o próximo passo na resolução do mecanismo de atividade inibitória. A cristalização e difração de raio X mostraram que o inibidor dimérico 0.19 de trigo possui em cada uma das subunidades quatro α -hélices grandes e uma α -hélice de volta única. Essas estruturas mantêm uma ligação favorável entre as subunidades. Além disso, este inibidor apresenta duas cadeias β -pregueadas curtas e 10 resíduos de cisteína formando pontes dissulfeto (Oda *et al.*, 1997).

Em adição ao estudo estrutural dos inibidores, a formação do complexo enzima-inibidor tem sido estudada em inibidores de cereais, e esta envolve a interação direta entre as duas proteínas. Rodenburg *et al.* (1995) sugeriu que o complexo formado entre o inibidor BASI e a α -amilase de cevada (AMY2) é formado principalmente por resíduos de arginina e que estes resíduos fazem interface através de pontes salinas da α -amilase. Estudos da estrutura molecular desse complexo revelaram que os resíduos catalíticos essenciais da AMY2 não se ligam diretamente ao inibidor (BASI). A ligação dos resíduos de arginina do BASI ao AMY2 criam uma cavidade exposta ao meio externo, que tem a forma ideal para acomodar um cálcio extra, e esta ligação pode

contribuir para o efeito inibitório da α -amilase (Vallé *et al.*, 1998). Abe *et al.* (1993) observaram que a inativação dos resíduos de arginina do inibidor de α -amilase/subtilisina de cevada foi suficiente para a perda de sua função. Contudo no inibidor 0.19 do trigo, não se observa a presença de argininas ou lisinas, possivelmente envolvidas na formação do complexo inibidor/enzima (Oda *et al.*, 1997). Franco *et al.*, (1999) demonstraram, através de modelagem, alguns resíduos envolvidos na formação complexo/inibidor e na definição de especificidade inibitória. Tendo em vista que apesar dos 94% de homologia entre os inibidores 0.53 e 0.19, um deles (0.19) inibe PPA e o outro (0.53) a inibe fracamente, procurou-se diferenças sequenciais e estruturais. Uma delas é a His⁴⁷ do 0.19, que é alterada por uma Asp no 0.53 e o outro resíduo é a Cys⁵² no 0.19 que é alterada por uma Pro no inibidor 0.53. De acordo com estes autores, esses dois resíduos estão envolvidos na formação do complexo 0.19/PPA.

Sementes do feijão comum (*P. vulgaris*) contem certas proteínas que as protegem contra alguns bruquídeos. Dentre as proteínas de defesa estão as fitohemaglutininas, as arcelinas e os inibidores de enzimas digestivas (Chrispells & Raikhel, 1991). Foi demonstrada a presença de dois inibidores de α -amilase em sementes de feijão comum, denominados α -AI1 and α -AI2, que diferem em suas especificidades contra α -amilases. Enquanto o α -AI1 inibe a α -amilase de pâncreas de porco (PPA) assim como α -amilases de *C. maculatus* (CMA) e de *C. chinensis* (CCA) (Kasahara *et al.*, 1996), o inibidor α -AI2 inibe somente a α -amilase do *Z. subfasciatus* (ZSA) (Grossi de Sá *et al.*, 1997; Grossi de Sá and Chrispeels, 1997). Nenhum destes inibidores, presentes em sementes de feijão, teve efeito inibitório contra a α -amilase do *A. obtectus* (AOA).

Os inibidores de α -amilase encontrados no feijão só se tornam ativos após sofrerem processamento e isto pode ocorrer em um único passo ou em passos múltiplos. Os inibidores α -AI são sintetizados como uma pró-proteína que sofre maturação

Os inibidores de α -amilase encontrados no feijão só se tornam ativos após sofrerem processamento e isto pode ocorrer em um único passo ou em passos múltiplos. Os inibidores α -AI são sintetizados como uma pró-proteína que sofre maturação proteolítica para tornar-se ativo. A clivagem proteolítica ocorre no resíduo Arg⁷⁷ (Santino *et al.*, 1992), resultando na formação de duas subunidades glicosiladas com peso molecular estimado em 10 e 14,6 kDa, que originarão as cadeias α e β , respectivamente (Moreno & Chrispeels, 1989; Yamaguchi, 1993). Estudos utilizando espectrometria de massa mostraram que os inibidores α -AI1 e α -AI2 necessitam dessa clivagem para ativação (Young *et al.*, 1999). A dimerização da proteína ocorre no retículo endoplasmático, sendo então transportada para o complexo de Golgi onde um dos três glicanos é modificado pela remoção da manose. Após a chegada da proteína nos vacúolos, o inibidor é clivado em duas cadeias α e β e sete aminoácidos terminais são removidos. A proteína madura contém glicanos ligados à Asn⁶³ e Asn⁶⁷ e por espectrometria de massa, foi observado que existem dois glicanos por cadeia (Chrispeels *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1999). Os glicanos não parecem ser necessários para o passo de ativação, já que α -AI mutantes sem os sítios de glicosilação são também ativados em plantas (Chrispeels, 1999). Este processamento causa uma mudança conformacional que cria o sítio ativo necessário para a interação com as α -amilases (Pueyo *et al.*, 1993) (Figura 1).

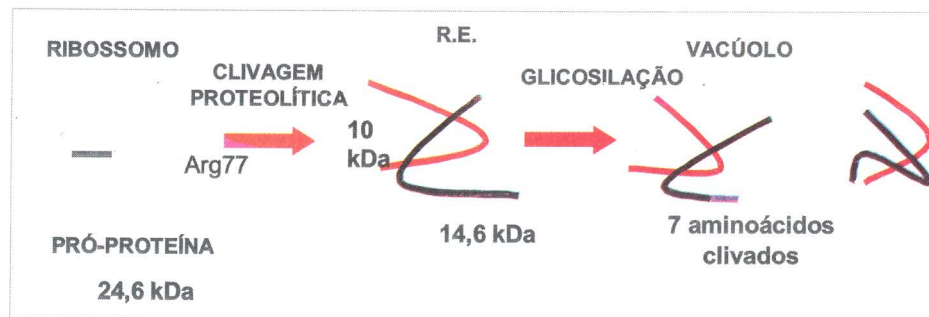


Figura 1: Processamento dos inibidores de α -amilase de feijão comum (*P. vulgaris*).

O mecanismo de interação e especificidade inibidor-amilase ainda não está completamente elucidado, mas alguns avanços tem sido demonstrados nos últimos anos. De acordo com Grossi de Sá *et al.* (1997), a inibição de ZSA causada pelo α -AI2 é dependente tanto do tempo, quanto do pH. Em adição, La Jolo *et al.* (1991) mostraram que a formação do complexo tem pH ótimo de 5,5, sendo desta forma capaz de inibir as α -amilases de Coleópteros, os quais possuem um pH ácido em seu intestino médio, mas incapaz de inibir as α -amilases de Lepdópteros, que possuem um pH alcalino em seu intestino médio. Apesar de La Jolo *et al.* (1991) proporem uma proporção estequiométrica 1:1 (inibidor- α -amilase), estudos recentes demonstraram que alguns inibidores diferem desse tipo de interação. Kasahara *et al.* (1996) sugeriam uma proporção estequiométrica de 2:1, onde uma única molécula de inibidor de α -amilase 1 de feijão comum, através de dois sítios de ligação independentes, se liga e inibe duas moléculas de amilase de pâncreas de porco.

O mecanismo de interação entre o complexo inibidor-amilase ocorre pela formação de um complexo inicial reversível com $KD=10^{-5}$ e que ainda apresenta atividade amilolítica, seguido de uma modificação conformacional que torna a ligação irreversível com $KD=10^{-10}$, que não apresenta nenhuma atividade (La Jolo & Finardi-Filho, 1985; Chrispeels, 1999). A interação entre α -AI1 com PPA apresenta esta modificação conformacional do sítio ativo de α -amilase. Neste caso, a alça flexível da amilase (resíduos 304-310), que forma a margem superficial do sítio de ligação com o substrato é empurrado pelo inibidor, e este toma o seu lugar formando o complexo (Bompard-Gilles *et al.*, 1996). Muitos autores tem observado que alguns aminoácidos dos inibidores são essenciais para a interação com as α -amilases (Tabela 1).

Em 1989, Billeter *et al.*, através de análise de ressonância magnética nuclear (RMN) e difração de raio X, determinaram a estrutura do inibidor Tendamistad bacteriano. O sítio ativo

estabelecido consiste no segmento Trp¹⁸-Arg¹⁹-Tyr²⁰, o qual é uma alça exposta na proteína. Em busca de homologia no α -AI, a sequência encontrada foi Trp¹⁸⁸-Ser¹⁸⁹-Tyr¹⁹⁰ e esta região foi a principal candidata ao sítio ativo. Para testar esta homologia, mutação destes resíduos do tripeptídeo próximo ao C-terminal por Gly-Asn-Val (resíduos de aminoácidos presentes em fitohemaglutinina [PHA]) produziram inibidores inativos (Mirkov *et al.*, 1995). A similaridade dos sítios ativos entre α -AI e Tendamistad sugerem que ambos podem se ligar ao sítio catalítico da α -amilase de pâncreas de porco da mesma maneira.

O resíduo de Arg pode interagir com os resíduos da Asp catalítica (Qian *et al.*, 1993), enquanto o Trp¹⁸⁸ lateral e a Tyr¹⁹⁰ podem se ligar aos subsítios vizinhos. Além destes resíduos, nove aminoácidos de α -AI1 formam contato direto com PPA por pontes de hidrogênio para a formação do complexo (Bompard-Gilles *et al.*, 1996). A sobreposição das moléculas de α -AI1 (estrutura cristalizada) e α -AI2 (produto de modelagem molecular) (**Figura 2**) ilustra a homologia estrutural entre as duas alças principais (N-terminal e C-terminal) envolvidas em interação com as α -amilases. A alça N-terminal no α -AI2 apresenta tamanho reduzido e orientação espacial oposta em relação a mesma alça no α -AI1, sugerindo possível função dos aminoácidos envolvidos na especificidade da interação (Grossi de Sá & Chrispeels, 1997, Da Silva *et al.*, 1999).

Para entender melhor especificidade das interações entre as α -amilases e os inibidores, estudos envolvendo estruturas moleculares vem sendo realizados por diferentes grupos. Utilizando-se dos dados de cristalografia do complexo α -AI-1/PPA (Bompard-Gilles *et al.*, 1996) e da TMA, através de técnicas de modelagem molecular, foi possível a construção de modelos computacionais que simulam a formação do complexo encontrado na natureza, como o α -AI2 de α -amilase e α -amilase de *Z. subfasciatus* (α -AI2/ZSA) (**Figura 3**), assim como a simulação de complexos artificiais (α -AI2/PPA e α -AI1/ZSA).

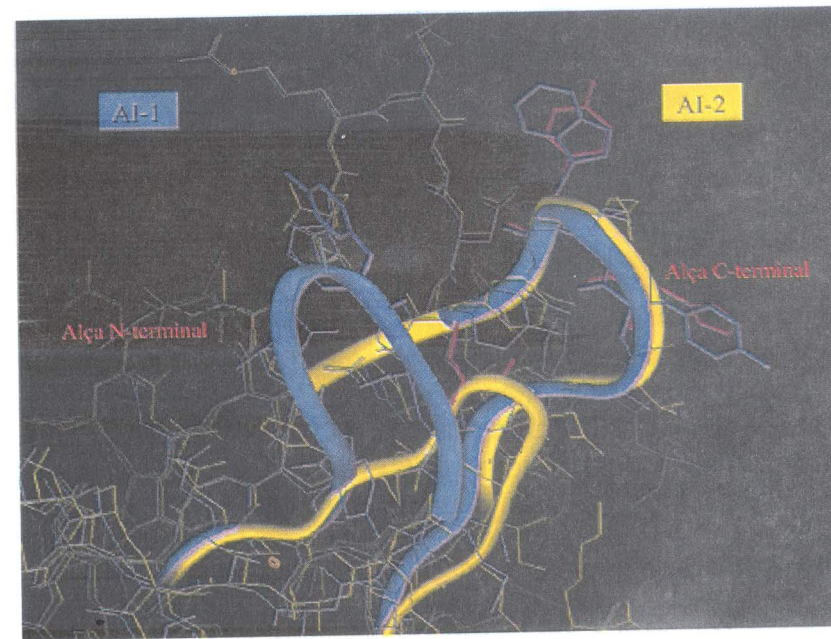


Figura 2: Sobreposição de modelos estruturais AI-1 (azul) e AI-2 (amarelo). Os destaques em “ribbon” correspondem as alças C- e N-terminal. Os resíduos em cor de rosa referem-se aqueles envolvidos no sítio de interação e são dissimilares no alinhamento estrutural dos dois inibidores. A figura foi produzida pelo programa Insight II (Brosyn C.A.).

Esses modelos estruturais foram analisados comparativamente e oferecem subsídios para o desenho de experimentos que venham a produzir inibidores mutantes com a especificidade desejada (Silva *et al.*, 1999).

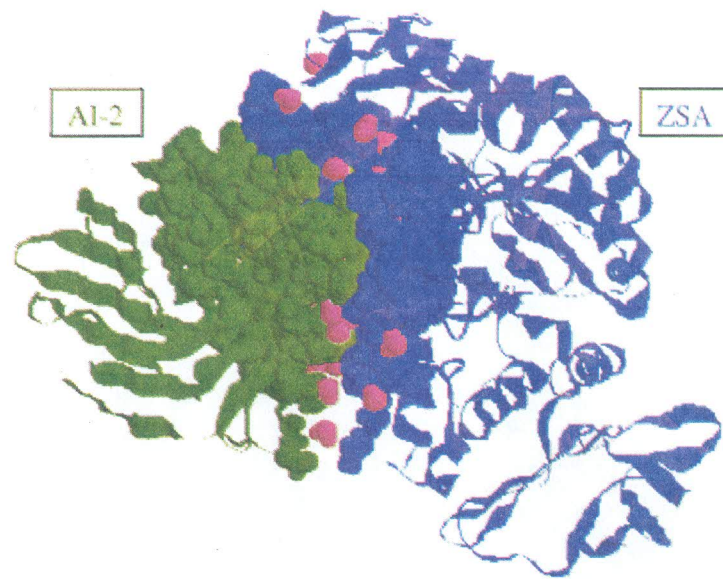


Figura 3: Complexo entre α -amilase de *Zabrotes subfasciatus* (ZSA) e inibidor 2 (AI-2). Os círculos preenchidos (cor azul e cor verde) representam os resíduos envolvidos na interação entre ambas as moléculas. Os círculos cor-de-rosa representam as moléculas de água envolvidas na interface da interação.

4. PROTEINASES

As proteinases são denominadas de endopeptidases quando hidrolizam ligações peptídicas internas, e de exopeptidases quando hidrolizam ligações N-terminais ou C-terminais. As endopeptidases são também conhecidas como proteinases (Ryan & Walter-Simmons, 1981). As proteinases são classificadas, de acordo com a União Internacional de Bioquímica, em quatro grandes classes: proteinases serínicas; cisteínicas; aspárticas e metalo-proteinases. O sistema de classificação baseou-se numa comparação entre sítios ativos, mecanismos de ação e estrutura tridimensional das proteinases (Neurath, 1996).

A **Tabela 2** lista os diferentes tipos de proteinases estudados, mostrando os resíduos mais importantes de seus sítios ativos.

Os insetos obtêm muitos dos aminoácidos essenciais, utilizando proteinases extracelulares que atuam no lúmen de seus intestinos* (Murdock *et al.*, 1986). No início do processo digestivo, os insetos fitófagos produzem secreções salivares que são misturadas aos tecidos da planta que foram mastigados, ainda dentro da cavidade bucal (Chapman, 1985). Estas secreções são importantes porque umedecem o bolo alimentar, facilitando sua passagem através do esôfago. Não existem evidências da presença de níveis significantes de proteinases em secreções salivares de insetos ortópteros (Ferreira *et al.*, 1990) ou lepdópteros (Lenz *et al.*, 1991). Insetos coleópteros não possuem glândulas salivares bem desenvolvidas (Wigglescoorth, 1972) e não existem estudos comprovando a presença de proteinases salivares nos mesmos. O material ingerido pelo inseto passa subsequentemente através do intestino anterior, chegando então até o intestino médio, onde os níveis de proteinases são muito altos, ocorrendo aí a digestão de proteínas (Terra, 1990). No intestino posterior e no material fecal dos insetos, são encontrados baixos níveis de proteinases, o que sugere a existência de um mecanismo de recirculação ou recuperação das enzimas digestivas dos mesmos (Terra *et al.*, 1979).

Os insetos geralmente possuem diferentes tipos de proteinases. As mais bem estudadas são as proteinases serínicas, as quais são muito frequentes em uma grande variedade de classes de insetos e se assemelham à tripsina e quimotripsina de mamíferos (Applebaum, 1985) e as proteinases cisteínicas as quais também são enzimas digestivas importantes para os insetos. Muitos coleópteros como o besouro da batata do Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, possuem grandes concentrações das mesmas. Os carunchos *C. maculatus* e *A. obtectus* que atacam, respectivamente, o feijão-de-corda, o qual é muito consumido por populações do Nordeste do Brasil e o feijão

ções do Nordeste do Brasil e o feijão comum, que representa uma cultura de grande importância para o nosso país, possuem grande quantidade de proteinases cisteínicas em seus tratos digestivos (Gruden *et al.*, 1998; Murdock *et al.*, 1986). Em insetos da classe dos colembóides, como o carnívoro *Adalia bipunctata*, as proteinases predominantes são também as cisteínicas (Walker *et al.*, 1997).

5. INIBIDORES DE PROTEINASES DE PLANTAS

Muitas famílias de plantas possuem inibidores de proteinases distribuídos através de seus órgãos reprodutivos, órgãos de reserva e tecidos vegetativos (Shewry & Lucas, 1997). A maioria destes inibidores são moléculas pequenas, estáveis, abundantes e fáceis de purificar. Estes podem atuar como proteínas de reserva, como reguladores de enzimas endógenas e podem também estar envolvidos nos processos de defesa de plantas contra o ataque de pragas e/ou patógenos (Walker *et al.*, 1997). O mecanismo pelo qual os inibidores de proteinases interferem no processo digestivo dos insetos se deve à diminuição da assimilação de nutrientes através de sua ligação específica a enzimas proteolíticas do intestino dos insetos, impedindo que estas executem suas funções primordiais no processo de digestão proteica (Ryan, 1990). Quando insetos são submetidos a uma dieta artificial contendo inibidores específicos para a principal classe de proteinases de seus intestinos, estes têm seu desenvolvimento retardado, bem como podem apresentar índices de mortalidade bastante significantes (McManus & Burgess 1995).

Quatro classes de inibidores de proteinases foram estabelecidas de acordo com suas atividades específicas: inibidores de proteinases serínicas; de proteinases cisteínicas; aspárticas e de metalo-proteinases. O número de inibidores de proteinases de plantas identificados e isolados é grande, sendo os inibidores de

proteinases serínicas, os que apresentam melhor caracterização (Ryan, 1990). Nos últimos anos, entretanto, muitos inibidores de proteinases cisteínicas também foram caracterizados (Bode & Huber, 1992). Os inibidores de metalo-proteinases e de proteinases aspárticas de plantas estão sendo estudados ainda em menor escala (Barret *et al.* 1986, Turk 1991). Em plantas, os inibidores de proteinases são agrupados em famílias (Tabela 3), sendo que a classe dos inibidores de proteinases serínicas possui sete famílias e as demais apenas uma família (Ritonja *et al.*, 1990; Baudys *et al.*, 1991).

5.1. INIBIDORES DE PROTEINASES SERÍNICAS.

Inibidores de proteinases serínicas foram encontrados inicialmente em órgãos de reserva de plantas como sementes e tubérculos, e posteriormente foram detectados em folhas e frutos (Xavier-Filho, 1992). Muitos desses inibidores, tais como o inibidor de tripsina de soja e o de feijão-de-corda, afetam o desenvolvimento de vários insetos lepidópteros (Broadway & Duffey, 1986), os quais possuem uma grande quantidade de proteinases serínicas em seu trato digestivo (Applebaum, 1985). A maioria dos inibidores de proteinases serínicas reagem com suas enzimas congnatas através de um mecanismo semelhante ao que ocorre na ligação entre enzima e substrato (Laskowski & Kato, 1980; Grutter *et al.*, 1990). Esse grupo de inibidores "canônicos", compreendem geralmente, proteínas pequenas com 29 a 190 resíduos de aminoácidos e todas elas possuem uma alça ligante exposta (Bode & Huber, 1992).

A formação do complexo enzima-inibidor ocorre rapidamente mas a sua dissociação é lenta e resulta em enzima livre e em um inibidor clivado, o qual sofre desnaturação. Na formação desse complexo estão envolvidas interações entre as cadeias do inibidor e da proteinase tais como pontes de hidrogênio e forças

(Ardelt & Laskowski Junior, 1991). A formação do complexo enzima-inibidor envolve ainda a formação de uma ligação peptídica no sítio reativo do inibidor (P1), e a presença de alguns elementos essenciais no sítio ativo da enzima. O mecanismo da catálise é comum para as proteinases e a estrutura foi bastante estudada através de técnicas de Difração de Raios-X.

A **Figura 4** exemplifica este mecanismo usando o modelo estrutural do inibidor de Tripsina e Quimotripsina (PFSI) de sementes de *P. vulgaris* (Carvalho *et al.*, 1996) complexado com a enzima α -Quimotripsina, mostrando a orientação do sítio reativo (P1), correspondente ao aminoácido Fenilalanina em relação aos demais elementos necessários para a catálise enzimática.

Estes elementos são constituídos pela tríade catalítica, a qual representa a base para a interação e é formada pelos aminoácidos: Ácido Aspártico, Histidina e Serina. A região específica S1, formada por aminoácidos da enzima que determinam a especificidade, proporciona um ambiente favorável para acolher o sítio reativo P1. Isto envolve a formação de ligações covalentes e pontes de hidrogênio com os demais aminoácidos que estão ao redor de uma fenda oxianica, constituída por resíduos que podem formar pontes de hidrogênio com o átomo de Oxigênio (carregado negativamente) do carbono carbonil (C1) do inibidor. A substituição do resíduo P1, em alguns casos, pode levar a uma mudança previsível da atividade inibitória. A substituição de uma Arginina por um Triptofano no inibidor de soja, provoca a mudança de inibição de Tripsina para Quimotripsina (Laskowski Junior & Kato, 1980).

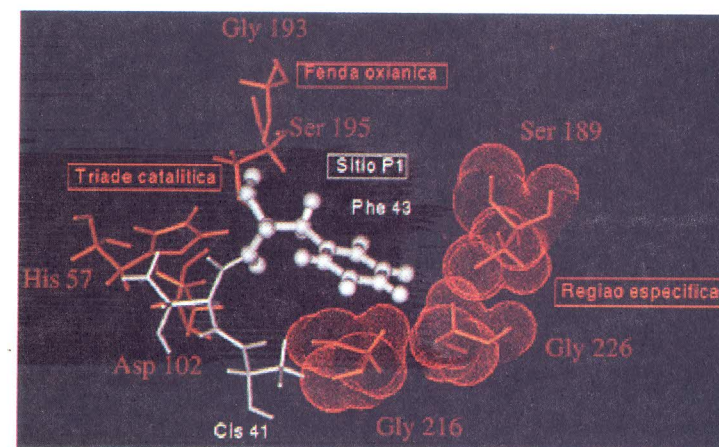


Figura 4: Inibidores de proteinase serínica (PFSI) var. "Fogo na Serra" extraído de *P. vulgaris*, mostrando elementos essenciais para catálise. Os círculos pontilhados referem-se a representação das forças de Van der Waals. Carvalho *et al.*, 1996

5.2. INIBIDORES DE PROTEINASES CISTEÍNICAS (CISTATINAS).

Inibidores de proteinases cisteínicas, também conhecidos como cistatinas, são um grupo de proteínas que se ligam às proteinases cisteínicas inibindo sua atividade (Kudo *et al.*, 1998). Em animais existem três famílias de cistatinas classificadas de acordo com sua massa molecular, número de pontes dissulfeto, localização subcelular e estrutura primária. São elas: família das cistatinas I, cistatinas II e kininogenios (Ryan *et al.*, 1998). Em plantas as cistatinas de arroz (oryzacistatinas) são as mais bem caracterizadas. A partir da sequência genômica, essas proteínas foram inicialmente consideradas como pertencentes à família das cistatinas II, apesar de não possuírem pontes dissulfeto ou resíduos de cisteína. Entretanto, a organização genômica das oryzacistatinas e de outras cistatinas como a do

milho, diferem grandemente da organização das cistatinas animais (Kondo *et al.*, 1991; Brow & Dziegielewska, 1997). Elas podem também, ser distinguidas por serem proteínas de cadeia única, já que não contêm resíduos de cisteína para formar ponte dissulfeto.

Todos esses dados sugerem que as cistatinas de plantas devem ser classificadas dentro de uma nova família: as fitocistatinas (Abe *et al.*, 1987). Muitas fitocistatinas têm sua sequência de aminoácidos conhecida. Entre elas estão as oryzacistatinas I e II a cistatina de feijão-de-corda (Fernandes *et al.*, 1993), a do fruto abacate (Kimura *et al.*, 1995) e a do milho (Abe *et al.*, 1992). Em todas essas sequências encontra-se uma região altamente conservada no sítio de ligação (Gln, Val, Val, Ala e Gly), e o nível de identidade de aminoácidos entre cistatinas de sementes e de frutos de diferentes espécies de plantas é alto, o que sugere uma função conservada para estas proteínas (Kimura *et al.*, 1995).

Assim como os inibidores de proteinases serínicas, as cistatinas se ligam reversivelmente às proteinases. Através de estudos de cristalografia, foi determinado que as cistatinas são formadas por uma longa α -hélice central envolvida por cinco folhas β antiparalelas. Na extremidade das folhas β há uma alça em forma de grampo, formada pela sequência altamente conservada em todas as cistatinas (QVWAG) é exposta. Esta sequência corresponde ao sítio de ligação da cistatina à proteinase (papaína). Em regiões paralelas a esta alça, existe outra alça, também em forma de grampo, e uma projeção do segmento N-terminal. Na formação do complexo inibidor/proteinase, as duas alças interagem com resíduos conservados em subsítios, que são adjacentes aos resíduos do sítio catalítico da proteinase (Stubbs *et al.*, 1990). Desta forma, o segmento N-terminal da cistatina se associa ao resíduo Cys²⁵ do sítio ativo da proteinase, promovendo a aproximação das moléculas, mas a ligação entre elas ocorre no subsítio da proteinase, envolvendo os resíduos Gly⁸ e Gly⁹ da proteinase. Várias pontes de hidrogênio são

ou seja, ocorre de maneira similar à ligação do substrato à proteinase (Drenth *et al.*, 1976). Entretanto, como a cistatina não se liga diretamente a resíduos do sítio catalítico da proteinase, o mesmo não sofre a clivagem que o substrato natural da enzima sofreria (Bode e Huber, 1992).

6. PLANTAS TRANSFORMADAS COM GENES DE INIBIDORES DE α -AMILASE E PROTEINASE.

A prospecção de genes de interesse pode ser considerado o passo chave no desenvolvimento de plantas resistentes a insetos. Neste sentido, os inibidores de α -amilase e proteinase apresentam grande potencial por reduzirem ou impedirem a atividade destas enzimas. Devido a atividade inibitória sobre as enzimas digestivas do inseto, os inibidores podem causar a morte das larvas dos insetos devido a redução no desenvolvimento. A proteção eficiente contra insetos em plantas transformadas demanda que os mesmos sejam acumulados em células vegetais em um nível muito maior do que em plantas não transformadas (Augustyniak *et al.*, 1997). A introdução de genes que codificam inibidores de α -amilase em culturas economicamente importantes tem sido utilizada visando aumentar a resistência destas a diferentes insetos (Tabela 4).

Ervilhas transformadas com o gene que codifica o α -A11 se apresentaram completamente resistentes ao besouro da ervilha *Bruchus pisorum*, um inseto que danifica as ervilhas que estão em crescimento no campo (Shade *et al.*, 1994; Schroeder *et al.*, 1995). Os ovos eclodem e a larva penetra na vagem para comer a semente. Em sementes transgênicas contendo aproximadamente 1,0 % de α -A11, as larvas não conseguem se desenvolver (Schroeder *et al.*, 1995). De posse destes resultados, Ishimoto *et al.* (1996), utilizando o mesmo gene α -A11, na transformação do feijão azuki, obteve plantas resistentes aos bruquídeos *C. macu-*

ao *C. chinensis* foram evidentes e o impacto da presença de α AI1 causou a morte de todas as larvas infestadas.

Dietas baseadas em sementes de leguminosas cruas apresentam um efeito deletério na digestão de animais devido a presença de antinutrientes. A presença de grandes quantidades de α -AI1 causaram a inibição de α -amilase duodenal humana (Layer *et al.*, 1985). Em 1995, Puztai *et al.* colaboradores mostraram uma diminuição na digestão de amido, proteínas e lipídeos dos ratos. Estudos posteriores utilizando, ervilhas transgênicas expressando α -AI1 (Schroeder *et al.*, 1995) em análises de digestão em ratos mostraram que a redução na digestão e na absorção dos nutrientes causada por estas ervilhas não foi significativa (Puztai *et al.*, 1999). Apesar da polêmica as leguminosas transgênicas são seguras para a alimentação desde que as sementes sejam cozidas ou processadas antes do consumo por seres humanos. Uma vez desnaturados, estes inibidores não funcionam como anti-nutrientes, mas sim como fonte de aminoácidos da mesma forma que as proteínas de armazenamento (Chrispeels *et al.*, 1998). Entretanto, é necessário identificar α -AIs com alta especificidade para α -amilases de insetos e ao mesmo tempo inespecíficos para as α -amilases de mamíferos. Tais genes seriam potencialmente promissores para a construção de plantas transgênicas seguras e efetivas.

Em 1987, Hilder *et al.* obtiveram a primeira planta transgênica expressando um gene que codifica para o inibidor de proteinase. Eles obtiveram plantas de tabaco contendo o gene que codifica para o inibidor de proteinase serínica de feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (Gatehouse & Gatehouse, 1998). Estas plantas, que são susceptíveis ao inseto *Heliothis virescens*, adquiriram altos níveis de resistência ao mesmo. Em estudos subsequentes, mostrou-se que estas plantas também eram resistentes aos insetos *Lacanobia oleracea* e *Otiorhynchus sulcatus* (Gatehouse & Gatehouse, 1998). Desde então, muitas outras plantas de interesse comercial foram transformadas com

genes de inibidores de proteinases e passaram a apresentar resistência a pragas (Gatehouse & Gatehouse, 1998). Algumas delas estão apresentadas na **Tabela 5**.

O uso de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas em transformação de plantas, com o intuito de controlar o ataque de insetos, é uma estratégia bastante promissora. Estes inibidores, entretanto, devem ser selecionados, levando-se sempre em consideração a fisiologia e a bioquímica de sua digestão pelo inseto. É também importante, fazer uso de combinações destes inibidores, com outras proteínas que induzem estresse ou inibem o crescimento dos insetos a serem controlados.

Tabela 1. Diferentes inibidores de α -amilase e seus sítios de interação.

| INIBIDOR | FONTE | RESÍDUOS DE INTERAÇÃO | α -AMILASE | AUTORES |
|--------------|----------------------------|---|-------------------|-----------------------------------|
| Tendamista t | <i>Streptomyces tendae</i> | Trp ¹⁸ , Arg ¹⁹ , Tyr ²⁰ | Mamíferos | Freund et al. (1995) |
| BASI | <i>Hordeum vulgare</i> | Arg ²⁷ , Arg ¹²⁷ , Arg ¹⁵⁵ | Endógena | Rodenburg et al. (1995) |
| WASI | <i>Triticum aestivum</i> | Arg ²⁷ , Arg ¹²⁷ , Arg ¹⁵⁵ | Endógena | Zemke et al. (1991) |
| RAGI | <i>Eleusine coracana</i> | Ser ¹ , Val ² , Gly ³ , Thr ⁴ , Ser ⁵ , Cys ⁶ , Ile ⁷ , Met ¹⁰ , Ala ¹¹ , Pro ⁵² , Ala ⁵³ , Tyr ⁵⁴ , Cys ⁵⁵ , Arg ⁶¹ , Asp ⁶⁵ , Val ⁶⁷ , Val ⁶⁸ , Thr ⁶⁹ , Ser ⁷⁰ , Gly ⁷² , Thr ¹⁰⁷ , Ile ¹⁰⁸ , His ¹⁰⁹ , Gly ¹¹⁰ , Leu ¹¹⁵ , Ser ¹¹⁶ , Leu ¹¹⁷ | TMA PPA | Strobl et al. (1998) ^b |

Continua...

Continuação **Tabela 1.** Diferentes inibidores de α -amilase e seus sítios de interação.

| INIBIDOR | FONTE | RESÍDUOS DE INTERAÇÃO | α -AMILASE | AUTORES |
|---------------|---------------------------|---|-------------------|--|
| 0.23 | <i>Triticum aestivum</i> | Cys ⁵⁴ , Arg ⁵⁵ , Cys ⁵⁶ | TMA | Garcia Maroto et al. (1991) |
| α -AI1 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | Asn ³⁵ , Tyr ³⁷ , Asp ³⁸ , Met ⁴⁰ , His ⁷³ , Arg ⁷⁷ , Ser ⁷⁸ , Tyr ¹⁸⁶ , Trp ¹⁸⁸ , Ser ¹⁸⁹ , Tyr ¹⁹⁰ | PPA CMA CCA | Bompard-Gilles et al. 1996 & Silva et al. (1999) |
| α -AI2 | <i>Phaseolus vulgaris</i> | His ³⁵ , Val ³⁷ , Asp ³⁸ , Met ⁴⁰ , Gln ⁷³ , Arg ⁷⁷ , Ser ⁷⁸ , His ¹⁸⁶ , Tyr ¹⁸⁸ , Ser ¹⁸⁹ , Phe ¹⁹⁰ | ZSA | Grossi de Sá et al. (1997) |

* Os resíduos em negritos interagem diretamente com o sítio catalítico do α -amilase.

Tabela 2. Famílias de Enzimas Proteolíticas.

| FAMÍLIAS | PROTEINASES REPRESENTATIVAS | RESÍDUOS DOS SÍTIOS ATIVOS |
|------------------------|---|--|
| Proteinase Serínica I | Quimiotripsina <i>Tripsina</i> Elastase <i>Kalicleína pancreática</i> | Asp ¹⁰² , Ser ¹⁹⁵ , His ⁵⁷ |
| Proteinase Serínica II | Subtilisina | Asp ³² , Ser ²²¹ , His ⁶⁴ |
| Proteinase Cisteínica | Papaína <i>Actidina</i> <i>Catepsinas B e H</i> | Cys ²⁵ ou Asp ¹⁵⁸ , His ¹⁵⁹ |
| Proteinases Aspárticas | Penicilopepsina <i>Rhizopus chineses e Endothia parasítica</i> Proteinases ácidas Renina | Asp ³³ , Asp ²¹³ |
| Metalo-proteinases I | Carboxipeptidase bovina A | Zn, Glu ²⁷⁰ , Try ²⁴⁸ |
| Metalo-proteinases II | Termolisina | Zn, Glu ¹⁴³ , Hys ²³¹ |

Tabela 3. Inibidores de proteinases de plantas.

| CLASSES | FAMÍLIAS |
|---------------------------------------|--|
| Inibidores de proteinases serínicas | Inibidor de tripsina de soja (Kunitz) Inibidor de Bowman-Birk Inibidor de tripsina de cevada Inibidor de batata I Inibidor de batata II Inibidor de abóbora Inibidor bifuncional de milho/Ragi I- |
| Inibidores de metalo-proteinases | Inibidor de carboxipeptidase A, B. |
| Inibidores de proteinases cisteínicas | Inibidor de proteinase cisteínica (fitocistatinas) |
| Inibidores de proteinases aspárticas. | Inibidor de proteinase aspártica |

Tabela 4. Plantas que tiveram sua resistência aumentada pela expressão de inibidores de α -amilase.

| PLANTAS | GENE | FONTE | INSETO-ALVO | AUTORES |
|---------------------------|--------------|---------------------------|--|-------------------------|
| <i>Pisum sativum</i> | α -AI | <i>Phaseolus vulgaris</i> | <i>C. maculatus</i> <i>C. chinensis</i> | Shade et al. (1994) |
| <i>Pisum sativum</i> | α -AI | <i>Phaseolus vulgaris</i> | <i>B. pisorum</i> | Schroeder et al. (1995) |
| <i>Vigna angustifolia</i> | α -AI | <i>Phaseolus vulgaris</i> | <i>C. chinensis</i> <i>C. maculatus</i> <i>C. analis</i> | Ishimoto et al. (1996) |
| Tabaco | α -AI | <i>Triticum aestivum</i> | <i>A. ipsilon</i> <i>Spodoptera ssp.</i> | Gatehouse et al. (1998) |

Tabela 5. Plantas transgênicas expressando genes para inibidores de proteinases.

| PLANTA | GENES | INSETO |
|---------|-----------------------------------|---|
| Tabaco | CpTI Pot PI II CpTI NaPI | <i>Heliothis virescens</i> Lepdoptera <i>Heliothis virescens</i> <i>Helicoverpa punctigera</i> |
| Batata | CpTI | <i>Lacanobia oleracea</i> |
| Tomate | Pot PI I, Pot PI II | <i>Helicoverpa armigera</i> <i>Teleogryllus commodus</i> |
| Arroz | Pot PI II, CpTI | <i>Sesamia inferens</i> <i>Chilo suppressalis</i> <i>Otiorynchus sulcatus</i> |
| Morango | CpTI | <i>T. commodus</i> |
| Alface | Pot PI II | Coleoptera |
| Canola | OC-I CII | Lepdoptera, Diptera |
| Maçã | CpTI | <i>Cydia pomonella</i> |
| Álamo | OC-I CII | <i>Chrysomela tremulae</i> Lepdoptera |

CII = inibidor de proteinase serínica de soja;
CpTI = inibidor de tripsina de feijão-de-corda;
NaPI = inibidor de proteinase de *Nicotiana glauca*;
OC I = inibidor de cisteína de arroz;
Pot PI I = inibidor de proteinase I de batata;
Pot PI II = inibidor de proteinase II de batata.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.; EMORI, Y.; KONDO, H.; SUZUKI, K.; ARAI, S. The NH₂-terminal 21 amino acid residues are not essential for the papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a member of the cystatin superfamily. Expression of oryzacystatin cDNA and its truncated fragments in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 16, p. 7655-9, 1988.

ABE, K.; KONDO, H.; ARAI, S. Purification and characterization of a rice cysteine proteinase inhibitor. **Agricultural and Biological Chemistry**, n. 51, p. 2763-2768, 1991.

ABE, M.; ABE, K.; KURODA, M.; ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. **European Journal of Biochemistry**, v. 209, n. 3, p. 933-7, 1992.

ABE, J.I.; SIDENIUS, U.; SVENSSON, B. Arginine is essential for the α -amylase inhibitory activity of the α -amylase/subtilisin inhibitor (BASI) from barley seeds. **Biochemical Journal**, n. 293, p. 151-155, 1993

APPLEBAUM, S. W. Biochemistry of Digestion. In: KERKUT, G. A.; GILBERT, L. I., ed **Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Farmacology**, New York, n. 4, p. 279- 311, 1985.

ARDELT, W.; LASKOWSKI, M. J.R. *Effect of single amino acid replacements on the thermodynamics of the reactive site peptide bond hydrolysis in ovomucoid third domain.* **Journal of Molecular Biology**, n. 220, p. 1045-1053, 1993.

ARY, M.B.; RICHARDSON, M.; SHEWRY, P.R. Purification and characterization of an insect α -amylase inhibitor/endochitinase from seeds of Job's Tears (*Coix Lachryma-jobi*). **Biochemical Biophysical Acta**, n. 913, p. 260-266, 1989.

AUGUSTYNIAK, J.; DABERT, M.; WYPIJEWSKI, K. Transgenes in plants: protection against viruses and insects, **Acta Physiologica Plantarum**, v. 19, n. 4, p. 561-569, 1997.

BARRET, A. J.; RAWLINGS, N.D.; DAVIES, M. E.; MACHLEIDT, W.; SALVESEN, G.; TURK, V. In: BARRET, A. J.; SALVESEN, G., ed., **Proteinases Inhibitors**, Amsterdam: Elsevier, p. 515-569, 1986.

BAŮDYS, M.; GOSH, M.; HARLOS, K.; MARES, M.; FUSEK, M.; KOSTKA, V.; BLAKE, C.C.F. Crystallization and preliminary crystallographic study of cathepsin D inhibitor from potatoes, **Journal of Molecular Biology**, n. 218, p. 21-22, 1991.

BILLETER, M.; KLINE, A.D.; BRAUN, W.; HUBER, R.; WUTHRICH, K. Comparison of the high-resolution structures of the α -amylases inhibitor tendamistat determined by nuclear magnetic resonance in solution and by X-ray diffraction in single crystals. **Journal of Molecular Biology**, n. 206, p. 677-687, 1989

BLOCH JR., C.; RICHARDSON, M. A new family of small (5 kD) protein inhibitors of insect α -amylase from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) have sequence

- homologies with wheat α purothionins. **FEBS-Letters**, v. 279, n.1, p. 101-104, 1991.
- BODE, W.; HUBER, R. Natural Protein Proteinase Inhibitor and their Interaction with Proteinases. **European Journal of Biochemistry**, n. 204, p. 433-451, 1992.
- BOMPARD-GILLES, C.; ROUSSEAU, P.; ROUGÉ, P.; PAYAN, F. Substrate mimicry in the active center of a mammalian α -amylase: structural analysis of an enzyme inhibitor complex. **Structure**, n. 4, p. 1441-1452, 1996.
- BROADWAY, R. M.; DUFFEY, S.S. Plant Proteinases Inhibitors: Mechanism of Action and Effect on the Growth and Digestive Physiology of Larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*, **Journal of Insect Physiology**, n. 32, p. 827-833, 1986.
- BROW, W. M.; DZIEGIELEWSKA, K. M. Friends and relations of the cystatin superfamily--new members and their evolution, **Protein Science**, v. 6, n.1, 5-12, 1997.
- BRZIN, J.; KIDRIC, M. Proteinases and Their Inhibitors in Plants: Role in Normal Growth and Response to Various Stress Conditions, **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 15, n. 13, p. 421-467, 1995.
- CAMPOS, F.A.P.; XAVIER-FILHO, J.; SILVA, C.P.; ARY, M.B. Resolution and partial characterization of proteinases and α -amylases from midguts of larvae of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus* (F.), **Comp. Biochemistry Physiology**, v. 92B, n. 1, p. 51-57, 1989.
- CHAPMAN, R. Structure of digestive system, In: KERKUT, G.A., ed., **Comprehensive Insect Physiology**, **Biochemistry and Pharmacology**, New York: Pergamon Press, v. 4, p. 165-211, 1985.
- CHRISPELLES, M.J.; RAIKHEL, N.V. Lectins, lectin genes and their role in plant defense, **Plant Cell**, n. 3, p. 1-19, 1991.
- CHRISPELLES, M.J.; GROSSI DE SÁ, M.F.; HIGGINS, T.J.V. Genetic engineering with α -amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids, **Seed Science Research**, n. 8, p. 257-263, 1998.
- CHRISPELLES, M.J. (1999) Transfer of bruchid resistance from the common bean to other starchy grain legumes by genetic engineering with the α -amylase inhibitor gene, in Cap. 9, p. 139-156.
- CARVALHO, P.G.B. de; BLOCH JR., C.; MORLY, L.; DA SILVA, M.C.M. da; MELLO, L.V.; NESHICH, G. Aminoacid sequence of the *Phaseolus vulgaris* var. "Fogo na Serra" and interactive surface modeling for the enzyme inhibitor complex, **Journal of Protein Chemistry**, v. 15, n. 6, p. 591-598, 1996.
- SILVA, M.C.M. da ; GROSSI DE SÁ, M.F.; CHRISPELLES, M.J.; TOGAWA, R.C.; NESHICH, G. Analysis of structural physico-chemical and steric parameters that could define the specificity of binding between different α -amylases and their inhibitors, **Protein Engineering**, aceito, 1999.
- DRENTH, J.; KALK, K.H.; SWEN, H.M. Binding of chloromethyl ketone substrate analogues to crystalline papain, **Biochemistry**, v. 15, n. 17, p. 3731-8, 1976.
- EDMONDS, H. S.; GATEHOUSE, L. N.; HILDER, V. A.; GATEHOUSE, J. A. The Inhibitory Effects of the Cysteine

Proteinase Inhibitor, Oryzacystatin, on the Digestive Proteases and on Larval Survival and Development of the Southern Corn Rootworm (*Diabrotica undecimpunctata howardi*), **Entomologia Experimentalis et Applicata**, n. 78, p. 83-94, 1996.

ERLICH, P.R.; RAVEN, P.H. Butterflies and Plants: a study in coevolution, **Evolution**, n. 18, 1964.

FENG, G.H.; RICHARDSON, M.; CHEN, M.S.; KRAMER, K.J.; MORGAN, T.D.; REECK, G.R. α -amylase inhibitors from wheat: amino acid sequences and patterns of inhibition of insect and human α -amylases, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 26, n. 5, p. 419-426.

FERNANDES, K. V.; SABELLI, P. A.; BARRATT, D. H.; RICHARDSON, M.; XAVIER-FILHO, J.; SHEWRY, P. R. The resistance of cowpea seeds to bruchid beetles is not related to levels of cysteine proteinase inhibitors. **Plant Molecular Biology**; v. 23, n. 1, p. 215-9, 1993.

FERREIRA, C.; OLIVEIRA, M.; TERRA, W. Compartmentalization of the digestive process in *Abracris flavolineata* (Orthoptera: Acrididae) adults, **Insect Biochemistry**, n. 20, p. 267-274, 1990..

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D.J.; MELO, F.R.; BLOCH JR., C.; SILVA, C.P.; GROSSI DE SÁ, M.F. Activity of wheat α -amylase inhibitors towards bruchid α -amylases and structural explanation of observed specificities, **European Journal of Biochemistry**, aceito.

FREUND, J.; VERTESY, L.; KOLLER, K.-P.; WOLBER, V.; HEINTZ, D.; KALBITZEN, H.R. Complete ^1H nuclear

magnetic resonance assignments and structure characterization of a fusion protein of the α -amylase inhibitor Tendamistat with the activation domain of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein, **Journal of Molecular Biology**, n. 250, p. 672-688, 1995.

GARCIA-CASADO, G.L.; SANCHEZ-MONGE, R.; LOPEZ-OTIN, C.; SALCEDO, G. Rye inhibitors of animal α -amylases shown different specificities, aggregative properties and IgE-binding capacities than their homologues from wheat and barley, **European Journal of Biochemistry**, n. 224, p. 525-531, 1994.

GARCIA-MAROTO, F.; CARBONERO, P.; GARCIA-OLMEDO, F. Site-directed mutagenesis and expression in *Escherichia coli* of WMAI-1, a wheat monomeric inhibitor of insect α -amylase, **Plant Molecular Biology**, n. 17, p. 1005-1011, 1991.

GATEHOUSE, A.M.R.; BOULTER D.; HILDER, V.A. Potential of Plant-derived Genes in the Genetic Manipulation of Crops for Insect Resistance. In: **Biotechnology in Agriculture, Plant Genetic Manipulation for Crop Protection**, CAB International, n. 7, p.155-181, 1992.

GATEHOUSE, A. M. R.; GATEHOUSE, J. A. Identifying proteins with insecticidal activity: use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Pesticide Science**, n. 52, p. 165-175, 1998.

GROSSI DE SÁ, M.F.; MIRKOV, T.E.; ISHIMOTO, M.; COLUCCI, G.; BATEMAN, K.S.; CHRISPEELS, M.J. Molecular characterization of a bean α -amylase inhibitor

that inhibits the α -amylase of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus*, **Planta**, n. 203, p. 295-303, 1997.

GROSSI DE SÁ, M.F.; CHRISPEELS, M.J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) α -amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 4, p. 271-281, 1997.

GRUDEN K.; STRUKELJ B.; POPOVIC T.; LENARCIC B.; BEVEC T.; BRZIN J.; KREGAR I.; HERZGOG-VELIKONJA J.; STIEKMA W. J.; BOSH D.; JONGSMA M. A. The cysteine activity of Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say) guts, which is insensitive to potato protease inhibitors, is inhibited by thyroglobulin type-1 domain inhibitors, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, n. 28, p. 549-560, 1998.

GRUTTER, M.G.; PRIESTLE, J.P.; RAHUEL, J.; GROSSENBACHER, H.; BODE, W.; HOFSTEENGE, J.; STONE, S. R. Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition, **EMBO Journal**, n. 9, p. 2361-2365, 1990.

GVOZDEVA, E.L.; VALUEVA, T.A.; MOSOLOV, V.V. Enzymatic oxidation of the bifunctional wheat inhibitor of subtilisin and endogenous α -amylase, **FEBS-Letters**, v. 334, n. 1, p. 72-74, 1993.

HILDER, V.; GATEHOUSE, A.; SHEERMAN, S.; BARKER, R.; BOULTER, D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco, **Nature**, n. 330, p. 160-163, 1987.

ISHIMOTO, M.; SATO, T.; CHRISPEELS, M.J.; KITAMURA, K. Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed α -amylase inhibitor of common bean. **Entomologica Experimentalis Applicata**, n. 79, p. 309-315, 1996.

JOHNSON, R.; NARVAEZ, J.; AN, G.; RYAN, C. Expression of proteinase inhibitors I and II in transgenic tobacco plants: effects on natural defense against *Manduca sexta* larvae, 1989

JOUANIN, L.; BONADE-BOTTINO, M.; GIRARD, C.; MORROT, G.; GIBAND, M. Transgenic plants for insect resistance, **Plant Science**, n. 131, p. 1-11, 1998.

KASAHARA, K.; HAYASHI, K.; ARAKAWA, T.; PHILO, J.S.; WEN, J.; HARA, S.; YAMAGUCHI, H. Complete sequence, subunit structure, and complexes with pancreatic α -amylase of a α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney beans, **Journal Biochemistry**, n.120, p. 177-183, 1996.

KICZAK L.; KOSCIELSKA K.; OTLEWSKI J.; CZERWININSKI M.; DADLEZ M. Phage Display selection of P1 mutants of BPTI directed against five different serine proteinases, **Biological Chemistry**, v. 380, n. 1, p. 101-105, 1999.

KIMURA, M.; IKEDA, T.; FUKUMOTO, D.; YAMASAKI, N.; YONEKURA, M. Primary structure of a cysteine proteinase inhibitor from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill). **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 59, n. 12, p. 2328-9, 1995

KONDO, H.; ABE, K.; EMORIM, Y.; ARAI, S. Papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a rice seed cysteine proteinase

inhibitor, depends on the central Gln-Val-Val-Ala-Gly region conserved among cystatin superfamily members, **Journal Biochemistry (Tokyo)**, v. 109, n. 2, p. 294-8, 1991.

KUDO, N.; NISHIYAMA M.; SASAKI, H.; ABE, K.; ARAI, S.; TANOKURA, M. Crystallization and Preliminary X-Ray Diffraction Studies on a Rice Cysteine Proteinase Inhibitor, Oryzacystatin-I, **Journal of Biochemistry**, n.123, p. 568-570, 1998.

LA JOLO, F.M.; FINARDI-FILHO, F.; MENEZES, E.W. Amylase inhibitors in *Phaseolus vulgaris* bean, **Food Technology**, p. 119-121, 1991.

LA JOLO, F.M.; FINARDI FILHO, F. Partial characterization of the amylase inhibitor of black bean (*Phaseolus vulgaris*), variety Rico 23. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, p. 33-132, 1985.

LASKOWSKI, M. JR.; KATO, I. Protein inhibitors of proteinases. **Annual Review of Biochemistry**, n. 49, p. 593-626, 1980.

LAYER, P.; CARLSON, G.L.; DIMAGNO, E.P. Partially purified white bean amylase inhibitor reduces starch digestion *in vitro* and inactivates intraduodenal amylase in humans, **Gastroenterology**, n. 88, p. 1895-1902, 1985.

LENZ, C.; KANG, J.; RICE, W.; MCINTOSH, A.; CHIPPENDALE, G.; SCHUBERT, K. Digestive proteinases of larvae of the corn earworm *Heliothis zea*: characterization, distribution and dietary relationships.

Archives of Insect Biochemistry and Physiology, n. 16, p. 201-212, 1991.

MARSHALL, J.J. α -Amylase inhibitors from plants. In: **Physiological effects of food carbohydrates**, cap. 16, p. 244-263, 1975.

MARSHALL, J.J.; LAUDA, C.M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α -amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*, **Journal of Biological Chemistry**, v. 250, n. 20, p. 8030-8037, 1975.

MCMANUS, M. T.; BURGESS, E. P. J. Effects of the Soybean (Kunitz) Trypsin Inhibitor on the Growth and Digestive Proteases of Larvae of *Spodoptera litura*, **Journal of Insect Physiology**, n. 41, p. 731-738, 1995.

MELO, F.R. Isolamento e caracterização parcial de inibidores de α -amilase em sementes de *Vigna unguiculata*. 1997. (UFC), p. 95, **Dissertação de Mestrado**.

MIRKOV, T.E.; EVANS S.V.; WAHLSTROM, J.; GOMEZ L.; YOUNG, N.M.; CHRISPEELS, M.J. Location of the active site of the bean α -amylase inhibitor and involvement of a Trp, Arg, Tyr triad, **Glycobiology**, n. 5, p. 45-50, 1995.

MORENO, J.; CHRISPEELS, M.J. A lectin gene encodes the α -amylase inhibitor of the common bean, **Proceedings Natural Academy Science USA**, n. 86, p. 7885-7889, 1989.

MURDOCK, L. L.; BROOKHART, G.; DUNN, P. E.; FOARD, D. E.; KELLEY, S.; KITCH, L.; SHADE, E. R.; SHUKLE, R. H.; WOLFSON, J. L. Cysteine Digestive Proteinases in

Coleoptera. **Comp. Biochemistry Physiology**, v. 87B, n. 4, p. 783-787, 1986..

NAHOUM, V.; FARISEI F.; LE-BERRE-ANTON, V.; EGLOFF, M.P.; ROUGE, P.; POERIO, E.; PAYAN, F. A plant-seed inhibitor of two classes of alpha-amylases: X-ray analysis of *Tenebrio molitor* larvae alpha-amylase in complex with the bean *Phaseolus vulgaris* inhibitor, **Acta Crystallographica D Biological Crystallography**, Jan; v. 55, n. 1, p. 360-2, 1999.

NAKAGUCHI, T.; ANAKAWA, T.; PHILO, J.S.; WEN, J.; ISHIMOTO, M.; YAMAGUCHI, H. Structural characterization of an α -amylase inhibitor from a wild common bean (*Phaseolus vulgaris*) insight into the common structural features of leguminous α -amylase inhibitors, **Journal of Biochemistry**, n.121, p. 350-354, 1997.

NEURATH, H. The Diversity of Proteolytic Enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S., ed., **Proteolytic Enzymes: A Practical Approach.**, New York: Oxford University Press, n. 1, p. 1-14. 1996.

ODA, Y.; MATSUNAGA, T.; FUKUYIAMA, K.; MIYASAKI, T.; MORIMOTO, J.T. Tertiary and quaternary structures of 0.19 α -amylase inhibitor from wheat kernel determined by x-ray analysis at 2.06 Å resolution, **Biochemistry**, n. 36, p. 13503-13511, 1997.

POERIO, E.; CAPORALE, C.; CARRANO, L.; PUCCI, P.; BUONOCORE, V. Assignment of the five disulfide bridges in an α -amylase inhibitor from wheat kernel by fast-atom bombardment mass spectrometry and Edman degradation,

European Journal of Biochemistry, n. 199, p. 595-600, 1991

PUEYO, J.J.; HUNT, D.C.; CHRISPHEELS, M.J. Activation of bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase inhibitor requires proteolytic processing of the proprotein. **Plant Physiology**, n. 101, p. 1341-1348, 1993.

PUSZTAI, A.; GRANT, G.; DUGUID, T.; BROWN, D.S.; PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M.; BARDOCZ, S. Inhibition of starch digestion by α -amylase inhibitor reduces the efficiency of utilization of dietary proteins and lipids and retards the growth of rats. **Journal of Nutrition**, n. 125, p. 1554-1562, 1995.

PUSZTAI A.; BARDOCZ G.G.; ALONSO R.; CHRISPHEELS -M.J.; SCHROEDER H.E.; TABE L.M.; HIGGINS, T.J. Expression of the insecticidal bean alpha-amylase inhibitor transgene has minimal detrimental effect on the nutritional value of peas fed to rats at 30% of the diet, **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 8, p.1597-603, 1999.

QUIAN, M.; HASER, R.; PAYAN, F. Structure and molecular model refinement of pig pancreatic α -amylase at 2.1 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, n. 231, p. 785-799, 1993.

RITONJA, A.; KRIZAJ, I.; MESKO, P.; KOPITAR, M.; LUCOVNIK, P.; STRUKELJ, B.; PUNGERCAR, J.; BUTTLE, D. J.; BARRET, A. J.; TURK, V. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato, **FEBS-Letters**, v. 267, n. 1, p. 13-5, 1990.

- RODENBURG, K.W.; VARALLYAY, E.; SVENDSON, I.; SVENSSON, B. Arg-27, Arg-127 and Arg-155 in the α -trefoil protein barley α -amylase/subtilisin inhibitor are interface residues in the complex with barley α -amylase, **Biochemical Journal**, n. 309, p. 969-976, 1995.
- RODI D., J.; MAKOWSKI L. Phage display technology – finding a needle in a vast molecular haystack, **Analytical Biotechnology**, n. 10, p. 87-93, 1999.
- RYAN, C. A.; WALKER-SIMMONS, M. Plant Proteinases. In: MARCUS, A. (ed.), **The Biochemistry of Plants**, New York, Academic Press, n. 6, p. 321-350, 1981.
- RYAN, C. A. Protease Inhibitors in Plants: Genes for Improving Defenses Against Insects and Pathogens, **Annual Review of Phytopathology**, n. 28, p. 425- 449, 1991.
- RYAN, S. N.; LAING, A. W.; MCMANUS, M. T. A Cysteine Proteinase Inhibitor Purified from Apple Fruit, **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 957-963, 1998.
- SANTINO, A.; DAMINATI, M.E.; VITALE, A.; BOLTINI, R. The α -amylase inhibitor of bean seeds: two step proteolytic maturation in the protein storage vacuoles of the developing cotyledon, **Physiologia Plantarum**, n. 85, p. 425-432, 1992.
- SCHROEDER, H.E.; GOLLASH, S.; MOORE, A.; TABE, L.M.; CRAIG, S.; HARDIE, D.; CHRISPPEELS, M.J.; SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V. Bean α -amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil, *Bruchus pisorum*, in genetically engineered peas (*Pisum sativum* L.), **Plant Physiology**, n. 107, p. 1233-1239, 1995.
- SCHULER, H. T.; POPPY, M. G.; KERRY B. R.; DENHOLM L. Insect-Resistant Transgenic Plants, **Tibtech**, n. 16, p. 168-174, 1998.
- SHADE, R.E.; SCHROEDER, H.E.; PUEYO, J.J.; TABE, L.L.; MURDOCK, T.J.V.; HIGGINS, M.J.; CHRISPPELLS, M.J. Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to bruchid beetles, **Bio/Technology**, n. 12, p. 793-796, 1994.
- SHEWRY, P. R.; LUCAS, J. A. Plant Proteins that Confer Resistance to Pests and Pathogens. In: CALLOW, J. (ed.), **Advances in Botanical Research**, London: Academic Press, n. 26, p. 136-192, 1997.
- SILVA, C.P.; TERRA, W.R.; XAVIER-FILHO, J.; GROSSI DE SÁ, M.F.; LOPES, A.R.; PONTES, E.G. Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, n. 29, p. 355-366, 1999.
- STROBL, S.; GOMIS-RUTH, F.X.; MASKOS, K.; FRANK, G.; HUBER, R.; GLOCKSHUBER, R. The α -amylase from the yellow meal worm: complete primary structure, crystallization and preliminary X-ray analysis, **FEBS-Letters**, n. 409, p. 109-114, 1997.
- STROBL, S.; MASKOS, K.; BETZ, M.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GOMIS-RÜTH, F.X.; GLOCKSHUBER, R. Crystal structure of yellow meal worm α -amylase at 1.64 Å

- resolution, **Journal of Molecular Biology**, n. 278, p. 617-628, 1998^a.
- STROBL, S.; MASKOS, K.; WIEGAND, G.; HUBER, R.; GOMIS-RUTH, F.X.; GLOCKSHUBER, R. A novel strategy for inhibition of α -amylases: yellow meal worm \square -amylase in complex with the *Ragi* bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. **Structure**, v. 6, n. 7, p. 911-921, 1998^b.
- STUBBS, M.T.; LABER, B.; BODE, W.; HUBER, R.; JERALA, R.; LENARCICK, B.; TURK, V. The refined 2.4 Å x-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. **EMBO Journal**, n. 9, p. 1939-1947, 1990.
- TERRA, W.; FERREIRA, C.; DE BIANCHI, A. Distribution of digestive enzymes among the endo- and ectoperitrophic spaces and midgut cells of *Rhynchosciara* and its physiological significance, **Journal of Insect Physiology**, n. 25, p. 487-494, 1979.
- TERRA, W. Evolution of digestive systems of insects, **Annual Veridical Entomologia**, n. 35, p. 181-200, 1979.
- TURK, V.; BODE, W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases, **FEBS-Letters**, v.285 (2), n.22, p. 213-9, 1991.
- VALLÉ, F.; KADZIOLA, A.; BOURNE, Y.; JUY, M.; RODENBURG, K.W.; SVENSSON, B.; HASER, R. Barley α -amylase bound to its endogenous protein inhibitor BASI: crystal structure of the complex at 1.9 Å resolution, **Structure**, n. 6, p. 649-659, 1998.

- WALKER, A. J.; FORD, L.; MAJERUS, M. E. M. GEOGHEGAN, A. E.; BIRCH, N.; GATEHOUSE, J. A. GATEHOUSE, A. M. R. Characterization of the Mid-gut Digestive Proteinase Activity of the Two-spot Ladybird (*Adalia bipunctata*) and its Sensitivity to Proteinase Inhibitors, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, n. 28, p. 173-180, 1997.
- WIGGLESCOORTH, V. **The Principles of Insect Physiology**, 6th ed., London: Methuen, 1972.
- XAVIER-FILHO, J. The Biological Roles of Serine and Cysteine Proteinase Inhibitors in Plants, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, n. 1, p.1-6, 1992.
- YAMAGATA, H.; KUNIMATSU, K.; KAMASAKA, H.; KURAMOTO, T.; IWASAKI, T. Rice bifunctional α -amylase/subtilisin inhibitor: characterization, localization, and changes in developing and germinating seeds, **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 62, n. 5, p. 978-985, 1998.
- YAMAGUCHI, H. Isolation and characterization of the subunits of a heat labile α -amylase inhibitor from *Phaseolus vulgaris* white kidney bean, **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, n. 57, p. 297-302, 1993.
- YOUNG, N.M.; THIBAUT, P.; WATSON, D.C.; CHRISPEELS, M.J. Post-translational processing of two α -amylase inhibitors and an arcelin from the common bean, *Phaseolus vulgaris*, **FEBS-Letters**, n. 446, p. 203-206, 1999.

ZEMKE, K.J.; MÜLLER-FAHRNOW, A.; JANY, K.-D.; PAL, G.P.; SAENGER, W. The three-dimensional structure of the bifunctional proteinase K/ α -amylase inhibitor from wheat (PK13) at 2.5 Å resolution, **FEBS-Letters**, v. 279, n. 2, p. 240-242, 1991.



Recursos Genéticos e Biotecnologia

Inibidores proteicos de ...

1999

FL-05252



CENARGEN- 18744-1

**MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA E DO
ABASTECIMENTO**

**GOVERNO
FEDERAL**