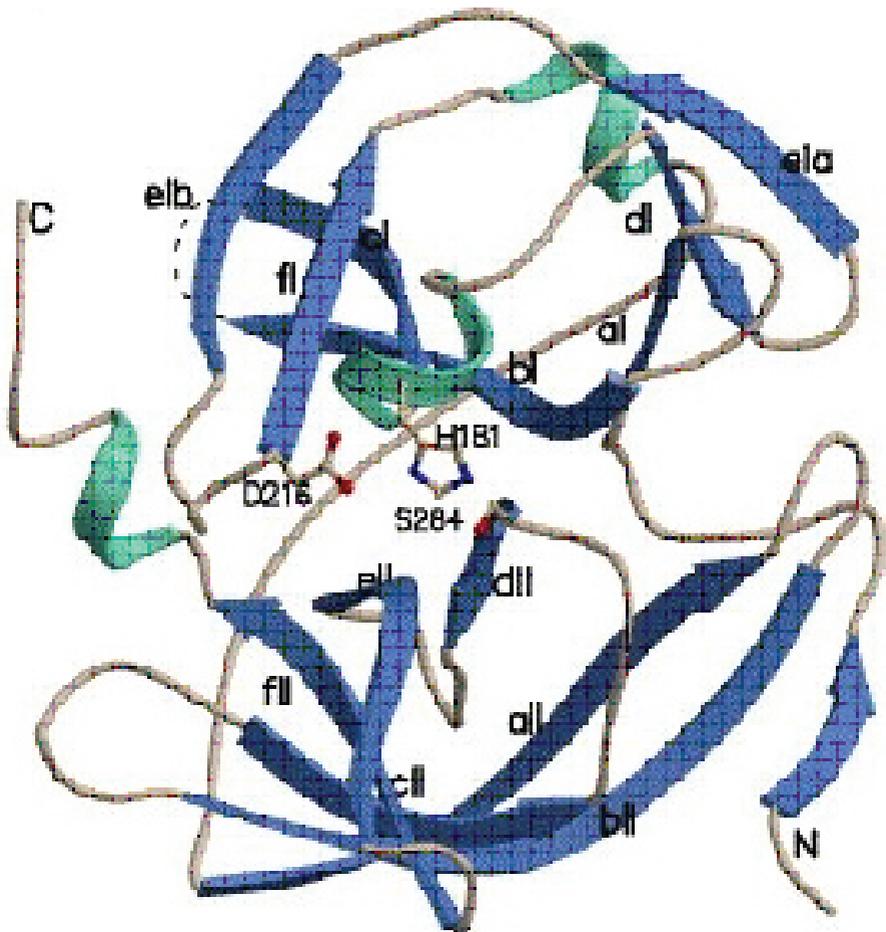


## Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas



ISSN 1983-0513  
Junho, 2009

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Amazônia Oriental  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Documentos 353**

## **Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Plantas Contra Pragas**

*Célia Regina Tremacoldi*

Embrapa Amazônia Oriental  
Belém, PA  
2009

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Amazônia Oriental**

Tv. Dr. Enéas Pinheiro, s/n.  
Caixa Postal 48. CEP 66095-100 - Belém, PA.  
Fone: (91) 3204-1000  
Fax: (91) 3276-9845  
www.cpatu.embrapa.br  
sac@cpatu.embrapa.br

**Comitê Local de Editoração**

Presidente: *Moacyr Bernardino Dias-Filho*  
Secretário-Executivo: *Walkymário de Paulo Lemos*  
Membros: *Adelina do Socorro Serrão Belém, Ana Carolina Martins de Queiroz, Célia Regina Tremacoldi, Luciane Chedid Melo Borges, Vanessa Fuzinato Dall'Agnol*

Revisão Técnica: *Lilian Botelho Praça* – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia  
*Maurício Pereira de Sales* – UFRN

Supervisão editorial e revisão de texto: *Luciane Chedid M. Borges*  
Normalização bibliográfica: *Adelina Belém*  
Editoração eletrônica: *Orlando Cerdeira Bordallo Neto*  
Ilustração da capa: *estrutura de serino protease do Sesbania mosaic virus, adaptada de [http://en.wikipedia.org/wiki/Kunitz\\_STI\\_protease\\_inhibitor#Structure](http://en.wikipedia.org/wiki/Kunitz_STI_protease_inhibitor#Structure)*

**1ª edição**

Versão Eletrônica (2009)

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Embrapa Amazônia Oriental**

---

Tremacoldi, Célia Regina

Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas / Célia Regina Tremacoldi. – Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2009.

44p. : il. ; 21cm. (Documentos/ Embrapa Amazônia Oriental, ISSN 1983-0513; 353)

1. Doença de planta. 2. Controle biológico. 3. Microrganismo. 4. Fungo. 5. Praga. 6. Defesa vegetal. 7. Protease. 8. Inibidor de protease. 9. Fisiologia vegetal. I. Título. II. Série.

---

CDD : 632.96

© Embrapa 2009

# **Autores**

## **Célia Regina Tremacoldi**

Engenheira Agrônoma, Doutora em Fitopatologia,  
Pesquisadora da Embrapa Amazônia Oriental, Be-  
lém, PA.

tremacol@cpatu.embrapa.br



# Apresentação

O duelo bioquímico que ocorre durante a interação entre plantas e microrganismos pode desencadear o processo doença, quando o patógeno consegue vencer os mecanismos de resistência da planta e colonizar seus tecidos, ou demonstrar a resistência da planta, quando esta é capaz de driblar o ataque do agente fitopatogênico. Muitos são os compostos que podem participar desse duelo, entre eles os inibidores de proteases, que também atuam na resistência a insetos-pragas. Assim como enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos podem atuar na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras, facilitando a penetração e a infecção, os inibidores dessas enzimas podem ser produzidos pelas plantas, neutralizando sua ação durante a tentativa de infecção. É comum e amplamente distribuída a ocorrência de inibidores de proteases no reino vegetal, que são compostos protéicos ligados aos mecanismos de defesa contra microrganismos e insetos. A evolução dos estudos sobre proteases e seus inibidores, ao longo do tempo, conceitos, ocorrência e os possíveis papéis fisiológicos dessas proteínas, com ênfase nas interações plantas-microrganismos, serão abordados no presente trabalho.

*Claudio José Reis de Carvalho*

Chefe-Geral da Embrapa Amazônia Oriental



# Sumário

<b>Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Planta Contra Pragas</b> .....	9
<b>Introdução</b> .....	9
<b>Proteases</b> .....	9
<b>Classificação</b> .....	11
<b>Fontes de proteases</b> .....	13
Vegetais.....	13
Animais .....	14
Microbianas.....	14
<b>Funções fisiológicas das proteases</b> .....	15
<b>Atividade proteolítica em plantas</b> .....	18
<b>Atividade proteolítica em insetos</b> .....	19
<b>Inibidores de proteases</b> .....	20
Mecanismo de inibição .....	21

Classificação .....	22
Inibidores de proteases em plantas.....	22
Inibidores de proteases como fatores de proteção de plantas.....	24
Proteção contra insetos.....	28
<b>Considerações finais.....</b>	<b>31</b>
<b>Referências .....</b>	<b>33</b>

# Proteases e Inibidores de Proteases na Defesa de Planta Contra Pragas

---

*Célia Regina Tremacoldi*

## Introdução

Proteases e inibidores de proteases constituem-se em mais uma classe de proteínas participantes do duelo bioquímico entre plantas, microrganismos fitopatogênicos e insetos-pragas. As enzimas proteolíticas produzidas por microrganismos podem atuar na hidrólise de proteínas da membrana e da parede celular de plantas hospedeiras, facilitando a penetração e a infecção. Por outro lado, é comum e amplamente distribuída a ocorrência de inibidores para essas proteases no reino vegetal, representando um mecanismo de defesa. A evolução dos estudos sobre essas proteínas ao longo do tempo, conceitos, ocorrência e os possíveis papéis fisiológicos de proteases e seus inibidores, com ênfase nas interações plantas-microrganismos, serão abordados na presente publicação.

## Proteases

A clivagem proteolítica de peptídeos é uma das mais frequentes e importantes modificações de proteínas. Historicamente, a proteólise enzi-

mática foi associada com a digestão de proteínas e chamou a atenção de fisiologistas e bioquímicos, interessados neste processo fisiológico em animais, inclusive o homem. Assim, as proteases digestivas de secreções gástricas e pancreáticas são as enzimas mais bem caracterizadas, gerando o conhecimento atual sobre as estruturas e funções das enzimas proteolíticas em geral. Investigações da cinética, especificidade de inibição, associadas com análises detalhadas de suas estruturas por cristalografia de Raios X e de suas sequências de aminoácidos, levaram à identificação dos componentes e da geometria dos sítios ativos de proteases, permitindo a dedução de seus mecanismos de ação. Como resultado, tornou-se evidente que as proteases podem ser classificadas em famílias e que membros de uma mesma família apresentam estruturas e mecanismos de ação similares (NEURATH, 1990).

Na história mais recente das enzimas proteolíticas, a atenção voltou-se para aquelas proteases que desempenham algum papel em processos fisiológicos de interesse, por serem uma ferramenta importante na análise de sequência de proteínas, na identificação e no isolamento de domínios das enzimas multifuncionais mais complexas. No entanto, o isolamento de proteínas intactas nativas de tecidos biológicos requer a inativação seletiva das proteases por inibidores específicos. Com o advento da biologia molecular, uma nova dimensão foi dada ao estudo de proteases, utilizando clonagem e sequenciamento dos DNAs correspondentes. Essas informações têm contribuído significativamente para o entendimento da organização, função e evolução das mais complexas proteases regulatórias (RICHARDSON, 1991).

Importantes, também, no campo comercial, além do fisiológico, as proteases representam 60 % do total de enzimas produzidas pela indústria mundial, nas áreas de alimentação e de detergentes (GODFREY; WEST, 1996).

## Classificação

As proteases são classificadas como um subgrupo das hidrolases e sua nomenclatura é feita segundo o tipo de reação catalisada, a natureza química do sítio catalítico e de acordo com sua estrutura. Dessa maneira, subdividem-se em exopeptidases e endopeptidases, dependendo de seu sítio de ação, ou seja, clivando peptídeos terminais ou aqueles distantes dos terminais dos substratos, respectivamente. Sobre a terminologia, o termo protease é sinônimo de peptídeo hidrolase e inclui todas as enzimas que clivam peptídeos. O termo proteinase é sinônimo para o grupo das endopeptidases.

Quatro classes de enzimas proteolíticas são reconhecidas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as quais compreendem seis famílias (Tabela 1). Cada família possui um grupo característico de resíduos de aminoácidos funcionais, agrupados em uma configuração particular para formar o sítio ativo. Os membros de cada família provavelmente descendem de um ancestral comum no decorrer da evolução (NEURATH, 1986).

As serino proteases incluem duas famílias distintas: as serino proteases de mamíferos (quimotripsina, tripsina, elastase) e a protease bacteriana subtilisina. Diferem entre si na sequência de aminoácidos e na estrutura tridimensional, embora tenham um sítio ativo e um mecanismo enzimático em comum. Analogamente, as metalo proteases incluem duas famílias: as carboxipeptidases pancreáticas de mamíferos e a termolisina bacteriana, que diferem uma da outra na estrutura química, embora ambas tenham zinco em seu sítio ativo (KRAUT, 1977).

A família de protease mais bem caracterizada e mais fisiologicamente versátil é a das serino proteases, exemplificada pelas enzimas pancreáticas tripsina, quimotripsina, elastase e calicreína. A marca de seus

**Tabela 1.** Famílias de enzimas proteolíticas.

Família	Protease(s) representativa(s)	Sítios ativos
Serino proteases		
Serino protease I	Quimotripsina	
	Tripsina	Asp, Ser, His
	Elastase	
Serino protease II	Calicreína pancreática	
	Subtilisina	Asp, Ser, His
Cisteíno proteases		
Cisteíno protease	Papaína	
	Actinidina	Cis, His, Asp
	Catepsina	
Aspártico proteases		
Aspártico protease	Penicilopepsina	Asp
	Renina	
Metalo proteases		
Metalo protease I	Carboxipeptidase A	Zn, Glu, Try
Metalo protease II	Termolisina	Zn, Glu, His

Fonte: Adaptada de Neurath (1986).

sítios ativos é a tríade catalítica asparagina (Asp), histidina (His) e serina (Ser). A catálise ocorre via um estágio de transição intermediário durante os estágios de acilação e desacilação (KRAUT, 1977). A conformação global das serino proteases é praticamente a mesma: dois domínios compactos, simetricamente dispostos ao redor de dois eixos de simetria. Diferenças na especificidade do substrato podem estar relacionadas à substituição de aminoácidos no sítio primário do substrato, comumente denominado de P1, e a diferenças menores, no sítio secundário. Os genes que codificam para tripsina, quimotripsina e elastase diferem em número e distribuição de introns (CRAIK et al., 1982).

As cisteíno proteases incluem várias catepsinas de mamíferos, as proteases ativadas pelo cálcio citossólico (calpaínas) e a papaína e a actinidina de plantas, sendo as papaínas as mais estudadas dessa família (BODE; HUBER, 1992). O principal resíduo de aminoácido catalítico é a cisteína (Cys). A catálise ocorre via um éster thiol intermediário e é facilitada por cadeias adjacentes de histidina e ácido aspártico.

As proteases aspárticas incluem a penicilopepsina bacteriana (que serve como um modelo), a pepsina de mamíferos, a renina, a quimosina e certas proteases fúngicas. O resíduo ativo característico é o ácido aspártico (NEURATH, 1990).

As metalo proteases carboxipeptidases A e B são exopeptidases homólogas, de estrutura e sítio ativo similares. A carboxipeptidase A, como a tripsina, prefere o carbono aromático terminal e cadeias alifáticas de natureza hidrofóbica, enquanto a carboxipeptidase B atua diretamente sobre os resíduos básicos de arginina e lisina. A carboxipeptidase A é uma das mais investigadas quanto à cinética, métodos espectroscópicos e cristalográficos de análise (NEURATH, 1990). O sítio ativo inclui zinco, o qual é ligado a dois ácidos glutâmicos e a uma histidina. A termotilisina bacteriana é a única representante das metalo endopeptidases de estrutura e mecanismo de ação bem definidos. Seu sítio ativo é relacionado àquele das metalo carboxipeptidases.

## Fontes de proteases

### Vegetais

As proteases provenientes de plantas que despertam interesse são a papaína, extraída do látex de frutos de *Carica papaya*; a bromelina, pre-

sente no abacaxi, e a queratinase, produzida por alguns grupos botânicos (MORIHARA; ODA, 1993).

## Animais

A grande maioria das proteases de origem animal é produzida no aparelho digestivo, como a tripsina, a quimotripsina, a pepsina e a renina (GODFREY; WEST, 1996; WARD, 1983).

## Microbianas

As proteases provenientes de microrganismos são preferidas em relação àquelas de plantas e de animais, do ponto de vista científico e comercial, por ser fonte de rápido crescimento, requerer espaço limitado para cultivo, além de ser de fácil manipulação genética (WARD, 1983).

Dentre as bactérias, o gênero *Bacillus* é o mais estudado quanto à produção de proteases, especialmente a subtilisina de *B. subtilis*. Quanto aos vírus, estes expressam serino, cisteíno e proteases aspárticas, cuja importância funcional é o envolvimento no processamento de proteínas da cápsula viral, as quais podem estar relacionadas ao câncer e à Aids (RAWLINGS; BARRETT, 1993).

Os fungos são, de maneira geral, capazes de produzir a maior variedade de proteases entre os microrganismos. Entre os microrganismos fitopatogênicos, muitos produzem proteases extracelulares ativas que, em conjunto com outras enzimas como poligalacturonases, pectoliasas e xilanases, exercem um importante papel na patogênese (VALUEVA; MOSOLOV, 2004). A primeira protease extracelular obtida de um fitopatógeno, em sua forma pura, foi uma de 25 KDa, isolada de *Colletotrichum lindemuthianum*, em 1973 (RIES; ALBERSHEIM, 1973). Dentro das inúmeras proteases extracelulares produzidas por microrganismos fi-

topatogênicos, isoladas e caracterizadas nos últimos anos, prevalecem as serino proteases, mas também há enzimas pertencentes a outras classes. O primeiro grupo contém proteases produzidas por *Cochliobolus carbonum* (MURPHY; WALTON, 1996), *Verticillium dahliae* (BIDCHKA et al., 1999), *Stagonospora* (Septoria) *nodorum* (CARLILE et al., 2000) e *Phytophthora infestans* (GVOSDEVA et al., 2004). Subtilisinas são secretadas por *C. carbonum* (MURPHY; WALTON, 1996), *P. infestans* (GVOSDEVA et al., 2004), *Acremonium typhium* (GVOSDEVA et al., 2004), *Magnaporthe poae* (SREEDHAR et al., 1999), *Trichoderma harzianum* (DUNAEVSKY et al., 2000) e *Fusarium oxysporum* (DI PIETRO et al., 2001). As arpartato proteases são amplamente distribuídas entre os fitopatógenos, como as produzidas por *Botrytis cinerea* (MOVAHEDI; HEALE, 1990), *Cryphonectria parasitica* (CHOI et al., 1993) e *Glomerella cingulata* (CLARK et al., 1997). Uma cisteíno protease é secretada pelo fungo *Pyrenopeziza brassicae* (BALL et al., 1991). As metaloproteases incluem uma família de enzimas bacterianas zinco-dependentes pertencentes ao gênero *Erwinia*. Uma dessas proteases, extraída de *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, é similar em suas propriedades à termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus* (GHIGO; WANDERSMAN, 1992; KYOSTIO et al., 1991; ZHANG et al., 1999).

## Funções fisiológicas das proteases

As enzimas proteolíticas executam uma grande variedade de funções fisiológicas complexas. Sua importância em conduzir as funções metabólicas e regulatórias essenciais é evidente, o que pode ser confirmado pela sua ocorrência em todas as formas de organismos vivos. Assim, podem exercer papel-chave em processos como o catabolismo de proteínas, a coagulação sanguínea, o crescimento e a migração celulares, a formação de tecidos, a morfogênese em desenvolvimento, inflamações e crescimento de tumores, a ativação de zimogênios, a liberação de hormônios

e de peptídeos farmacologicamente ativos de proteínas precursoras e, também, o transporte de proteínas através das membranas. Em geral, proteases extracelulares catalisam a hidrólise de grandes proteínas a moléculas menores para a subsequente absorção pela célula, enquanto as proteases intracelulares desempenham um importante papel na regulação do metabolismo. Porém, em contraste à multiplicidade de funções exercidas pelas proteases, o conhecimento sobre os mecanismos pelos quais elas executam todas as atividades ainda é limitado. Os processos fisiológicos que mais requerem a participação de proteases são renovação de proteínas, esporulação e germinação de esporos, modificação enzimática, nutrição e regulação da expressão gênica (RAO et al., 1998).

Todas as células vivas mantêm uma renovação de proteínas pela contínua e balanceada degradação e síntese protéica. O catabolismo protéico gera um suprimento de aminoácidos necessários à síntese de outras proteínas. A síntese de novo de proteínas intracelulares em eucariotos é afetada por uma via envolvendo proteases ATP-dependentes, o que foi comprovado pela utilização de mutantes protease-deficientes (HERSHKO et al., 1984).

A formação de esporos em bactérias (KORNBERG et al., 1968), ascósporos em leveduras (ESPOSITO; KLAPHOLZ, 1981), corpos de frutificação em alguns fungos (NORTH, 1982) e a liberação de conídios (PHADATARE et al., 1989) são processos que envolvem intensa renovação de proteína celular. O requerimento de uma protease para esporulação pode ser demonstrado pelo uso de inibidores de proteases. A formação de ascósporos em leveduras diplóides está relacionada a um aumento da atividade proteolítica. Uma extensiva degradação de proteínas acompanha o processo de formação de um corpo de frutificação e sua diferenciação a talo, em fungos.

Esporos dormentes carecem dos aminoácidos requeridos para germinação, os quais lhe são providos pela degradação de algumas de suas

proteínas por serino endoproteinasas, permitindo a biossíntese de novas proteínas e nucleotídeos. Essas proteases são específicas apenas para proteínas armazenadas e não afetam outras proteínas presentes nos esporos. Assim, podem perder a atividade rapidamente após a germinação dos mesmos (POSTEMSKY et al., 1978). A germinação microconidial e a fusão de hifas também envolvem a participação de uma serino protease específica e proteases ácidas estão envolvidas na quebra de polipeptídeos da parede celular durante a germinação de esporos de *Dictyostelium discoideum* (JACKSON; COTTER, 1984) e de microcistos de *Polysphondylium pallidum* (O'DAY, 1976).

A hidrólise de polipeptídeos, convertendo-os a pequenos peptídeos e aminoácidos, facilitando sua absorção pelas células, é assistida por proteases. As microbianas e extracelulares de mamíferos, como as secretadas pelo pâncreas, estão envolvidas primariamente na manutenção de células vivas por prover-lhes dos aminoácidos necessários à sobrevivência (NEURATH, 1990).

A modulação da expressão gênica mediada por protease é conhecida. A proteólise de um repressor por uma protease resultou na reexpressão de um gene que estava reprimido. Uma alteração na especificidade transcricional de uma subunidade de RNA polimerase de *Bacillus thuringiensis* foi correlacionada com uma modificação em sua atividade proteolítica e a modificação de proteínas ribossômicas por proteases foi sugerida como responsável pela regulação da tradução (VAN MELDEREN et al., 1996).

O grande número de proteases extracelulares de fungos revela que, aparentemente, essas enzimas desempenham um papel ativo no processo de patogênese (BALL et al., 1991; MOVAHEDI; HEALE, 1990; PARIS; LAMATTINA, 1999). Sabe-se que mutantes não patogênicos de *Phytophthora brassicae* (um patógeno da família Cruciferae) não são capazes de produzir cisteíno proteases e que a recuperação da patogênese nesses

mutantes foi acompanhada de sua recuperação em secretar as proteases (BALL et al., 1991). Outro importante papel na progressão da doença é exercido pela protease aspártica do fungo *B. cinerea*, que secretou proteases logo nos estágios iniciais do processo de infecção (antes da liberação de enzimas pectolíticas), ocorrendo a subsequente morte das células das plantas. O desenvolvimento da infecção foi significativamente retardado pelo tratamento inicial dos esporos do fungo com pepstatina, um inibidor de protease aspártica. No entanto, a pepstatina não afetou a germinação de esporos (MOVAHEDI; HEALE, 1990). Uma amostra livre de células, obtida de suspensão de esporos e cistos em germinação de *P. infestans*, causou necrose no tecido vegetal quando injetada em folhas de batata. Uma correlação entre o nível de atividade proteolítica na amostra e sua ação necrótica foi observada (PARIS; LAMATTINA, 1999).

Contrariamente aos exemplos apresentados anteriormente, há casos em que a dependência entre a atividade de proteases extracelulares e a patogenicidade de microrganismos não foi observada. Um exemplo é que mutantes de *C. carbonum* deficientes em tripsina não apresentaram redução na patogenicidade em gramíneas (MURPHY; WALTON, 1996). Também a inativação direta de uma subtilisina de *F. oxysporum* não afetou sua patogenicidade em tomates (DI PIETRO et al., 2001). Estes e outros dados semelhantes sugerem que, em certos casos, o papel das proteases extracelulares está limitado a prover microrganismos fitopatogênicos com aminoácidos essenciais para seu desenvolvimento (GATEHOUSE et al., 2000).

## Atividade proteolítica em plantas

O primeiro relato da atividade proteolítica em plantas data de 1799, mas, muito provavelmente, ela já se fazia conhecida há mais tempo pelos habitantes de ilhas tropicais que utilizavam o látex e folhas de plantas de papaya como amaciante de carnes e como vermífugo (McKEE,

1962). Um grande número de proteases já foi isolada de frutos e látex de várias plantas, mas apenas recentemente tem sido estudado seu papel em processos celulares do metabolismo vegetal, incluindo a papaína, bromelina, ficina e quimopapaína. O evento mais extensivamente estudado é a germinação de sementes, em que a atividade proteolítica está associada ao crescimento e desenvolvimento de plântulas, bem como à renovação de proteínas e à senescência. Também em folhas, flores e frutos de várias espécies vegetais, há atividade de proteases de diferentes classes (RICHARDSON, 1991).

## **Atividade proteolítica em insetos**

Proteases digestivas catalisam a liberação de peptídeos e aminoácidos de proteínas e são mais abundantemente encontradas no intestino médio do trato digestivo de insetos. Por muito tempo foi aceito que, assim como vertebrados, os insetos continham apenas serino proteases, como tripsina e quimotripsina, e proteases aspárticas, como a pepsina (McFARLANE, 1985). A maior parte das primeiras pesquisas foi sobre Lepidoptera e Diptera, ordens que geralmente usam serino proteases para digerir proteínas. Essas ordens apresentam o trato digestivo alcalino que, dependendo das espécies, proporcionam um pH ótimo entre 8 e 11,5 para a atividade dessa classe de protease. Mais recentemente, estudos têm mostrado que várias outras classes de proteases também são encontradas em intestinos de insetos (CHRISTELLER et al., 1992; WOLFSON; MURDOCK, 1990b). Há a hipótese de que a presença de cisteíno proteases pode ter sido uma adaptação evolucionária que permitiu aos insetos alimentarem-se de sementes de leguminosas e de outros tecidos de plantas que são naturalmente ricos em inibidores de serino proteases (RYAN, 1990).

## Inibidores de proteases

O entendimento da atividade proteolítica nos processos biológicos tem como pré-requisito o conhecimento da contribuição dos inibidores naturais de proteases para a regulação de sua atividade e o uso de inibidores sintéticos na caracterização dessa atividade.

Os inibidores de proteases existem sob diferentes formas e são frequentemente agrupados com base em seus mecanismos de reação, origem ou similaridades estruturais. Quanto à especificidade, três grupos podem ser reconhecidos: aqueles que reagem com mais de uma classe de proteases, aqueles que são específicos para uma das classes e os inibidores que apresentam alta especificidade para uma única protease (PERONA; CRAIK, 1995).

Qualquer composto que diminua a razão de hidrólise de um dado substrato é, em princípio, um inibidor enzimático. Proteínas capazes de formar complexos com enzimas proteolíticas, promovendo a inibição da atividade dessas proteases, podem ser denominadas de inibidores de proteases e encontrar-se em plantas, microrganismos e animais. São moléculas cuja massa molecular varia de 10 KDa a 90 KDa, na maioria dos casos (NEURATH, 1990).

De acordo com o modo de ação, os inibidores podem ser enquadrados em dois grupos: inibidores sítio-específicos, que modificam irreversivelmente um aminoácido do sítio ativo, e aqueles que ocorrem naturalmente, os quais podem atuar como pseudosubstratos. Tanto os inibidores sintéticos quanto os naturais imitam o substrato, competindo com o mesmo na ligação com o sítio ativo das proteases (TRAVIS; SALVESEN, 1983).

Membros do primeiro grupo são os inibidores de serino proteases, como o diisopropil fosfofluoridato e o fenilmetanosulfonil fluoreto, que reagem com o resíduo de serina do sítio ativo, e clorometilcetona derivada de aminoácidos e peptídeos que reagem com a histidina da tríade catalítica. As aspártico proteases são inativadas por compostos diazoacetil, assim como por pepstatina. As metalo proteases são, geralmente, inibidas por agentes quelantes metálicos. As carboxipeptidases A e B são especificamente inibidas por um inibidor protéico específico isolado de batata e a termolisina é inibida por fosforamida (BISHOP et al., 1981).

Inibidores protéicos de proteases de ocorrência natural são isolados de animais, plantas e bactérias. Vários inibidores de proteases isolados do pâncreas, ovos de aves e de certas leguminosas têm servido como modelos para elucidar os mecanismos de inibição de protease. Eles combinam-se de forma irreversível com o sítio ativo e são convertidos em uma forma modificada na qual um peptídeo é clivado, o qual corresponde ao substrato de especificidade primária do substrato da protease (BODE; HUBER, 1992).

## Mecanismo de inibição

O mecanismo geral da interação enzima-inibidor pode ser escrito como:



em que: E é a enzima; I e I\* são inibidores original e modificado, respectivamente; L e L\* são perdas, complexos não covalentes (rapidamente dissociáveis) de E com I e I\*; X é a fase intermediária de E + I\* e C é o complexo estável enzima-inibidor. Mais intermediários, na prática, podem ser encontrados nesse mecanismo, o qual pode ser estudado por exame cristalográfico por Raios X e por espectrometria de massa dos complexos formados. Todos os casos de inibição de proteases

estudados mostraram que o sítio reativo do inibidor reage com o sítio ativo da enzima, de maneira semelhante. O contato ocorre sobre uma pequena porção da enzima e do inibidor, com um ajuste excelente, por meio da formação de numerosas interações van der Waals, de ligações de hidrogênio e ligações salinas, o que leva a uma pequena alteração conformacional (LASKOWSKY; KATO, 1980). A constante de equilíbrio para a associação é geralmente alta (de 107 a 1013 M<sup>-1</sup>).

Inibidores irreversíveis (como o inibidor a1-proteinase) formam ligações covalentes com a enzima, que, geralmente, permanecem quando a enzima é denaturada. Os inibidores que apresentam reversibilidade (aprotinina, ovomucoides, leupeptina) caracterizam-se pelo equilíbrio entre o complexo enzima-inibidor formado e as enzimas livres (TRAVIS; SALVESEN, 1983).

## **Classificação**

Os inibidores de proteases são denominados de acordo com a protease inibida e/ou sua fonte, como, por exemplo, o inibidor de tripsina de soja. Agrupam-se, também, em famílias, as quais podem receber o nome do pesquisador que primeiro as identificou. As famílias mais citadas são de Kunitz (inibidor de tripsina pancreático e inibidor de tripsina de soja), a Kazal (inibidor de tripsina de secreção pancreática), a de inibidores Bowman-Birk, a família de inibidor de batata I e a do inibidor de batata II (LASKOWSKI; KATO, 1980).

## **Inibidores de proteases em plantas**

Em plantas, o primeiro relato de inibidor de protease ocorreu em 1938, por Read e Haas, e os primeiros trabalhos estavam relacionados à nutrição animal. Os efeitos deletérios dessa categoria de proteínas encontradas em muitas plantas utilizadas na dieta de animais para abate, as

tornaram inicialmente conhecidas como fatores antinutricionais (HAM; SANDSTEDT, 1945; KLOSE et al., 1946; WESTFALL; HAUGE, 1948). Os inibidores de tripsina concentram o maior número de pesquisas no assunto, por ela ser uma importante serino protease do trato digestivo de animais. Até hoje, as famílias Solanaceae, Leguminosae e Graminae são as mais estudadas quanto à atividade de inibidores, por serem importantes fontes de alimentos (MOSOLOV; VALUEVA, 2008).

O primeiro inibidor de plantas bem caracterizado foi o de tripsina em soja (KUNITZ, 1947), que foi isolado, cristalizado e complexado com tripsina de porco, servindo como o primeiro modelo clássico metodológico para a bioquímica de inibidores de proteases. Atualmente, é conhecida a sequência completa de aminoácidos da maioria dos inibidores já identificados.

É generalizada sua presença em órgãos de reserva de plantas, como sementes e tubérculos, onde podem atuar como agentes regulatórios de proteases endógenas, como proteínas de reserva e como mecanismo de proteção direto contra proteases de insetos e/ou de microrganismos patogênicos. São encontrados em paredes celulares, espaços intercelulares, no citossol e no vacúolo (KAPUR et al., 1989).

Quando se fala em inibidores de proteases, uma consideração importante a ser feita é sobre as lectinas. Lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos, encontradas em muitos tecidos de plantas e são abundantes em sementes e órgãos de reserva de algumas espécies, assim como os inibidores (JOUANIN et al., 1998). Ao se analisar a atividade de inibidores protéicos, é necessário excluir a ação das lectinas, as quais podem mascarar a resposta desejada. Como, geralmente, são proteínas menos resistentes ao calor que os inibidores de proteases, que podem resistir a 90 °C – 100 °C, podem ser inativadas por tratamento térmico dos extratos protéicos, antes da dosagem da atividade para inibidores (RYAN, 1988).

## Inibidores de proteases como fatores de proteção de plantas

As plantas coevoluíram com microrganismos, insetos, nematóides, aves e mamíferos há centenas de anos e, como consequência, desenvolveram mecanismos de defesa. A habilidade desses microrganismos ou herbívoros em adaptar-se aos mecanismos de defesa das plantas é que os caracteriza como patógenos ou predadores, respectivamente. Um desses mecanismos de defesa envolve a produção de inibidores de proteases, os quais podem ser encontrados constitutivamente e, ainda, ser induzidos em resposta ao ataque de um patógeno ou de herbívoros (HICKS et al., 1997; VALUEVA; MOSOLOV, 2004).

Inibidores de proteases em plantas podem ser capazes de suprimir a atividade enzimática de microrganismos fitopatogênicos. Um possível papel de proteases, durante a invasão de um patógeno num tecido vegetal, seria facilitar sua penetração, provavelmente pela hidrólise de proteínas dentro e entre paredes celulares (SIKES; MAXCY, 1979; VALUEVA; MOSOLOV, 1994).

Até 1976, apenas um inibidor altamente específico para uma protease microbiana havia sido bem isolado de plantas, o inibidor de subtilisina, em cevada (YOSHIKAWA et al., 1976). No mesmo ano, observou-se que inibidores de tripsina e quimotripsina presentes em sementes de soja e feijão e também em batata foram capazes de suprimir a atividade de proteases secretadas por *F. solani* (MOSOLOV et al., 1976) e, ainda, que inibidores da família Bowman-Birk presentes em feijão suprimiram o crescimento de hifas e a germinação de conídios de *F. solani*, *F. culmorum* e *B. cinerea* (MOSOLOV et al., 1976). Resultados similares foram posteriormente obtidos sobre a ação de outros inibidores de proteases de plantas sobre enzimas extracelulares, crescimento e desenvolvimento de microrganismos fitopatogênicos. Um inibidor de tripsina em

sementes de milho bloqueou o crescimento de hifas e a germinação de conídios de vários fungos fitopatogênicos, entre eles *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *F. moniliforme* (CHEN et al., 1999). No caso de podridão de frutos de tomate por *Botrytis cinerea*, proteínas extraídas da parede celular desses frutos inibiram 70 % da atividade de tripsina extracelular do patógeno. Essas mesmas proteínas, quando testadas em relação à tripsina de *Colletotrichum atramentarium*, não apresentaram atividade inibitória (BROWN; ADIKARAM, 1983). O inibidor de tripsina em sementes de trigo sarraceno suprimiu a atividade proteolítica de *Alternaria alternata* e também inibiu o crescimento micelial e a germinação de esporos de *A. alternata* e *F. oxysporum* (DUNAEVSKY et al., 1994). Um inibidor de quimotripsina presente em batata suprimiu o crescimento de *P. infestans* (VALUEVA et al., 1998, 2003).

Não apenas inibidores de serino proteases presentes em plantas são capazes de suprimir atividade enzimática de microrganismos fitopatogênicos. Uma proteína com massa molecular de 10 KDa foi extraída da exsudação do floema de frutos de *Cucurbita maxima* L. e atuou como inibidor de protease aspártica do fungo *Glomerella cingulata* (CHRISTELLER et al., 1998).

Aparentemente, os inibidores de cisteíno proteases podem exercer um papel vital nas interações entre plantas e vírus. A explicação é que essas proteases desempenham um papel ativo no processamento de proteínas em várias viroses (GORBALENYA; SNIJDER, 1996). Experimentos iniciais revelaram que os inibidores vegetais orizacistatinas I e II foram hábeis em suprimir a replicação de viroses animais pertencentes à família dos picornavirus (KONDO et al., 1992). Mais tarde, plantas transgênicas de tabaco contendo orizacistatinas I e II foram obtidas e exibiram aumento da resistência ao potato Y virus, que é um potyvirus e usa cisteíno proteases para o processamento de proteínas (GUTIERREZ-CAMPOS et al., 1999).

Outros exemplos do envolvimento de inibidores de proteases em interações plantas–microrganismos podem ser citados. Uma preparação elicitora, obtida de *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, um patógeno de fumo, induziu um acúmulo de inibidor de protease e um estímulo da síntese de etileno em suspensão de células da planta. Apenas 30 mg/ml do elicitor foram necessários para a indução e a resposta foi detectada após 12 horas da incubação com o mesmo (RICKAUER et al., 1989).

A associação da indução de protease e quitinase e de inibidor de protease à resistência a um patógeno foi observada no sistema grão-de-bico e *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Os níveis dessas proteínas foram analisados em uma cultivar resistente e uma susceptível ao patógeno, cultivadas em solo infestado. A atividade de quitinase induzida em raízes da cultivar susceptível foi equivalente àquela constitutiva da cultivar resistente. A atividade de protease foi identificada apenas em raízes da cultivar resistente, quando em presença do patógeno, enquanto a atividade de inibidores de proteases não se verificou em caso algum (GIRI et al., 1998).

Um estudo realizado comparando o ataque de inseto à injúria e à infecção por vírus com a atividade de inibidor de tripsina em plantas maduras de fumo e de tomate é encontrado na literatura. Após 12 dias da aplicação dos três tipos de estresse sobre essas plantas, os níveis induzidos de inibidores de tripsina induzida, localizada e sistemicamente, foram avaliados. Em folhas de fumo que sofreram ferimentos por corte ou por ataque de insetos, as atividades induzidas de inibidor de tripsina foram equivalentes, enquanto naquelas folhas em que houve a infecção pelo vírus do mosaico do fumo (TMV), a indução de inibidor foi dez vezes menor que nos casos anteriores. Em tomate, o nível de inibidor de tripsina em folhas atacadas por insetos foi igual ao das folhas de fumo, para o mesmo caso, mas folhas apenas injuriadas por corte apresentaram níveis dez vezes maiores do inibidor. Esses dados mostraram que o estresse biótico, na forma de injúria por insetos ou infecção por vírus, e o estresse abiótico,

como o fermento por corte, podem agir de diferentes maneiras sobre os níveis de inibidores de proteases induzidos (JONGSMA et al., 1994).

Uma espécie de *Streptomyces*, que produz um inibidor de protease alcalino, exibiu atividade antifúngica in vitro contra fungos fitopatogênicos como *Fusarium*, *Alternaria* e *Rhizoctonia* e, também, contra *Trichoderma*, um saprófita. A atividade antifúngica do inibidor pareceu estar associada com sua habilidade em inibir serino proteases alcalinas dos fungos, que são indispensáveis para seu crescimento. O atraso na germinação de esporos, assim como do crescimento de hifas, foi observado na presença do inibidor. Os autores indicaram, então, o inibidor de protease alcalino como um potencial agente de biocontrole contra fungos fitopatogênicos (VERNEKAR et al., 1999).

Por sua vez, uma cistatina purificada de castanha (*Castanea sativa* L.) inibiu o crescimento dos fungos fitopatogênicos *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum graminicola* e *Septoria nodorum*, mas não o do saprófita *Trichoderma viride*. Essa mesma cistatina inibiu a atividade proteolítica de *B. cinerea*, mas não interferiu na atividade de protease de *T. viride*. Esses resultados sugerem que a cistatina, um inibidor de protease da planta, contribui para a defesa contra fitopatógenos (PERNAS et al., 1999).

O estudo de algumas espécies de leguminosas e de cereais revelou a presença de inibidores endógenos específicos para proteases dos fitopatógenos *Colletotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Helminthosporium* sp. e *Botrytis cinerea*. As atividades de inibidores de tripsina, quimotripsina e subtilisina variaram entre monocotiledôneas e dicotiledôneas. Inibidores de proteases de sementes de trigo inibiram a atividade de fitopatógenos fúngicos, suprimindo germinação de esporos e crescimento micelial (DUNAEVSKII et al., 2005).

Pesquisas em biotecnologia resultaram na criação de plantas transgênicas com aumento de resistência a condições desfavoráveis e ao ataque de fungos e vírus, o que permite, também, em alguns casos, aumentar a produtividade e diminuir a poluição ambiental pela diminuição do uso de agrotóxicos (ESTRUCH et al., 1997; MOURGUES et al., 1998). O que se tem disponível são, principalmente, plantas transgênicas contendo genes de endotoxinas da bactéria *Bacillus thuringiensis* (Bt) e exibindo um aumento de resistência contra insetos (DE MAAGD et al., 1999). Atualmente, os genes de mais de 14 proteínas, inibidores de proteases, são expressos em várias plantas cultivadas. A maioria das plantas transgênicas contendo genes para inibidores de proteases é caracterizada pelo aumento da resistência a insetos e algumas outras pragas. Ao mesmo tempo, esse tipo de planta apresenta uma menor estabilidade que aquelas contendo genes para a toxina Bt (GATEHOUSE et al., 2000; SCHULER et al., 1998).

## Proteção contra insetos

Lipke et al. (1954) iniciaram o estudo da toxicidade de inibidores de soja sobre o completo desenvolvimento de *Tribolium confusum*, uma praga comum de grãos armazenados. Embora os resultados tenham sido negativos para tripsina, uma protease abundante no trato digestivo de insetos, eles revelaram a presença de um inibidor específico da proteólise digestiva de larvas de *Tribolium*, o qual também foi encontrado em aveia.

Applebaum (1964) propôs que leguminosas apresentavam inibidores de proteases como um mecanismo de defesa contra insetos e que a digestão destes poderia ser considerada como um fator na seleção do hospedeiro. Isto em virtude dos vários dados existentes na literatura de que as proteases digestivas de muitos gêneros de insetos eram similares às tripsina e quimotripsina animais e também eram inibidas por inibidores de proteases de plantas. Desse ponto de vista, inibidores de proteases

seriam de grande valor para os tecidos vegetais, os quais representam de 6 % a 10 % das proteínas solúveis de muitos órgãos de reserva ou, ainda, 1 % em folhas de batata e de tomate (KAFATOS et al., 1967).

Folhas normalmente contêm níveis muito baixos de inibidores de proteases, mas Green e Ryan (1972) observaram que estes foram fortemente induzidos a altos níveis em folhas de batata e de tomate, quando essas plantas eram atacadas por besouros ou mecanicamente injuriadas. Em solanáceas jovens, o acúmulo de inibidores de serino proteases inicia-se após 4 a 5 horas de um único ferimento e pode ser significativamente aumentado por um segundo ferimento, 15 e 72 horas após o primeiro (NELSON et al., 1983; PEÑA-CORTÉS et al., 1988). Em adição à síntese local dos inibidores, encontrou-se, também, que sinais partindo do sítio da injúria foram transportados pelo floema e estimularam a síntese de inibidores de proteases por toda a planta. Alguns diferentes mensageiros foram postulados, incluindo oligossacarídeos (HAHN et al., 1993), ácido abscísico (PEÑA-CORTÉS et al., 1989) e uma sistemina (PEARCE et al., 1991).

O acúmulo sistêmico de inibidores pode diminuir de acordo com a idade das plantas e não ocorrer naquelas com mais de 30 dias de idade, no caso de tomateiro, sugerindo que esse envolvimento de inibidores de proteases na defesa vegetal seria restrito a um curto período de tempo, associado aos estágios iniciais de desenvolvimento (WOLFSON; MURDOCK, 1990a). Por outro lado, ferimentos e ataques de insetos em plantas maduras resultaram em um rápido aumento nos níveis de inibidores de tripsina em folhas, indicando que inibidores de proteases podem ser induzidos localmente por injúria por toda a vida da planta, mas que a habilidade para produzi-los sistemicamente, em todas as folhas, é aparentemente perdida com a maturação (ALARCON; MALONE, 1995; JONGSMA et al., 1994).

A coevolução de inibidores de proteases de plantas e proteases de insetos é um interessante paradigma para pesquisas ecológicas, fisioló-

gicas e bioquímicas. Plantas parecem ter desenvolvido inibidores com extraordinárias propriedades contra proteases de insetos. São extremamente resistentes à proteólise e permanecem ativos sob diversas condições de pH, podendo inibir a maioria das classes de proteases conhecidas (CHRISTELLER et al., 1994). No entanto, é necessário lembrar que a maioria das pragas tem encontrado, ao longo do tempo, diversas maneiras de tentar reverter os efeitos negativos dos inibidores vegetais. Essas maneiras incluem a produção de proteases para as quais a planta hospedeira não tenha inibidor específico, a degradação proteolítica de inibidores e mutações adquiridas que levam a proteases menos sensíveis ao inibidor, sem que haja perda de sua atividade proteolítica (MOSOLOV; VALUEVA, 2008).

Há um interesse crescente da pesquisa em expressar genes para inibidores de proteases em plantas transgênicas. O sucesso é significativo quando combinações de inibidores conseguem cobrir todo o espectro de proteases do inseto e a engenharia genética tem tornado a utilização desses genes uma opção realística em programas para a obtenção de plantas resistentes a pragas. No entanto, os inibidores podem perder sua eficiência em decorrência da habilidade do trato digestivo dos insetos de se adaptar rapidamente a eles. A adaptação pode se manifestar pela superexpressão de proteases (ou expressão de novas ou resistentes formas de enzimas) em resposta à presença dos inibidores no trato digestivo dos insetos (DE LEO et al., 2001; JONGSMA et al., 1994; OPPERT et al., 2005). A adaptação pode ser driblada pelo uso de inibidores de proteases isolados de plantas diferentes daquelas hospedeiras naturais do inseto (BROADWAY, 1996; HARSULKAR et al., 1999).

Há que se considerar, ainda, que o efeito de um inibidor está limitado a enzimas de um particular tipo catalítico (BODE; HUBER, 1992). Não há um inibidor capaz de suprimir completamente a atividade proteolítica do trato de um inseto, pois as proteases pertencem a diversos tipos

catalíticos (MICHAUD, 1997). É por essa razão que plantas transgênicas expressando genes de inibidores de serino proteases são, preferencialmente, protegidas contra insetos da ordem Lepidoptera (GATEHOUSE, 2000). As serino proteases são predominantes no intestino desses insetos, representando em torno de 95 % da atividade proteolítica total (SRINIVASAN et al., 2006). O observado na ordem Coleoptera é bem diferente, pois, em adição às cisteíno proteases com propriedades similares às catepsinas H, L e B de mamíferos, o trato de larvas de abelhas Colorado contém uma protease aspártica semelhante à catepsina e uma serino protease quimotripsina (BRUNELLE et al., 1999). Assim, as pesquisas devem estar atentas para construir formas híbridas de inibidores, capazes de agir sobre proteases pertencentes a diversos tipos catalíticos. A primeira proteína construída com esse propósito foi a partir de uma molécula multicistatina (SMC) de soja, que consiste de três domínios ativos (KOUZUMA et al., 2000). Duas formas da proteína híbrida foram obtidas: na SMC-T3, o domínio 3 foi trocado por um inibidor de serino protease de melão (*Momordica charantia* L.) e, em SMC-T23, os domínios 2 e 3 foram trocados (INANAGA et al., 2001). As duas formas atuam como inibidores de tripsina e papaína, suprimindo o desenvolvimento de larvas de *Spodoptera exigua*.

## Considerações finais

Grandes são as perdas da produção agrícola mundial em decorrência de doenças, insetos-pragas e plantas daninhas. Os métodos atuais de proteção e controle de pragas de culturas agrícolas, normalmente, recorrem ao uso de agroquímicos e torna-se necessário desenvolver uma agricultura mais voltada à preservação ambiental, com um decréscimo no acúmulo de resíduos químicos.

As novas tecnologias da engenharia genética de plantas oferecem a possibilidade de se introduzir genes de resistência de espécies nativas em plantas cultivadas, tornando-as resistentes ou tolerantes a insetos ou microrganismos patogênicos. Outra estratégia seria a utilização de genes derivados de plantas, como aqueles codificando para inibidores de proteases, uma vez que se tem comprovado a correlação dessas proteínas com a resistência. Essas alternativas, porém, aumentam a necessidade de estudos relativos à utilização de plantas transgênicas, principalmente as comestíveis, com segurança para o homem e o ambiente, antes de se tornarem viáveis.

## Referências

ALARCON, J. J.; MALONE, M. The influence of plant age on wound induction of proteinase inhibitors in tomato. **Physiologia Plantarum**, v. 95, n. 3, p. 423-427, Mar. 1995.

ALBERSHEIM, P.; VALENT, B. S. Host-pathogen interactions. VII. Plant pathogens secrete proteins which inhibit enzymes of the host capable of attacking the pathogen. **Plant Physiology**, v. 53, p. 684-687, 1974.

APPLEBAUM, S. W.; BIRK, Y.; HARPAZ, I.; BONDI, A. Comparative studies on proteolytic enzymes of *Tenebrio molitor* L. **Compendium of Biochemistry and Physiology**, v. 11, n. 1, p. 85-103, 1964.

BALL, A. M.; ASHBY, A. M.; DANIELS, M. J.; INGRAM, D. S.; JOHNSTONE, K. Evidence for the requirement of extracellular protease in the pathogenic interaction of *Pyrenopeziza brassicae* with oilseed rape. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 38, n. 2, p. 147-161, Feb. 1991.

BIDOCHKA, M. J.; LEDER, R. J.; STUART, A.; GOWANLOCK, K. Nuclear rDNA phylogeny in the fungal genus *Verticillium* and its relationship to insect and plant virulence, extracellular proteases and carbohydrases. **Microbiology**, v. 145, p. 955-963, 1999.

BISHOP, P.; MARKUS, D. J.; PEARCE, G.; RYAN, C. A. Proteinase inhibitor-inducing factor activity in tomato leaves resides in oligosaccharides enzymically released from cell-walls. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 78, n. 6, p. 3536-3540, Jun. 1981.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interactions with proteinases. **European Journal of Biochemistry**, v. 204, n. 2, p. 433-451, 1992.

BROADWAY, R. M. Dietary proteinase inhibitors alter complement of midgut proteases. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 32, n. 1, p. 39-53, 1996.

BROWN, A. E.; ADIKARAM, N. K. B. A role for pectinase and protease inhibitors in fungal rot development in tomato fruits. **Phytopath Z**, v. 106, n. 3, p. 239-251, 1983.

BRUNELLE, F.; NGUYEN-QUOC, B.; CLOUTIER, C.; MICHAUD, D. Protein hydrolysis by Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, digestive proteases: The catalytic role of cathepsin D. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 42, n. 1, p. 88-98, 1999.

CARLILE, A. J.; BINDSCHEDLER, L. V.; BAILEY, A. M.; BOWYER, P.; CLARKSON, J. M.; COOPER, R. M. Characterization of SNP1, a cell wall-degrading trypsin, produced during infection by *Stagonospora nodorum*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 13, n. 5, p. 538-550, May, 2000.

CHEN, Z. Y.; BROWN, R. L.; LAX, A. R.; CLEVELAND, T. E.; RUSSIN, J. S. Inhibition of plant-pathogenic fungi by a corn trypsin inhibitor overexpressed in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1320-1324, Mar. 1999.

CHOI, G. H.; PAWLYK, D. M.; RAE, B.; SHAPIRA, R.; NUSS, D. L. Molecular analysis and overexpression of the gene encoding endothiapepsin, an aspartic protease from *Cryphonectria-parasitica*. **Gene**, v. 125, n. 2, p.135-141, 1993.

CHRISTELLER, J. T.; GATEHOUSE, A. M. R.; LAING, W. A. The interaction of the elastase inhibitor, eglin C, with insect digestive endopeptidases: effect of pH on the dissociation constants. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 24, n. 1, p. 103-109, Jan. 1994.

CHRISTELLER, J. T.; LAING, W. A.; MARKWICK, N. P.; BURGESS, E.P. Midgut protease activities in 12 phytophagous lepidopteran larvae: dietary and protease inhibitor interactions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, p. 735-746, Oct. 1992.

CHRISTELLER, J. T.; FARLEY, P. C.; RAMSAY, R. J.; SULLIVAN, P. A.; LAING, W. A. Purification, characterization and cloning of an aspartic proteinase inhibitor from squash phloem exudate. **European Journal of Biochemistry**, v. 254, n. 1, p. 160-167, 1998.

CLARK, S. J.; TEMPLETON, M. D.; SULLIVAN, P. A. A secreted aspartic proteinase from *Glomerella cingulata*: Purification of the enzyme and molecular cloning of the cDNA. **Microbiology**, v. 143, p. 1395-1403, 1997.

COOPER, R. M. The mechanisms and significance of enzymic degradation of host cell walls by parasites. In: CALLOW, J. A. (Ed.). **Biochemical plant pathology**. New York: Wiley, 1983. p. 101-135.

CRAIK, C. S.; SPRANG, S.; FLETTERICK, R.; RUTTER, W. Intron-exon splice junctions map at protein surfaces. **Nature**, v. 299, n. 5879, p. 180-182, 1982.

DE LEO, F.; BONADÉ-BOTTINO, M.; CECI, L. R.; GALLERANI, R.; JOUANIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 31, n. 6-7, p. 593-602, Apr. 2001.

DE MAAGD, R. A.; BOSH, D.; STIEKEMA, W. *Bacillus thuringiensis* toxin-mediated insect resistance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 4, n. 1, p. 9-13, Jan. 1999.

DI PIETRO, A.; HUETAS-GONSALEZ, M. D.; GUTIERREZ-CORANA, J. F.; MARTINEZ-CADENA, G.; MEGLECZ, E.; RONCERO, M. I. G. Molecular characterization of a subtilase from the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, v. 14, n. 5, p. 653-662, 2001.

DUNAEVSKII, Y. E.; TSIBINA, T. A.; BELYAKOVA, G. A.; DOMASH, V. I.; SHARPIO, T. P.; ZABREIKO, S. A.; BELOZERSKII, M. A. Proteinase inhibitors as antistress proteins in higher plants. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 344-348, Jul. 2005.

DUNAEVSKY, Y. E.; PAVLYUKOVA, E. B.; BELIAKOVA, G. A.; BELOZERSKY, M. A. Properties of buckwheat seed inhibitors of trypsin and serine proteases from micromycetes. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry (Bioorganicheskaya Khimiya)**, v. 20, n. 3, p. 297-302, 1994.

DUNAEVSKY, Y. E.; GRUBAN, T. N.; BELYAKOVA, G. A.; BELOZERSKY, M. A. Enzymes secreted by filamentous fungi: Regulation of secretion and purification of an extracellular protease of *Trichoderma harzianum*. **Biochemistry (Moscow)**, v. 65, n. 6, p. 723-727, Jun. 2000.

ESPOSITO, R. E.; KLAPHOLZ, S. Meiosis and ascospore development. In: STRATHERN, J. N.; JONES, E. W.; BROACH, J. R. (Eds.). **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces***. Life cycle and inheritance. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1981. p. 211-287.

ESTRUCH, J. J.; CAROZZI, N. B.; DESAI, N.; DUCK, N. B.; WARREN, G. W.; KOZIEL, M. G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Nature Biotechnology**, v. 15, p. 137-141, 1997.

GATEHOUSE, J. A.; GATEHOUSE, A. M. R.; BROWN, D. P. Control of phytophagous insect pests using serine proteinases inhibitors. In: MICHAUD, D.; GEORGETOWN, T. X. **Recombinant protease inhibitors in plants**. Georgetown: Landes Bioscience Eureka Com., 2000. p. 9-26.

GHIGO, J. M.; WANDERSMAN, C. A 4th metalloprotease gene in *Erwinia chrysanthemi*. **Research in Microbiology**, v. 143, n. 9, 857-867, Nov./Dec. 1992.

GIRI, A. P.; HARSULKAR, A. M.; PATANKAR, A. G.; GUPTA, V. S.; SAINANI, M. N.; DESHPANDE, V. V.; RANJEKAR, P. K. Association of induction of protease and chitinase in chickpea roots with resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceri*. **Plant Pathology**, v. 47, n. 6, p. 693-699, 1998.

GODFREY, T.; S.WEST. **Industrial enzymology**, 2. ed. New York: Macmillan Publishers Inc., 1996. 609 p.

GORBALENYA, A. E.; SNIJDER, E. J. Viral cysteine proteinases. **Perspectives in drug discovery and design**, v. 6, n. 1, p. 64-86, Dec. 1996.

GREEN, T. R.; RYAN, C. A. Wound-induced proteinase inhibitors in plant leaves: a possible defense mechanism against insects. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 776-777, Feb. 1972.

GUTIERREZ-CAMPOS, R.; TORRES-ACOSTA, J. A.; PEREZ-MARTINEZ, J.; GOMEZ-LIM, M. A. Pleiotropic effects in transgenic tobacco plants expressing the oryzacystatin I gene. **Hortscience**, v. 36, n. 1, p. 118-119, 2001.

GVOZDEVA, E. L.; IEVLEVA, E. V.; GERASIMOVA, N. G.; OZERETSKOVSKAYA, O. L.; VALUEVA, T. A. Exoproteinases of the oomycete *Phytophthora infestans*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 165-169, Mar. 2004.

HAHN, M. G.; BUCHELI, P.; CERVONE, F.; DOARES, S. H.; O'NEILL, R.A. ; DARVILL, A.; P. ALBERSHEIM. Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions. In: KOSUGE, T.; E.W. NESTER (Ed.). **Plant-microbe interactions: molecular and genetic perspectives**. New York: McGraw Hill, 1989. v. 3, p. 131-181.

HAHN, M. G.; CHEONG, J. J.; ALBA, R.; ENKERLI, J.; COTÉ, F. Oligosaccharide elicitors: structures and recognition. In: FRITIG, B.; LEGRAND, M. (Eds.). **Mechanisms of plant defense responses**. New York: Academic Press, 1993. p. 99-116.

HARSULKAR, A. M.; GIRI, A. P.; PATANKAR, A. G.; GUPTA, V. S.; SAINANI, M. N.; RANJEKAR, P. K.; DESHPANDE, V. V. Successive use of non-host plant proteinase inhibitors required for effective inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases and larval growth. **Plant Physiology**, v. 121, n. 2, p. 497-506, 1999.

HAM, W. E.; R. M. SANDSTEDT. A Proteolytic inhibiting substance in the extract from unheated soybean meal. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 154, p. 505-506, 1945. (Letters to the Editors).

HERSHKO, A., LESHINSKY, E., GANOTH, D.; HELLER, H. ATP-dependent degradation of ubiquitin protein conjugates. **Proceedings of the National Academic Science of the United States of America**, v. 81, n. 6, p. 1619-1623, Mar. 1984.

HICKS, D.; DUNCAN, M. J.; JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The adaptation of insects to plant protease inhibitors. **Journal of Insect Physiology**, v. 43, n. 10, p. 885-895, Oct. 1997.

INANAGA, H.; KOBAYSI, D.; KOUZUMA, Y.; AOKI-YASUNAGA, C.; IYAMA, C.; KIMURA, M. Protein engineering of novel proteinase inhibitors and their effects on the growth of *Spodoptera exigua* larvae. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 65, n. 10, p. 2259-2264, 2001.

JACKSON, D. P.; COTTER, D. A. Expression of proteolytic enzymes during *Dictyostelium discoideum* spore germination. **Archives of Microbiology**, v. 137, n. 3, p. 205-208, Mar. 1984.

JONGSMA, M. A.; BAKKER, P. L.; VISSER, B.; STIEKEMA, W. J. Trypsin inhibitor activity in mature tobacco and tomato plants is mainly induced locally in response to insect attack, wounding and virus infection. **Planta**, v. 195, n. 1, p. 29-35, 1994.

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

KAFATOS, F. C.; TARTAKOF, A. M.; LAW, J. H. Preliminary characterization of a proteolytic enzyme from silk moths. **Journal of Biological Chemistry**, v. 242, n. 7, p. 1477-1487, Apr. 1967.

KAPUR, R.; TAN-WILSON, A. L.; WILSON, K. A. Isolation and partial characterization of a subtilisin inhibitor from the mung bean (*Vigna-radiata*). **Plant Physiology**, v. 91, n. 1, p. 106-112, Sep. 1989.

KLOSE, A. A.; HILL, B.; FEVOLD, H. L. Presence of a growth inhibiting substance in raw soybeans. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 62, p. 10-12, 1946.

KONDO, H.; IJIRIS, S.; ABE, K.; MAEDA, H.; ARAI, S. Inhibitory effect of oryzacistatins and a truncation mutant on the replication of poliovirus in infected vero cells. **Febs Letters**, v. 299, n. 1, p. 48-50, 1992.

KORNBERG, A.; SPUDICH, J. A.; NELSON, D. L.; DEUTSCHER, M. P. Origin of proteins in sporulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 37, p. 51-78, 1968.

KOUZUMA, Y.; INANAGA, H.; DOI-KAWANO, K.; YAMASAKI, N.; KIMURA, M. Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor with three cystatin domains from sunflower seeds. **Journal of Biochemistry**, v. 128, n. 2, p. 161-166, 2000.

KRAUT, J. Serine-proteases - structure and mechanism of catalysis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 46, p. 331-358, Jul. 1977.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. general properties. **Journal of Genetic and Physiology**, v. 30, p. 291-310, 1947.

KYOSTIO, S. R. M.; CRAMER, C. L.; LACY, G. H. *Erwinia-carotovora* subsp *carotovora* extracellular protease - characterization and nucleotide-sequence of the gene. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 20, p. 6537-6546, Oct. 1991.

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

LIPKE, H.; FRAENCKEL, G. S.; LEINER, I. E. Growth inhibitors: effect of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, n. 8, p. 410-414, 1954.

McFARLANE, J. E. Nutrition and digestive organs. In: BLUM, M. S. (Ed.). **Fundamentals of Insect Physiology**. New York: Wiley and Sons, 1985.

McKEE, H. S. **Nitrogen metabolism in plants**, 329. Oxford: Clarendon, 1962. 728 p.

MICHAUD, D. Avoiding protease-mediated resistance in herbivorous pests. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 4-6, Jan. 1997.

MORIHARA, K.; ODA, K. Microbial degradation of proteins. In: GUENTHER, W. (Ed.). **Microbial degradation of natural products**. Weinheim, Germany: VCH Publishers, 1993. p. 293-364.

MOSOLOV, V. V.; LOGINOVA, M. D.; FEDURKINA, N. V.; BENKEN, I. I. The Biological significance of proteinase-inhibitors in plants. **Plant Science Letters**, v. 7, p. 77-80, 1976.

MOSOLOV, W.; VALUEVA, T. A. Proteinase inhibitors in plant biotechnology: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 233-240, May, 2008.

MOURGUES, F.; BRISSET, M. N.; CHEVREAU, E. Strategies to improve plant resistance to bacterial diseases through genetic engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 5, p. 203-210, 1998.

MOVAHEDI, S.; HEALE, J.B. The roles of aspartic proteinase and endo-pectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex Pers. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 36, n. 4, p. 303-324, 1990.

MURPHY, J. M.; WALTON, J. D. Three extracellular proteases from *Cochliobolus carbonum*: cloning and targeted disruption of ALP1. **Molecular Plant Microbe Interaction**, v. 9, n. 4, p. 290-297, May, 1996.

NELSON, C. E.; WALKER-SIMMONS, M.; MAKUS, D.; ZUROSKE, G.; C. A. RYAN. Regulation of synthesis and accumulation of proteinase inhibitors in leaves of wounded tomato plants. In: HEDIN, P. A. (Ed.). **Plant resistance to insects**. Washington: American Chemical Society, 1983. p. 103-122.

NEURATH, H. The versatility of proteolytic enzymes. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 32, n. 1, p. 35-49, 1986.

NEURATH, H. The diversity of proteolytic enzymes. In: BEYNON, R. J.; BOND, J. S. (Eds.). **Proteolytic enzymes - a practical approach**. Oxford: JRL Press, 1990. 259 p.

NORTH, M. J. Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. **Microbiological Reviews**, v. 46, n. 3, p. 308-340, Sep. 1982.

O'DAY, D. H. Acid protease activity during germination of microcysts of the cellular slime mold *Polysphodylium pallidum*. **Journal of Bacteriology**, v. 125, n. 1, p. 8-13, Jan. 1976.

OPPERT, B.; MORGAN, T. D.; HARTZER, K.; KRAMER, K. J. Compensatory proteolytic responses to dietary proteinase inhibitors in the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera : Tenebrionidae). **Comparative biochemistry and physiology c-toxicology & pharmacology**, v. 140, n. 1, p. 53-58, Fev. 2005.

PAPPINEN, A.; VON WEISSENBERG, K. Detection and partial characterization of extracellular proteases of the pathogenic fungi *Endocronartium pini*, *Gremmeniella abietina* and *Heterobasidion annosum*. **European Journal of Forest Pathology**, v. 27, n. 6, p. 373-380, 1997.

PARIS, R.; LAMATTINA, L. *Phytophthora infestans* secretes extracellular proteases with necrosis inducing activity on potato. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, n. 8, p. 753-760, Nov. 1999.

PEARCE, G.; STRYDON, D.; JOHNSON, S.; RYAN, C. A. A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. **Science**, v. 253, n. 5022, p. 895-898, Aug. 1991.

PEÑA-CORTEZ, H.; SÁNCHEZ-SERRANO J. J.; MERTENS, R.; WILLMITZER, L.; PRAT, S. Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 86, n. 24, p. 851-9855, Dec. 1989.

PEÑA-CORTEZ, H.; SÁNCHEZ-SERRANO, J. J.; WILLMITZER, L. Systemic induction of proteinase-inhibitor-II gene expression in potato plants by wounding. **Planta**, v. 174, n. 1, p. 84-89, Apr. 1988.

PERNAS, M.; LOPEZ-SOLANILLA, E.; SANCHEZ-MONGE, R.; SALCEDO, G.; P. RODRIGUEZ-PALENZUELA. Antifungal activity of a plant cystatin. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 7, p. 624-627, 1999.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Protein Science**, v. 4, n. 3, p. 337-360, Mar. 1995.

PHADATARE, S. U.; SRINIVASANK, M. C.; DESHPANDE, M. V. Evidence for the involvement of serine protease in the conidial discharge of *Conidiobolus coronatus*. **Archives of Microbiology**, v. 153, n. 1, p. 47-49, Dec. 1989.

POSTEMSKY, C. J.; DIGNAM, S. S.; SETLOW, P. Isolation and characterization of *Bacillus megaterium* mutants containing decreased levels of spore protease. **Journal of Bacteriology**, v. 135, n. 3, p. 841-850, Sep. 1978.

RAO, M. B.; TANKSALE, M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 3, p. 597-635, Sep. 1998.

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **Biochemistry Journal**, v. 290, p. 205-218, 1993.

READ, J. W.; HAAS, L. H. The baking quality of flour as affected by certain enzyme actions. V. Further studies concerning potassium bromate and enzyme activity. **Cereal Chemistry**, v. 15, p. 59-68, 1938.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: the enzyme inhibitors. In: DEY, P. M.; J. B. HARBORNE (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. New York: Academic Press, 1991. v. 5, p. 259-306.

RICKAUER, M.; FOURNIER, J.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M. T. Induction of proteinase inhibitors in tobacco cell suspension culture by elicitors of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. **Plant Physiology**, v. 90, n. 3, p. 1065-1070, Jul. 1989.

RIES, S. M.; ALBERSHEIM, P. Purification of a protease secreted by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Phytopathology**, v. 63, p. 625-629, 1973.

RYAN, C. A. Oligosaccharides as recognition signals for the expression of defensive genes in plants. **Biochemistry**, v. 27, n. 25, p. 8879-8883, Dec. 1988.

RYAN, C. A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 425-449, Sep. 1990.

SCHULER, T. H.; POPPY, G. M.; KERRY, B. R.; DENHOLM, I. Insect-resistant transgenic plants. **Trends Biotechnology**, v. 16, n. 4, p. 168-175, Apr. 1998.

SIKES, A.; MAXCY, R. B. Differentiation of food bacteria on the basis of their ability to utilize different proteins. **Journal of Food Science**, v. 44, n. 4, p. 1228-1232, Jul. 1979.

SREEDHAR, L.; KOBAYASHI, D. Y.; BUNTING, T. E.; HILLMAN, B. I.; BELANGER, F. C. Fungal proteinase expression in the interaction of the plant pathogen *Magnaporthe poae* with its host. **Gene**, v. 235, n. 1-2, p. 121-129, Jul. 1999.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Structural and functional diversities in *Lepidopteran serine* proteases. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 11, n. 1, p. 132-154, Mar. 2006.

TRAVIS, J.; SALVESEN, G. S. Human-plasma proteinase inhibitors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 655-709, 1983.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 11, p. 1305-1309, Nov. 2004.

VALUEVA, T. A.; Kladnitskaya, G. V.; Il'inskaya, L. I.; Gerasimova, N. G.; Ozeretskova, O. L.; Mosolov, V. V. Chymotrypsin inhibitors in potato tubers infected with *Phytophthora infestans*. **Russian Journal of Biorganic Chemistry (Biorganicheskaya Khimiya)**, v. 24, n. 5, p. 346-349, 1998.

VALUEVA, T. A.; MOSOLOV, V. V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry (Moscow)**, v. 69, n. 1, p. 1305-1309, Nov. 2004.

VALUEVA, T. A.; REVINA, T. A.; GVOZDEVA, E. L.; GERASIMOVA, N. G.; OZERETSKO-VSKAYA, O. L. Role of protease inhibitors in potato protection. **Russian Journal of Biorganic Chemistry (Bioorganicheskaya Khimiya)**, v. 29, n. 5, p. 499-504, Sep. 2003.

VAN MELDEREN, L.; THI, M.; LEECHI, P.; GOTTESMAN, S.; COUTURIER, M.; MAURIZI, M. L. ATP-dependent degradation of Ccd A by Lon protease. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 44, p. 27730-27738, Nov. 1996.

VERNEKAR, J. V.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Alkaline protease inhibitor: A novel class of antifungal proteins against phytopathogenic fungi. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 262, n. 3, p. 702-707, 1999.

WARD, O. P. Proteinases. In: FOGARTY, W. M. (Ed.). *Microbial enzymes and biotechnology*. London: **Applied Science Publishers**, 1983. p. 251-305.

WESTFALL, R. J.; HAUGE, S. M. The nutritive quality and the trypsin inhibitor content of soybean flour heated at various temperatures. **The Journal of Nutrition**, v. 35, p. 374-389, 1948.

WOLFSON, J. L.; MURDOCK, L. L. Growth of *Manduca sexta* on wounded tomato plants: role of induced proteinase inhibitors. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 54, n. 3, p. 257-264, Mar. 1990a.

WOLFSON, J. L.; MURDOCK, L. L. Diversity in digestive proteinase activity among insects. **Journal of Chemical Ecology**, v. 16, n. 4, p. 1089-1102, Apr. 1990b.

YOSHIKAWA, M.; IWASAKI, T.; FUJII, M.; OOGAKI, M. Isolation and some properties of a subtilisin inhibitor from barley. **Journal of Biochemistry**, v. 79, n. 4, p. 765-773, 1976.

ZHANG, Y.; BAK, D. D.; HEID, H.; GEIDER, K. Molecular characterization of a protease secreted by *Erwinia amylovora*. **Journal of Molecular Biology**, v. 289, n. 5, p. 1239-1251, Jun. 1999.

**Embrapa**

---

**Amazônia Oriental**

**Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**

