UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Análise Molecular da Interação entre α -Amilases de
Z.subfasciatus e Inibidores de α -Amilases de trigo 0.19:
Aspectos Biotecnológicos para o Controle de Pragas
de Armazenamento**

Cláudio Picanço Magalhães

São Paulo
2002

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Magalhães, Cláudio Picanço

M188a Análise molecular da interação entre α -amilases de *Z. subfasciatus* e inibidores de α -amilases de trigo 0.19: aspectos biotecnológicos para o controle de pragas de armazenamento / Cláudio Picanço Magalhães. -- São Paulo, 2002.
86p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.

Orientador: Finardi Filho, Flávio

1. Feijão: Proteína: Bioquímica dos alimentos 2. Amilase: Ciência dos alimentos I. T. II Finardi Filho, Flávio, orientador.

641.35652 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Análise Molecular da Interação entre α -Amilases de
Z.subfasciatus e inibidores de α -Amilases de trigo 0.19:
Aspectos Biotecnológicos para o Controle de Pragas
de Armazenamento**

Cláudio Picanço Magalhães

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Flávio Finardi Filho

São Paulo
2002

Cláudio Picanço Magalhães

Análise Molecular da Interação entre α -Amilases de *Z.subfasciatus* e Inibidores de α -Amilases de trigo 0.19:
Aspectos Biotecnológicos para o Controle de Pragas de
Armazenamento

Comissão Julgadora da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Flavio Finardi Filho
orientador/presidente

Dra. Maria Fátima Grossi de Sá

Prof. Dr. Manuel Pueyo Troyano

Profa. Dra. Maria Inés Genovese Rodrigues

Profa. Dra. Ursula Maria Lanfer Marquez

São Paulo, 4 de setembro de 2002.

Aos meus pais, Fernanda e Petrônio.

AGRADECIMENTOS

- Os meus sinceros agradecimentos ao Professor Flavio Finardi Filho pelo estímulo, orientação e amizade durante estes anos de pesquisa.
- A Doutora Fátima Grossi de Sá pela oportunidade de aprimoramento dos meus conhecimentos, estímulos ao meu crescimento profissional e pela co-orientação sempre presente.
- Ao Conselho Nacional de Pesquisa CNPq, Universidade de São Paulo e ao Cenargen-EMBRAPA pelo apoio para a realização da pesquisa.
- Aos meus pais Fernanda e Petrônio pela educação que me deram e aos meus irmãos Petrônio Junior e Josefina pela amizade calorosa.
- À Helen pela companhia constante, e ajuda durante os anos que se sucederam no desenvolvimento da minha tese de doutorado.
- As minhas Avós Ruth, Lucy e Edna, que sempre torceram por meu sucesso nestes anos de pesquisa.
- Às amigas Érika Veiga, Tatiana, Karen, Renata, Ana Carolina Ete Melo, Liziane, Francine, Simoni, Mariana, Cristina Mattar, Railene, Janaína e Norma e aos amigos Octavio Franco, Paulo, Charles Dayler, Rodrigo Fragoso, João, Osmundo Brilhante e Rodrigo Ozório pela amizade e ajuda na hora de dificuldade.
- Aos funcionários da Coordenação do Curso de Pós-Graduação.

**ESTE TRABALHO FOI DESENVOLVIDO GRAÇAS AO APOIO DAS
SEGUINTE INSTITUIÇÕES:**

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF-USP São Paulo - SP
- Centro Nacional de Recursos Genéticos – CENARGEN/EMBRAPA Brasília-DF

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 A cultura do feijão.	11
1.2 Aspectos nutricionais.	13
1.3 Pragas e doenças do feijão.	15
1.4 A família Bruchidae e as plantas leguminosas.	17
1.5 Inibidores de α -amilases (Als).	19
1.6 Inibidores de α -amilases de trigo	23
1.7 Inibidores de α -amilases de feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>).	25
1.8 Resistência de <i>Zabrotes subfasciatus</i> às proteínas de defesa do feijão.	29
	32
2. OBJETIVOS	
3. MATERIAIS	33
3.1 Reagentes	33
3.2 Colunas cromatográficas	33
3.3 Proteínas para calibração da coluna cromatográfica	34
3.4 Equipamentos	34
3.5 Páginas eletrônicas utilizadas.	35
3.6 Software	35
4. MÉTODOS	36
4.1 Purificação da α -amilase de <i>Z. subfasciatus</i>	36
4.2 Isolamento e caracterização de Inibidores de α -	37

amilase de trigo	
4.3 Visualização das proteínas em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	38
4.4 Construção do modelo do complexo α -amilase – inibidor	38
4.5 Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S200 HR	39
4.6 Ensaio de inibição da atividade amilásica	41
4.7 Análise de identidade entre as α -amilases de insetos que atacam plantas cultivadas	41
4.8. Análise de identidade entre os inibidores de α -amilase de cereais	42
5. RESULTADOS	43
5.1 Isolamento e caracterização de Inibidores de α -amilase de trigo.	43
5.2 Isolamento da α -amilase de <i>Z. subfasciatus</i>	43
5.3 Atividade do inibidor 0.19 e 0.53 sobre a α -amilase de <i>Z. subfasciatus</i>	47
5.4 Interação entre o inibidor 0.19 e a α -amilase de <i>Z. subfasciatus</i>	47
5.5 Modelo de interação ZSA-0.19	50
5.6 Comparação entre as seqüências primárias das α -amilases de insetos que atacam plantas cultivadas	53
5.7 Análise da identidade das regiões de interação entre 0.19 e ZSA, nas α -amilases de insetos	55
5.8 Identidade entre as seqüências de aminoácidos	58

dos inibidores de α -amilase de cereais	
5.9 Identidade nas regiões de interação entre 0.19 e ZSA, nos inibidores de α -amilase de cereais	58
6. DISCUSSÃO	62
6.1 Isolamento dos inibidores de α -amilases de trigo	62
6.2 Estudo da atividade dos inibidores 0.19 e 0.53 sobre a α -amilase de <i>Z. subfasciatus</i>	63
6.3 Estudo por filtração em gel da formação do complexo enzima-inibidor	63
6.4 Estudo da superfície de interação entre 0.19-ZSA a partir de modelagem molecular	64
6.5 Estudo das forças responsáveis pela formação do complexo 0.19-ZSA	65
6.6 Identidade entre as α -amilases de insetos	67
6.7 Identidade entre os Inibidores de Cereais	68
	72
7. CONCLUSÃO	
8. BIBLIOGRAFIA	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sementes do feijão comum infestada por <i>Zabrotes subfasciatus</i> .	18
Figura 2 - Isolamento dos inibidores de trigo por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC.	44
Figura 3 – Purificação da α -amilase de <i>Z. subfasciatus</i> . Cromatografia de exclusão molecular CM-Cellulose	45
Figura 4 – Purificação da α -amilase de <i>Z. subfasciatus</i> . A- Cromatografia em Epóxi-Sepharose.	46
Figura 5. Porcentagem de inibição da atividade amilásica de <i>Zabrotes subfasciatus</i> por concentrações crescentes dos inibidores de trigo 0.19 e 0.53.	48
Figura 6 – Cromatografia de exclusão molecular do inibidor 0.19, ZSA e complexo ZSA + 0.19.	49
Figura 7 - Modelo do complexo entre a α -amilase de <i>Z. subfasciatus</i> (ZSA - em amarelo) e o inibidor de α -amilase de trigo 0.19 (azul).	51
Figura 8 - Superfície de interação entre a α -amilase de <i>Z. subfasciatus</i> e o inibidor 0.19 de trigo.	52

Figura 9 – Cladograma formado pela similaridade de seqüência entre as α -amilases de insetos que atacam plantas cultivadas.	54
Figura 10 – Alinhamento entre as seqüências primárias das α -amilases de insetos.	56-57
Figura 11 – Cladograma formado pela similaridade de seqüência entre os inibidores de α -amilases de cereais.	59
Figura 12 – Alinhamento entre as seqüências primárias dos inibidores de α -amilases de cereais.	60

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

ZSA – α -amilase de *Zabrotes subfasciatus*.

PPA – α -amilase de pâncreas de porco.

AI – Inibidor de α -amilase.

α AI1 – Inibidor 1 de feijão *Phaseolus vulgaris*

α AI2 – Inibidor 2 de feijão *Phaseolus vulgaris*

HSA – α -amilase salivar humana.

TMA – α -amilase de *Tenebrio molitor*

RESUMO

Sementes de feijão são freqüentemente infestadas por diferentes insetos-praga incluindo *Zabrotes subfasciatus*, *Callosobruchus maculatus* e *Acanthocelides obtectus*. Estratégias visando o controle do ataque desses insetos têm sido desenvolvidas através do estudo de substâncias tóxicas e/ou proteínas antinutricionais que atuem sobre o desenvolvimento destes insetos. Os inibidores protéicos de α -amilases presentes em leguminosas como o feijão comum, bem como em sementes de cereais como o trigo, têm a capacidade de inibir a α -amilase de *Z. subfasciatus*. O estudo do mecanismo de interação entre os inibidores e as enzimas digestivas de insetos pode propiciar o delineamento de inibidores potentes que atuariam especificamente contra essas pragas. O estudo da interação do inibidor de trigo 0.19 e com a α -amilase de *Z. subfasciatus* desenvolvido neste trabalho demonstra a atuação de vários componentes de força na superfície de interação entre a enzima e o inibidor, garantindo a estabilidade do complexo. A presença de pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações iônicas foram evidenciadas. Através da análise da seqüência primaria de outros inibidores de cereais, foi verificado que o inibidor de α -amilase de trigo denominado 0.53 e o inibidor de cevada possivelmente atuam da mesma maneira sobre a α -amilase do inseto. Estes resultados tornam esses inibidores protéicos potenciais candidatos à transformação de plantas de feijão visando o controle do desenvolvimento de *Z. subfasciatus* durante seu estágio larval.

ABSTRACT

Several insects included *Callosobruchus maculatus*, *Acanthocelides obtectus* and *Zabrotes subfasciatus* have frequently infest bean seeds. Strategies for the control of these predators have been developed through the study of toxic substances and antinutritional factors, which act on the development of these insects. Proteinaceous Inhibitors of α -amylases present in varieties of beans, as well as in wheat seeds have been demonstrated to be active to the α -amylase of *Z. subfasciatus*. The study of the mechanism of interaction between these inhibitors and the digestive enzymes can promote a powerful inhibitor that acts specifically against these insect-pest. Studies on the interaction of the inhibitor of wheat kernels 0.19 and *Z. subfasciatus* α -amylase demonstrated the performance of some intermolecular forces on the surface of the enzyme-inhibitor interaction giving the stability to the complex. The presence of hydrogen bond, hydrophobic interactions and saline bridges had been showed. The analysis of the primary sequences of inhibitors from other cereals allowed to verify that the wheat amylase inhibitor 0.53 and the barley inhibitor possibly act by the same way on the insect α -amylase. These results make these proteinaceous inhibitors potential candidates to be used on the plant transformation for the control of the development of *Z. subfasciatus* during of larval stage.

1. Introdução

1.1 A cultura do feijão

A semente do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é a base alimentar de mais de 500 milhões de pessoas no mundo, sendo a maior fonte de proteínas na dieta de diversas populações na América Latina e no Leste da África (Graham & Renalli, 1997).

O cultivo do feijão é geralmente realizado em pequenas áreas. A agricultura empregada varia desde sistemas amplamente automatizados, irrigados e monocultura de produção intensiva a complexos sistemas de plantio incluindo associação com milho, cana-de-açúcar ou café.

A aplicação de técnicas mais apropriadas de plantio é, contudo, limitada em sistemas de policultura, fazendo com que a produção em grandes áreas da América Latina alcance apenas 500 kg/ha em contraste aos 5000 kg/ha em condições experimentais. A diversidade de condições na qual o feijão é plantado, somado a preferências locais por certa variedade ou cor de semente têm dificultado o esforço para o melhoramento da sua produção.

O gênero *Phaseolus* compreende aproximadamente 55 espécies, das quais apenas 5 são cultivadas: *P. polyanthus*, feijoeiro comum (*P. vulgaris*), feijão de lima (*P. lunatus*), feijão ayocote (*P. coccineus*) e feijão tepari (*P. acutifolius*).

O feijão comum (*P. vulgaris*) foi domesticado na região central da América Latina a aproximadamente 7000 anos (Gepts & Debouck, 1991), tendo sido relatados dois centros de origem da planta. Evidências arqueológicas e agronômicas,

através do estudo de variedades selvagens encontradas no México e nas regiões dos Andes na América do Sul, sugerem que uma domesticação múltipla ocorreu em cada região (Gepts *et al.*, 1986). A dispersão a partir destes Centros parece ter ocorrido através de diferentes rotas (Gepts, 1988). As linhagens de feijões com formato pequeno, presente na região central da América seguiram uma rota via Caribe, chegando a América do Sul e ao Brasil.

Outra rota seguiu para o Norte da América chegando aos Estados Unidos (Kaplan, 1965). Em contraste, a maioria dos cultivares presente na Europa é formada por feijões com formato grande, típico dos Andes. Essas variedades foram provavelmente introduzidas na Europa através da Península Ibérica após a descoberta das Américas. Posteriormente, elas foram dispersas no continente africano durante a colonização e no nordeste dos Estados Unidos através das migrações.

Uma coleção mundial de variedades, compreendendo mais de 40 000 acessos, é mantida no Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), em Cali, na Colômbia. Esta coleção inclui variedades selvagens, indígenas, linhagens puras de *P.vulgaris* e numerosas espécies relacionadas.

O Brasil é o segundo produtor mundial de feijão do gênero *Phaseolus* e o primeiro na espécie *P.vulgaris*. A importância dessa produção, deve-se a que o feijão, além de se constituir um dos alimentos básicos da população brasileira é um dos principais produtos fornecedores de proteína na dieta alimentar dos estratos sociais, economicamente menos favorecidos. No Brasil, o consumo atual de feijão é de cerca de 16 kg/hab/ano, existindo preferências de cor, tipo de grão e qualidade culinária em algumas regiões do País. Ultimamente a demanda por produtos de melhor qualidade associada às

mudanças de hábito alimentar tem mostrado uma tendência para o aumento do consumo de feijão industrializado. Na safra 1998/99 a produção brasileira de feijão foi de 2,5 milhões de toneladas das quais 80% foram de cores e 20% do tipo preto. Embora fatores climáticos interfiram na produção, esta, geralmente tem sido suficiente para suprir o mercado interno, dependendo, apenas de importações de feijão preto, em torno de 160 mil toneladas/ano. O feijão tem uma ampla adaptação edafoclimática o que permite seu cultivo, durante todo o ano, em quase todos os estados da federação, possibilitando constante oferta do produto no mercado. Outra característica desta leguminosa é possibilitar a sua produção em diversos ecossistemas tropicais e temperados, em monocultivo e/ou consorciado nos mais variados arranjos de plantas inter e intraespecíficos (CENPAF- EMBRAPA, 2002).

1.2 Aspectos nutricionais

O feijão representa para o Brasil uma importante fonte de diversos nutrientes (vitaminas, carboidratos, proteínas e minerais) e fibras. A partir de dados do Estudo Nacional de Despesa Familiar (ENDEF), verificou-se que este contribui com 18,5 % do consumo de proteínas. O feijão apresenta componentes e características que tornam seu consumo vantajoso do ponto de vista nutricional. Entre eles, podemos citar o conteúdo protéico relativamente alto, o teor elevado de lisina, que exerce efeito complementar às proteínas dos cereais, a fibra alimentar, com suas alegações de efeitos hipocolesterolêmico e hipoglicêmico, o alto teor de carboidratos

complexos e a presença de vitaminas do complexo B (Lajolo *et al.*, 1996).

Por outro lado, alguns problemas nutricionais como a baixa digestibilidade protéica, o conteúdo reduzido em aminoácidos sulfurados, a presença de fatores antinutricionais e a baixa disponibilidade de minerais são assuntos que têm merecido a atenção de vários grupos de pesquisa.

O feijão é uma fonte relativamente boa de vitaminas hidrossolúveis. Uma porção de 170g de feijão cozido fornece 10-12% das necessidades diárias de piridoxina, 25% de tiamina, 30% de ácido fólico e 10% de niacina e riboflavina (Sathe *et al.*, 1984). No entanto pouco se sabe sobre o teor e a biodisponibilidade das vitaminas do feijão cozido e sobre sua interação com outros componentes.

Com relação aos minerais, o feijão é rico principalmente em potássio, fósforo, ferro, cálcio, cobre, zinco e magnésio (Sathe, *et al.* 1984). A biodisponibilidade de minerais é de grande relevância, já que em geral, ela é menor em vegetais do que em alimentos de origem animal. Os fatores que afetam a sua biodisponibilidade são: a digestibilidade do alimento, a forma química do mineral e os níveis de outros nutrientes na dieta. Substâncias como fitatos, fibras, oxalatos e taninos, podem interagir com os minerais, influenciando negativamente a sua biodisponibilidade (Sathe, *et al.* 1984).

Com relação ao conteúdo protéico, torna-se evidente seu baixo valor biológico se comparado com proteínas de origem animal, como o leite e a carne. Isso é devido em parte a sua baixa digestibilidade e ao reduzido conteúdo de aminoácidos sulfurados (Evans & Bauer, 1978). É importante notar que a qualidade protéica é aumentada em dietas mistas de feijões e

cereais, em decorrência do efeito complementar do alto conteúdo de lisina do feijão, com o de aminoácidos sulfurados dos cereais (Bressani, 1993). O hábito do povo brasileiro de ingerir arroz com feijão, torna o valor biológico da proteína da dieta próximo ao das proteínas de origem animal.

As frações albumina e globulina representam 75% do total de proteínas no feijão, sendo que o conteúdo de uma fração varia em relação a outra dependendo do cultivar. A faseolina, também conhecida como glicoproteína II, vicilina ou globulina G1, e as fitohemaglutininas, ou lectinas, e globulina G2 são as principais proteínas de reserva dos feijões cultivados, correspondendo cerca de 50% e 10% respectivamente (Sathe *et al.*, 1984). Em alguns acessos selvagens, a proteína predominante é a arcelina, uma albumina com alta similaridade à fitohemaglutinina e aos inibidores de α -amilase presentes nas semente de feijão (Mirkov *et al.*, 1994; Grossi de Sá *et al.*, 1997).

Dada a importância nutricional do feijão, tornam-se necessários estudos de fatores que afetam o seu cultivo e conservação pós-colheita. Entre esses podemos destacar o ataque de patógenos e pragas que acarretam perdas de até 35% de sua produção.

1.3 Pragas e doenças do feijão

A presença de patógenos ocorre nas regiões subtropicais e tropicais em maior intensidade do que naquelas de clima temperado. A umidade e o calor presentes no ambiente dos trópicos favorecem o desenvolvimento de patógenos,

somando-se a isso os 2 a 3 ciclos de plantio por ano que promovem uma contínua contaminação da área. Outros fatores importantes são a limitação de rotação de culturas em pequenas áreas e o custo de sementes livres de doenças (Beebe & Pastor-Corrales, 1991). Entre os patógenos de maior importância inclui a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*), a ferrugem (*Uromyces appendiculatus* var *appendiculatus*), a bactéria *Xantomonas campestris* var *phaseoli* e o vírus do mosaico do feijão (BCMV).

As pragas de insetos causam enorme dano aos feijões tanto nas regiões da América Latina quanto na África. Desta forma, gafanhotos de folha, crisomelídeos e carunchos são os mais recorrentes dentre as pragas de feijão (Korngay & Cardona, 1991). Os insetos que atacam sementes em estocagem, como é o caso dos carunchos, causam uma flutuação de preço em países em desenvolvimento. Diversas estratégias têm sido utilizadas para a diminuição do ataque destas pragas, incluindo a produção de variedades mais resistentes e a determinação bioquímica de fatores em sementes que promovam esta resistência. Acrescenta-se também a identificação de um número expressivo de substâncias químicas em variedades selvagens de *P.vulgaris*, como as proteínas (arcelinas, inibidores de α -amilase) e heteropolissacarídeos capazes de inibir o desenvolvimento destas pragas (Gatehouse & Gatehouse., 1998).

1.4 A família Bruchidae e as plantas leguminosas

As sementes de plantas leguminosas são importantes fontes alimentícias para a humanidade, como as do feijão, da ervilha e do grão de bico. Diferentes espécies de carunchos – insetos coleópteros que pertencem à família Bruchidae – atacam essas sementes estocadas e conseqüentemente promovem grandes perdas agrárias e prejuízos anuais.

Vinte e quatro horas após emergir da semente cada caruncho-fêmea põe de oitenta a cem ovos, depositando de um a três ovos sobre a superfície de outra semente. Larvas eclodem desses ovos furando a casca e penetrando nas sementes. Dentro destas, alimentando-se de amido e proteínas de reserva, desenvolvem até atingir a fase final de pupa. Um pouco antes de atingir este estágio, cada larva produz um orifício na semente, deixando uma camada fina ou “janela” na casca intacta. Após o período de 25 a 30 dias quando a pupa se transforma em inseto adulto, emergem da semente através do orifício deixado na casca (Figura 1).

Com um ciclo reprodutivo de aproximadamente trinta dias e uma produção aproximada de oitenta ovos por fêmea, a população de caruncho é capaz de destruir as sementes quando estocadas por vários meses, ainda que a infestação inicial seja moderada (Taleskar, 1987). Estes insetos-praga infestam as sementes, mesmo na presença de lectinas, inibidores de proteinases digestivas, bem como na presença de substâncias do metabolismo secundário como alcalóides, saponinas e glicosídeos cianogênicos. Em muitos casos, os compostos que possuem algum efeito sobre as pragas estão presentes em altos níveis em variedades silvestres. Porém, durante a evolução, a

Figura 1- Sementes do feijão comum infestada por *Z. subfasciatus*.

domesticação dessas plantas eliminou ou diluiu esses compostos, por serem tóxicos para os humanos ou por possuírem sabores desagradáveis. O fato desses insetos coevoluiem com sua fonte de alimentação natural levou a seleção de cepas de insetos capazes de lidar com a presença daqueles defensores nas sementes (Chrispells, 1996).

Atualmente, as técnicas de transformação de plantas através de engenharia genética podem acelerar o desenvolvimento de novas variedades resistentes ao ataque de pragas, permitindo primeiramente (i) que genes de uma espécie de planta sejam introduzidos em outra, (ii) que um fator de resistência presente em baixos níveis possa ser superexpresso e finalmente, (iii) que vários fatores possam ser introduzidos simultaneamente em níveis sub-ótimos. Isso mimetizaria a situação natural e poderia evitar a quebra de resistência da semente a uma determinada praga (Chrispells, 1996).

Portanto, o entendimento destes fatores que promovem defesa contra insetos-praga é extremamente importante para a compreensão da relação planta-praga e para o uso em programas de melhoramento de plantas (Chrispells, 1996). Dentre estes fatores, é de fundamental importância o conhecimento de substâncias que agem sobre enzimas digestivas como os inibidores de α -amilase e os inibidores de proteinases.

1.5 Inibidores de α -amilases (AIs)

As α -amilases catalisam a hidrólise de ligações glicosídicas α -1,4 em polissacarídeos como o amido e o glicogênio. Essa enzima está presente em vários organismos

desde procariontes a eucariontes. Essa enzima é largamente usada em biotecnologia para a degradação de amido e em indústrias químicas para a produção de oligossacarídeos por transglicosilação (Terashima & Kator, 1996). As amilases são também alvo para o desenvolvimento de drogas no tratamento de diabetes e obesidade (Layer *et al.*, 1985; Lankisch *et al.*, 1988).

Diversos tipos de compostos orgânicos como acarbose, iso-acarbose e ciclodextrinas são inibidores de amilases não protéicos. (Kim *et al.*, 1999). A atividade inibitória de tais compostos sobre α -amilases é devido, principalmente, a sua estrutura cíclica, a qual se assemelha ao substrato e por isso liga-se ao sítio catalítico da α -amilase (Larson *et al.*, 1994).

As ciclodextrinas são encontradas em várias formas sendo denominadas alfa, beta e gama. As formas alfa e beta são capazes de inibir diversas α -amilases, porém são hidrolisadas por amilases fúngicas (Suetsugu *et al.*, 1974; Kamitori *et al.*, 1999). Por outro lado, a amilase salivar humana e a amilase pancreática hidrolisam γ -ciclodextrina (Kondo *et al.*, 1990).

Inibidores de α -amilases protéicos são encontrados em microrganismos, plantas e animais (Silano, 1987; Ryan, 1990; Iulek, 2000). Em plantas, são particularmente abundantes em leguminosas e cereais (Iguti & Lajolo, 1991; Garcia-Casado *et al.*, 1994; Feng *et al.*, 1996; Giri & Kachole, 1998; Melo *et al.*, 1999). Diferentes inibidores de amilases, encontrados em plantas, exibem diferentes especificidades contra amilases de diferentes fontes. Em alguns casos, os inibidores agem apenas contra as α -amilases de mamíferos, enquanto outros agem somente contra α -amilases de insetos. Esses inibidores têm sido extensivamente estudados, devido a sua ação em enzimas

humanas, sua implicação como maior alérgeno na asma de padeiro, possuindo também papel no mecanismo de defesa de plantas contra insetos e microorganismos. O modo de ação desses inibidores se baseia na ligação de regiões da proteína com o sítio ativo da amilase, através de pontes de hidrogênio, bloqueando assim o acesso ao substrato.

A estrutura cristal da α -amilase de *Tenebrio molitor* em complexo com o inibidor de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) mostra que o inibidor se insere diretamente na depressão onde está presente o sítio ativo, prevenindo a ligação com o substrato (Pereira *et al.*, 1999). Nessa interação, 18 resíduos do inibidor interagem diretamente com 24 resíduos da enzima. A área total de contato é 2085 Å² (994 Å² do TMA e 1091 Å² do inibidor de amaranto).

Os trabalhos sobre os α Als de raízes, tubérculos e frutos aparecem em número reduzido. Há um relato de um inibidor obtido da casca de batata, dialisável, com estabilidade de 90% após ser autoclavado a 120°C, por 10 min (Hemberg & Larsson, 1961), porém essas pesquisas não tiveram continuidade.

Posteriormente, Shivaraj *et al.* (1979) investigaram a presença de inibidores de α -amilases em 13 diferentes tubérculos e bulbos, tendo resultados positivos somente em duas variedades de inhame, *Colocasia antiquorum*, e em cará, *Dioscorea alata*. Esses inibidores atuam sobre as α -amilases pancreáticas humana e de porco, como também sobre a amilase salivar humana.

A caracterização da fração ativa do inhame revelou a existência de dois inibidores protéicos de α -amilase (Sharma & Pattabiraman, 1980). Estes inibidores possuem peso molecular

de 14,3 kDa e 12,5 kDa, sendo resistentes ao ataque de pepsina, tripsina, quimotripsina e pronase. Em trabalho semelhante, os mesmos autores caracterizaram o inibidor glicoprotéico do cará (Sharma & Pattabiraman, 1982). Esse inibidor se destaca por possuir 64% de carboidratos na molécula e ser inativado por tripsina e quimotripsina.

Seltzer & Strumeyer (1990) relatam o isolamento de dois inibidores de α -amilases do inhame com 11,9 kDa, os quais são estáveis à temperatura de ebulição por até 3h, às variações de pH na faixa de 2 a 12, bem como a agentes dissociantes, como uréia 6M e cloreto de guanidina 8M. Assim como demonstrado nos trabalhos dos α lAs de tubérculos, não houve perda de atividade após tratamento com tripsina e subtilisina.

As frações protéicas de tubérculos como *Xanthosoma* e *Solenostemon* também apresentam atividades inibitórias contra α -amilase salivar humana. O inibidor de α -amilase de *Solenostemon* apresenta alta estabilidade ao calor, sendo estável após o aquecimento a 80°C, por 15 min. O inibidor de *Xanthosoma* apresentou um decréscimo de atividade de 50% após o aquecimento a 60°C (Prathibha *et al.*, 1995).

Uma fração protéica capaz de inibir α -amilases de pâncreas de porco, saliva humana e *Aspergillus oryzae* foi identificada em raízes de mandioca (Magalhães *et al.*, 2000.). Esta fração fica retida em coluna cromatográfica de Red-Sepharose.

Sobre os α lAs encontrados em frutos há um registro de um inibidor endógeno na manga, *Mangifera indica* (Mattoo & Modi, 1970), que apresenta natureza protéica, não dialisável, termolábil, e com padrão de inibição competitiva. Esse inibidor age ainda sobre a α -amilase encontrada em banana (*Musa sp*).

No mesmo trabalho, os autores se referem a outro inibidor endógeno obtido em bananas, que fora descrito anteriormente, porém a sua existência não foi confirmada.

1.6 Inibidores de α -amilases de trigo

Entre os cereais, o trigo é particularmente abundante em inibidores de α -amilases (Feng, *et al.*, 1991). Alguns deles são seletivos, inibindo fortemente α -amilases de insetos e não inibindo α -amilases de mamíferos. Inibidores de α -amilases específicos para insetos são monoméricos os quais, baseado na mobilidade eletroforética, são denominados inibidores do grupo 0.28 (Silano, 1987). A especificidade, a arquitetura monomérica e o tamanho em torno de 14kDa, fazem com que os genes destes inibidores sejam bons candidatos para introdução em plantas, visando a resistência aos insetos-praga. A sequência completa de aminoácidos da família dos inibidores de α -amilases de trigo, denominados WRP24, WRP25, WRP26, WRP27, 0.19 e 0.53, já foi determinada (Feng *et al.*, 1996). Alguns deles possuem diferenças de sequência em torno de 50%, enquanto 0.19 e 0.53, possuem 94% de similaridade (Fraco *et al.*, 200). Os inibidores desta família apresentam em torno de 10 resíduos de cisteína, os quais formam cinco pontes dissulfeto. São resistentes a tratamento térmico e são estáveis a valores extremos de pH (Buonocore & Silano, 1986). Através de análise por dicroísmo circular notou-se a presença de um alto conteúdo de α -hélices na estrutura, ao contrário do inibidor de α -amilase de *S. tendae* e do inibidor bifuncional de amilase e serino-proteinase de trigo, que é composto basicamente de fitas beta (Zemke *et al.* 1991).

A estrutura tridimensional do inibidor de trigo 0.19, foi determinada por análise cristalográfica (Oda *et al.*, 1997). Sua estrutura é formada por cinco α -hélices arranjadas de forma antiparalela, satisfazendo o enovelamento das hélices. Os dez resíduos de cisteína formam pontes dissulfeto entre os pares Cys6-Cys52, Cys20-Cys41, Cys28-Cys83, Cys42-Cys99 e Cys54-Cys115. O padrão de pontes dissulfeto no 0.19 é idêntico ao padrão encontrado nos inibidores 0.28 e no Inibidor bifuncional de milho - RBI (Strobl *et al.*, 1995), além de apresentar 26% de similaridade em relação à estrutura primária, a superposição entre as duas estruturas terciárias (RBI e 0.19) mostrou uma conformação idêntica entre os resíduos 5-68 e 78-164 do 0.19, porém o segmento correspondente aos resíduos 69-77 apresenta uma alça muito curta capaz de formar uma pequena estrutura β antiparalela (Oda, *et al.*, 1997).

Um modelo de interação entre 0.19 e a amilase salivar humana foi efetuado baseado na estrutura cristal do complexo entre a α -amilase de *T. molitor*:inibidor RBI (Franco *et al.*, 2000). A comparação entre as interfaces das duas estruturas mostrou que o inibidor 0.19 deve estar no sítio ativo da enzima na mesma orientação que o inibidor de milho. No modelo HSA-0.19, novas alças próximas ao sítio catalítico promovem uma maior interface de interação. Nesse trabalho foi testada a atividade inibitória de diversos inibidores de trigo perante as α -amilases de pâncreas de porco, *Z. subfasciatus*, *A. obtectus* e *C. maculatus*. Além de ter sido observado uma variação nas especificidades, um dos inibidores, denominado WRP27, não foi capaz de inibir nenhuma das amilases testadas. O alinhamento das seqüências primária entre estes inibidores mostrou uma mudança na posição 109 somente presente em WRP27. Nesta posição todos os outros inibidores possuem uma

glicina, enquanto que WRP27 possui uma arginina. No modelo, esta glicina está posicionada na interface de interação na qual qualquer cadeia lateral pode causar impedimentos estéricos.

Apesar da semelhança na estrutura primária entre os inibidores denominados 0.19 e 0.53, estes se diferem em relação à especificidade perante α -amilases de diferentes organismos. Enquanto ambos são capazes de inibir as α -amilases de insetos que atacam leguminosas, como *A. obtectus*, *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*, apenas o inibidor 0.19 é capaz de inibir fortemente a amilase pancreática de mamíferos (Franco *et al.*, 2000).

Este fato torna o inibidor denominado 0.53 um bom candidato como controle do crescimento de larvas de *Z. subfasciatus*, evitando possíveis efeitos antinutricionais em mamíferos alimentados com feijões transgênicos que expressem esta nova proteína.

1.7 Inibidores de α -amilases de feijão (*P.vulgaris*)

Em *P.vulgaris*, já foram identificados vários tipos de inibidores diferentes de amilases. Sua relação estrutura-função tem sido revisada em detalhes (Ho *et al.*, 1994, Franco *et al.*, 2002). Esses inibidores geralmente são glicoproteínas e são formados por duas ou mais subunidades. O perfil físico-químico dos inibidores de α -amilases de feijão esteve sempre associado ao das lectinas. A composição em aminoácidos e açúcares, o padrão eletroforético, o ponto isoelétrico, a permanente contaminação de uma proteína nas purificações da outra, e algumas reações imunológicas cruzadas, evidenciavam a estreita relação estrutural entre ambos. A descoberta das

arcelinas em feijões silvestres mostrou o elo comum na diversificação evolutiva (Finardi-Filho *et al.*, 1996).

Além da composição, a sequência de aminoácidos é muito semelhante nos três tipos de proteínas, com regiões homólogas. A comparação de seqüências em banco de dados permite dizer que se trata de uma verdadeira família de proteínas, com identidade entre os resíduos superior a 90% entre isoformas da mesma proteína e acima de 60% de similaridade entre todos os componentes (Mirkov *et al.*, 1996).

Um dos inibidores de feijão, denominado α -amilase inibidor I (α AI1), encontrado em variedades obtidas comercialmente, inibe as α -amilases do trato digestivo de mamíferos e de alguns coleópteros (Marshall & Lauda, 1975; Ishimoto *et al.*, 1996). Foi mostrado que o inibidor α AI1 expresso em ervilhas transgênicas, confere resistência, inibindo o crescimento das larvas dos carunchos *C. maculatus* e *B. pisorum* (Schroeder *et al.*, 1995).

O α AI1 é primeiramente expresso em uma forma inativa, contendo uma pró-região, que é posteriormente processada proteoliticamente no resíduo asparagina 77, tornando-se assim, um potente inibidor da amilase de pâncreas de porco (PPA) (Pueyo *et al.*, 1993).

Mudanças pós-traducionais são responsáveis por esta atividade e consiste na associação não covalente de duas cadeias polipeptídicas (α e β) contendo 77 e 146 resíduos, respectivamente. O complexo PPA- α AI1, mostrado por cristalografia, consiste de um dímero do inibidor e duas moléculas de enzima totalizando um massa molécula de 150 kDa (Bompard-Gilles *et al.*, 1996). Sua estrutura terciária não contém

α -hélices e é rica em folhas β antiparalelas. Além disso, é formada por três alças, denominadas L0, L1 e L2 que se projetam para fora da molécula.

A alça L2 é significativamente longa na estrutura, formando juntamente com L1 a parte que interage com o sítio ativo da PPA. O sítio de processamento requerido para a ativação do inibidor (Asn77) está localizado na região de ligação ao resíduo glicano. O estudo cristalográfico revela três sítios de glicosilação nos aminoácidos asparagina 12, asparagina 65 e asparagina 140 em cada monômero do inibidor (Bompard-Gilles *et al.*, 1996).

A atividade inibitória de α AI1 também ocorre contra amilases dos carunchos *Callosobruchus maculatus*, *Callosobruchus chinensis* e *Bruchus pisorum*. Esses insetos atacam freqüentemente sementes de feijão de corda (*Vigna unguiculata*), ervilha (*Pisum sativum*) e feijão azuki (*Vigna angularis*). A ação é precedida pela formação do complexo enzima-inibidor que é dependente de pH, temperatura e concentração da proteína na semente (Le Berre-Anton *et al.*, 2000). A transferência de cDNA codificando α AI1 de *P. vulgaris* para sementes de ervilha e de feijão azuki tornaram estes feijões resistentes a *C. maculatus* e *C. chinensis* (Shade *et al.*, 1994; Ishimoto *et al.*, 1996). O sucesso dos experimentos tem encorajado diversas pesquisas no intuito de promover sementes resistentes a pragas naturais.

Outro inibidor encontrado em sementes de feijão, denominado amilase inibidor II (α AI2), possui 78% de similaridade com o α AI1 e difere em relação à especificidade contra amilases (Ishimoto & Chrispeels, 1996). Esse inibidor é encontrado somente em variedades silvestres, que contêm

arcelina como maior proteína de reserva, no lugar de faseolina contida nas variedades cultivadas. Enquanto α AI1 possui atividade contra PPA e amilases de carunchos do Velho Mundo (*Callosobruchus maculatus*, *Callosobruchus chinensis* e *Bruchus pisorum*), α AI2 inibe amilase de *Z. subfasciatus*, um caruncho do Novo Mundo. Os dois inibidores possuem propriedades físico-químicas similares e apresentam reação cruzada em análise imunológica através de Western Blot, no entanto, apresentam padrões eletroforéticos distintos (Morton *et al.* 2000).

Durante a caracterização bioquímica, o α AI2 demonstrou que sua atividade é dependente de pH, possuindo atividade inibitória ótima em pH 5,5. Em meio alcalino, pH 9,9, nenhuma inibição é verificada. A formação do complexo enzima-inibidor envolve interação direta entre as duas proteínas, onde um triplete de aminoácidos (Trp-Ser-Tyr) presentes na região de interação do α AI1 é substituído por Tyr-Ser-Phe no α AI2 (Grossi de Sá & Chrispells, 1997). Porém, uma mutagênese sítio dirigida efetuada nesses aminoácidos, não foi capaz de alterar a especificidade do inibidor, mostrando que outras regiões são importantes para a ligação.

A análise da interação entre ZSA (amilase de *Z. subfasciatus*) em complexo com os inibidores α AI1 e α AI2 foi efetuada utilizando-se como molde, a estrutura cristal da amilase de *T. molitor* e a estrutura cristal da interação entre α AI1-PPA. Os resíduos de aminoácidos que estão na interface de interação foram identificados e forças moleculares como pontes de hidrogênio e as pontes salinas estavam relacionadas com a estabilidade do complexo (Da Silva, *et al.*, 2000). Porém, estes estudos não permitiram determinar o motivo pelo qual o α AI1 não consegue inibir a amilase de *Z. subfasciatus*, já que este

inibidor se ajustava à depressão onde está presente o sítio ativo da amilase, sem nenhum impedimento estérico.

Vale lembrar que durante a década de oitenta, tabletes contendo extratos de feijão foram vendidos comercialmente, no intuito do controle da obesidade de humanos a partir da redução da digestão do amido e da absorção da glicose (Carlson, 1983). Porém, diversos trabalhos mostraram que a concentração presente nos tabletes contendo bloqueadores de amido não possuía quantidade suficiente para diminuir a digestão desse carboidrato *in vivo*, muito menos para dificultar a absorção da glicose (Wolever *et al.*, 1983). Além disso, estes tabletes, formados a partir de extratos de feijão, possuíam grande quantidade de inibidores de tripsina e lectinas como contaminantes. Portanto, essas proteínas contidas na preparação não purificada dos inibidores de α -amilases, poderiam causar diversos danos à saúde como hipertrofia e hiperplasia do pâncreas, no caso dos inibidores de tripsina, e danos a células epiteliais da mucosa do intestino, no caso das lectinas (Liener *et al.*, 1984).

1.8 Resistência de *Z. subfasciatus* à proteínas de defesa do feijão.

Diversos trabalhos têm tentado elucidar o possível mecanismo que garante resistência de *Z. subfasciatus* a altas concentrações de α Al1 no feijão. O estudo de α -amilases presentes neste inseto demonstrou a capacidade de expressão de α -amilases e glicosidases diferentes, em resposta a dietas variadas. Ensaio feitos com extratos de α -amilases do trato

digestivo de larvas de *Z. subfasciatus*, alimentados com sementes artificiais de feijão comum e de feijão de corda ou Caupi (*Vigna unguiculata*), apresentou padrão de atividade amilásica diferente em gel de eletroforese. Além das bandas de atividade amilásica presentes nos dois experimentos, duas novas bandas de atividade amilásica eram visualizadas quando o inseto se alimentava de sementes de *P.vulgaris* (Silva *et al.*, 2001).

Este tipo de adaptação, através da indução da expressão de novas enzimas digestivas em resposta a proteínas potencialmente tóxicas, tem sido descrita em insetos que se alimentam com altas concentrações de inibidores de cisteíno e serino-proteinases (Jongsma & Bolter, 1997). A hipótese que explicaria a indução de novas amilases estaria relacionada com diferenças químicas e estruturais entre os grãos de amido (Silva *et al.*, 1999). Porém, os ensaios utilizando diferentes grãos de amido não provaram tal hipótese, sendo mais provável que este grau de indução seja provocado pela presença do inibidor α AI1 em sementes de *P.vulgaris* (Silva *et al.*, 2001).

Como já citado anteriormente, o feijão comum possui uma família de proteínas de defesa que compreende as fitohemaglutininas, as arcelinas, e os inibidores de α -amilases. Estes inibidores, denominados α -AI1, encontrado em variedades comerciais, e o α -AI2 encontrado em variedades selvagens, diferenciam-se em relação às suas especificidades. Apenas o α -AI2 é ativo contra a α -amilase *Z. subfasciatus*. O trabalho desenvolvido por Ishimoto & Chrispells (1996) demonstrou que o α -AI1 sofre clivagem proteolítica por enzimas do trato digestivo de *Z. subfasciatus*. Na caracterização, esta protease mostrou ser do tipo serínica. Através do seqüenciamento de aminoácidos foi determinada a presença do sítio de clivagem na subunidade β ,

que compreende resíduos de triptofano, serina e tirosina, típicos para serino proteinases (Mirkov, 1995). É também interessante notar que o inibidor α -AI2, capaz de inibir *Z. subfasciatus* possui motivo diferente nesta posição, sendo substituído por tirosina, serina, fenilalanina. O trabalho recente desenvolvido por Silva *et al* (2001) demonstrou que o trato digestivo de *Z. subfasciatus* apresenta várias classes de proteinase. Enquanto *C. maculatus* utiliza uma grande variedade de cisteino-proteinases, *Z. subfasciatus* utiliza adicionalmente proteases aspartil e serino - proteinases. Este fato pode explicar o porquê de tal inseto ser capaz de usar uma dieta bastante variada.

Porém, várias questões deverão ser elucidadas visando o estudo do controle desta praga. Uma delas seria a total caracterização destas proteinases, através da obtenção da seqüência completa de aminoácidos por seqüenciamento a partir da extremidade amino-terminal ou o uso de oligonucleotídeos-consenso para obtenção dos genes através de amplificação por PCR. Esta seqüência pode ser útil para o desenvolvimento de inibidores de proteinase específicos para esta praga. Outro ponto seria o estudo da interação da α -amilase de *Z. subfasciatus* com inibidores descritos na literatura que contenham atividade contra este inseto-praga.

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo o estudo da interação entre o inibidor de trigo 0.19 e a amilase do bruquídeo *Z. subfasciatus*, assim como a identificação das diferenças entre os diferentes inibidores de amilases presentes em cereais, a partir de estudos bioquímicos e técnicas de modelagem molecular.

3. Materiais

3.1 Reagentes

Meio Grace - Cat. N. 11605-094, Invitrogen, USA

Células de *Spodoptera frugiperda* (SF9) - Cat. N. B825-01, Invitrogen, USA.

Benzoamidina – Cat. N. B6506, Sigma USA.

Fenontrolina – Cat.N. P9375, Sigma, USA.

Aprotinina – Cat. N. A4529, Sigma, USA.

Leupepina - Cat. N. L9783, Sigma, USA.

Pepstatina A – Cat. N. P4265, Sigma, USA.

Fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) – Cat. N. P7626, Sigma, USA

Acrilamida e N,N metileno bis acrilamida - Sigma Chemical Co. ST Louis, EUA.

TEMED - Sigma Chemical Co. ST Louis, EUA.

Persulfato de amônio- Sigma Chemical Co. ST Louis, EUA.

3.2 Colunas Cromatográficas

Sephacryl S-200 HR - Cat.N. 170584-10 Amersham Pharmacia Biotech, USA.

CM cellulose – Cat. N. 16062-10, Amersham Pharmacia Biotech, USA.

Epoxi-Activated Sepharose 6B – Cat. N. 170480-01, Amersham Pharmacia Biotech, USA.

Reverse-Phase Column –Cat N. 218TP54, VYDAC, USA.

3.3 Proteínas para calibração da coluna cromatográfica de exclusão molecular

Blue Dextran - Cat N. 170360-01, Amersham Pharmacia Biotech, USA.

Ribonuclease A – Cat. N. R83832, Sigma , USA.

Quimotripsinogenio A – Cat. N. C4879, Sigma, USA.

Ovalbumina - Cat. N. A76641, Sigma, USA.

Anidrase carbônica – Cat. N. C3934, Sigma, USA.

Albumina sérica bovina - P7656, Sigma, USA.

3.4 Equipamentos

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – SHIMADZU SYSTEM CONTROLLER – SCL10.

Fonte de Corrente elétrica - Bio-Rad Power PAC 300, California, EUA.

Cubas e placas de vidro - Mini- Protein 3, Bio Rad, California, EUA.

Estufa - WTC Binder, Alemanha.

Espectrofotômetro - Hitachi, modelo U-2000, Hitachi, Japão.

3.5 Páginas eletrônicas utilizadas

<http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP/server/index.html> - Página para análise da interação entre subunidades de uma proteína ou para análise da interação entre proteínas diferentes.

<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html> - Página que contém banco de dados de estruturas protéicas tridimensionais descritas na literatura.

<http://www.expasy.ch/tools/dna.html> - Página utilizada para tradução da sequência de aminoácidos de uma proteína a partir de uma sequência de nucleotídeos.

<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html> - Página utilizada para análise de identidade entre seqüências distintas de nucleotídeos ou de aminoácidos.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> - página de busca contendo banco de dados de seqüência de aminoácidos, para a análise de seqüências desconhecidas.

3.6 Software

Swiss-Pdb Viewer – Programa disponível na página <http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>, desenvolvido pelo Instituto Suíço de Bioinformática. Este programa foi utilizado para visualização da estrutura 3D de proteínas e modelagem molecular de estruturas a partir da seqüência de aminoácidos, partindo de um modelo já descrito, com alta identidade de seqüência.

4. Métodos

4.1 Purificação das α -amilases de *Z. subfasciatus*

Células recombinantes de *Spodoptera frugiperda*, expressando α -amilase de *Z. subfasciatus*, obtida no Centro Nacional de Recursos Genéticos (Cenargen/ EMBRAPA) foi inoculada em meio Grace, contendo 10% de soro de vitela a 28°C. Após a multiplicação das células por 72 horas, o meio foi centrifugado por 10 minutos a 1000 g. As células foram rompidas por 45 minutos em gelo no tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 130 mM, 1% de Triton X-100, 10mM de NaF, 10mM de fosfato de sódio e 10 mM de pirofosfato. Para evitar degradação das proteínas, foram utilizados vários inibidores de proteases (cloreto de benzamidina 0,8mg/ml, fenanthroline 0,5 mg/ml, aprotinina 0,5 mg/ml, leupeptina 0,5 mg/ml, pestatina A 0,5 mg/ml e 50 mM de fluoreto de phenilmetilsulfonil). O lisato foi centrifugado a 1000 x g por 30 minutos e o sobrenadante utilizado para purificação. O extrato obtido da expressão da enzima em célula de inseto foi aplicado em uma coluna de troca iônica CM-Cellulose. O material retido foi eluído com um gradiente de NaCl de 0 a 1,0 M, originando um único pico. Este pico apresentou atividade amilásica. Apesar do isolamento de α -amilases em *Z. subfasciatus*, para o cálculo da estequiometria foi necessária uma melhor purificação da α -amilase majoritária. Para isso, acoplamos β -ciclodextrina em uma coluna Epoxi-Sepharose 6B. Nesta coluna foi aplicado o pico retido da CM-Cellulose e o material retido foi eluído

em um único pico com uma maior concentração de β -ciclodextrina (8mg/ml).

4.2 Isolamento e caracterização de Inibidores de α -amilase de trigo.

Sementes de trigo , variedade BR35, foram obtidas no Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPq/ EMBRAPA). As sementes foram maceradas em moinho e as proteínas extraídas com 0.15M de NaCl, por agitação por 5 horas, a 4°C. O material foi então centrifugado a 10000 x g por 30 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante submetido a precipitação com sulfato de amônio a uma concentração entre 20% e 40% de saturação. Após diálise exaustiva contra água, a fração foi aplicada em coluna de fase reversa (Vydac 218TP54) em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando 3 paços de gradiente de acetonitrila: 0 a 30% em 10 minutos, 30 a 60% em 40 minutos e 60 a 100% em 10 minutos. Os picos foram monitorados por leitura em espectrofotômetro a 216 nm. Os picos referentes aos inibidores 0.19 e 0.53 foram liofilizados e estocados a -20°C (Figura 2).

4.3 Visualização das proteínas em géis de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Para a visualização do padrão das proteínas purificadas neste trabalho foi utilizado o método desenvolvido por Laemmli (1970). Os géis foram montados utilizando duas concentrações diferentes: o gel de aplicação contendo acrilamida 3,75% e SDS 1% em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 6,8 e o gel de separação contendo acrilamida 12% e SDS 0,1% em tampão Tris-HCl 1,0 M pH 8,8. As amostras foram dissolvidas em tampão para eletroforese (0,5M Tris-HCl, pH6,8, SDS 8,2%, sacarose 2% e 0,001% de azul de bromofenol). Foram utilizados como marcadores de mobilidade eletroforética, proteínas de pesos moleculares conhecidos. A eletroforese desenvolveu-se a temperatura ambiente, sob corrente constante de 15 mA durante aproximadamente 1h, utilizando-se uma fonte regulável de corrente contínua. As bandas protéicas foram visualizadas pela transferência do gel para uma solução corante contendo 0,1% p/v de Coomassie Brilliant Blue em 25% v/v de metanol e 10% de ácido acético.

4.4 Construção dos modelos do complexo amilase-inibidor

A construção dos modelos de interação entre os inibidores de α -amilases de trigo, 0.19 e 0.53, em complexo com a α -amilase de *Z. subfasciatus* foi efetuado baseado na única estrutura cristal do complexo TMA- RBI (amilase de *Tenebrio molitor* e inibidor bifuncional de milho - *Eleusine coracana*, código PDB - 1TMQ). Para isso, foi verificada a identidade na sequência

de aminoácidos entre o inibidor de α -amilase de milho (RBI) e os inibidores de α -amilase de trigo, como também entre α -amilase de *Tenebrio molitor* (TMA) e a amilase de *Z. subfasciatus* (ZSA), utilizando o programa T-Coffee (URL-<http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html>). O programa Swiss Modell PDB Viewer, disponível na página eletrônica <http://www.expasy.ch/spdbv/> (Guex, & Peitsch, 1997), foi utilizado para a sobreposição das estruturas baseado na sequência de aminoácidos. Para o refinamento do modelo, um esquema de minimização de energia foi utilizado usando o programa Gromos 96 (Van Gunsteren, 1996). Para evitar erros na orientação dos aminoácidos presentes no inibidor em relação aos aminoácidos da enzima e a conformação das cadeias laterais, ciclos alternados de minimização de energia foram utilizados. A análise do modelo foi efetuada baseado na análise do gráfico de Ramachandran. Este gráfico reflete as possíveis rotações entre os aminoácidos pertencentes à cadeia de proteínas (Lehninger *et al.*, 1995). A análise da interação entre os resíduos de aminoácidos do complexo foi efetuado utilizando o programa Protein-Protein Interaction Server (Jones & Thornton, 1995; Jones & Thornton, 1996).

4.5 Cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S-200 HR

Para analisar a estequiometria da interação entre o inibidor 0.19 e a amilase de *Z. subfasciatus*, uma coluna de Sephacryl S-200HR, de dimensões 100 cm por 15 mm, foi

equilibrada em tampão fosfato de sódio pH 6,8, 0,05M, contendo NaCl 20 mM e CaCl_2 0,1mM, em um fluxo contínuo de 0.5 ml/min. Para a calibração da coluna foram utilizadas as seguintes proteínas: quimotrisinigênio A (25kDa), ribonuclease A (13,7kDa), anidrase carbônica (29kDa), ovalbumina (43 kDa), e albumina sérica bovina (67kDa). Os valores do K_{av} foram calculados usando a equação: $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$, onde V_e é o volume de eluição da amostra, V_0 é o volume vazio estimado pelo Blue Dextran 2000, e V_t é o volume total da coluna. O volume vazio obtido foi de 75 ml. Uma reta foi obtida através da inclusão dos valores em um gráfico logarítmico de K_{av} x pesos moleculares e utilizados para estimar os pesos moleculares da α -amilase de *Z. subfasciatus*, o inibidor de trigo e o peso molecular formado pelo complexo enzima-inibidor. Um mg do inibidor foi aplicado na coluna. O pico relativo a sua leitura foi evidenciado por leitura a 280 nm e o peso molecular estimado a partir do cálculo do K_{av} e análise no gráfico logarítmico padronizado. A mesma quantidade de amilase de *Z. subfasciatus* foi aplicada em seguida, sendo sua leitura também evidenciada por espectrofotometria a 280 nm. O peso molecular do maior pico obtido, referente à amilase também foi efetuado como descrito anteriormente. A relação estequiométrica entre enzima-inibidor foi verificada por análise do peso molecular obtida após a aplicação conjunta das duas proteínas na coluna, previamente incubadas por 20 minutos a 37°C no mesmo tampão de equilíbrio da coluna.

4.6 Ensaio de inibição da atividade amilásica

A atividade inibitória dos inibidores de α -amilase de trigo foi avaliada segundo método descrito por Bernfeld (1955). Para a realização do ensaio foi o inibidor foi incubado por 25 minutos, a 37°C, com a amilase purificada de *Z. subfasciatus* em tampão fosfato de sódio pH6,8, 0,05M, contendo NaCl 20 mM e CaCl₂ 0,1mM, em um volume final de 1,5 ml. Após este período, a reação foi iniciada com a adição 0,5 ml de amido 1%. Após 10 minutos de reação, 2 ml de uma solução de DNS (1g de ácido dinitro salicílico em 20 ml de NaOH 2M e 30 g de tartarato de sódio e potássio em H₂O q.s.p. 100 ml) foi adicionada. Os tubos de ensaio foram aquecidos a 100°C por 10 min. e adicionados a eles 5 ml de água destilada. A leitura foi efetuada posteriormente a 530 nm. A atividade inibitória foi evidenciada a partir da diminuição da leitura entre o tubo controle, que continha apenas a amilase em contato com o substrato, e o tubo teste, que continha a amilase em contato com os inibidores.

4.7 Análise de identidade entre as amilases de insetos que atacam plantas cultivadas

As amilases descritas na literatura, relacionadas aos insetos que atacam plantas cultivadas, foram analisadas em relação a sua similaridade de seqüência de aminoácidos. Para isso, a seqüência de aminoácidos das amilases de *Z. subfasciatus*, *C. chinensis* (caruncho que ataca *Vigna unguiculata*), *T. molitor* (inseto que ataca trigo), *Phaedon Cochleariae* (inseto que ataca

folhas de mostarda), *Diabrotica virgifera* (praga que ataca sementes de milho), *Tribolium castaneum* (praga que ataca farinha de diversos alimentos), *Drosophila melanogaster* e *Drosophila bocki* (moscas que atacam frutos), foram alinhados utilizando o algoritmo ClustalW (Thompson, 1994). As regiões que apresentavam consenso entre as amilases foram identificadas, como também foram verificadas as diferenças nos resíduos de aminoácidos na superfície de contato entre o inibidor 0.19 e a amilase de *Z. subfasciatus*. Partindo da análise da sequência de aminoácidos, um cladograma foi construído, a partir do algoritmo desenvolvido por Page (1996), mostrando a formação de grupos com maior similaridade de sequência.

4.8 Análise de identidade entre os inibidores de amilase de cereais

Os inibidores de α -amilases de milho (*Zea Mays*), cevada (*Hordeum vulgare*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), além dos inibidores de trigo 0.19 e 0.53, foram analisados em relação à sequência de resíduos de aminoácidos. Para isso, foi utilizado o mesmo método descrito anteriormente para a análise das α -amilases de insetos. Também foi realizada a análise da comparação entre os resíduos de aminoácidos presentes na superfície de interação do inibidor 0.19 com a α -amilase de *Z. subfasciatus*.

5. Resultados

5.1 Isolamento e caracterização de Inibidores de α -amilase de trigo.

Os inibidores de α -amilase de trigo isolados em coluna de fase reversa por HPLC, apresentaram perfis semelhantes ao obtido por Feng *et al*, 1996. Os inibidores de α -amilase presentes em trigo 0.19 e 0.53, foram identificados com presentes nos dois primeiros picos. Os picos restantes, são referentes aos outros inibidores de α -amilases de trigo descritos como WRP24, WRP25, WRP26, WRP27 (Figura 2).

5.2 Isolamento da amilase de *Z. subfasciatus*.

A cromatografia de afinidade em coluna de CM-cellulose está apresentou dois picos: um não retido a coluna e um adsorvido a coluna, que foi eluído com NaOH 0,1M (figura 3). Este pico retido foi dialisado e utilizado para cromatografia em coluna de epoxi- sepharose-6B contendo β -ciclodextrina acoplada a coluna (figura 4 A). A purificação da amilase foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, como mostrado na figura 4 B.

Figura 2 - Isolamento dos inibidores de trigo por cromatografia de fase reversa em sistema HPLC. Os picos referentes aos inibidores 0.19 e 0.53 estão mostrados na figura.

Figura 3 – Purificação da α -amilase de *Z. subfasciatus*. Cromatografia de exclusão molecular CM-Cellulose com o extrato obtido da expressão em células de *S. fugiperida*. P1 representa o pico não retido e P2 o pico eluído com NaOH 0,1M.

Figura 4 – Purificação da α -amilase de *Z. subfasciatus*. A- Cromatografia em Epóxi-Sepharose. O pico reluído com ciclodextrina apresentou atividade amilásica como mostrado na figura (linhas pontilhadas). B- Resultado da purificação da amilase de *Z. subfasciatus* por análise em eletroforese de poliacrilamida. A banda em torno de 50 kDa representa a α -amilase de *Z. subfasciatus*.

5.3 Atividade do inibidor 0.19 e 0.53 sobre a amilase da *Z. subfasciatus*.

O gráfico da atividade da amilase de *Z. subfasciatus* em contato com os inibidores 0,19 e 0.53 mostrou uma relação equimolar de inibição (Figura 5). A adição de 0,25 M dos inibidores, em um meio de reação contendo 1M da amilase, inibiu a atividade em torno de 25%. A maior atividade inibitória foi obtida utilizando 1M dos inibidores. A adição de concentrações crescentes de inibidor acima de 1M não foram capazes de aumentar a atividade inibitória, mostrando que a relação molecular entre o complexo enzima-inibidor está na forma 1:1.

5.4 Interação entre o inibidor 0.19 e a amilase de *Z. subfasciatus* em coluna de exclusão molecular Sephacryl – S200HR

Através da análise em coluna de exclusão molecular foi verificada a presença de um único pico de massa molecular em torno de 13 KDa, quando o inibidor purificado de trigo era aplicado na coluna (Figura 6A). Quando a fração contendo a amilase de *Z. subfasciatus* foi aplicada a coluna, um pico predominante em torno de 47 KDa, foi observado além de picos com menor intensidade, referente a contaminantes, estes contaminantes são referentes a formas glicosiladas e deglicosiladas da amilase, além de precursores inativos (Figura 6B). A análise da interação entre o inibidor 0.19 e a amilase de *Z. subfasciatus* mostrou a formação de um complexo com massa molecular aparente de 60 kDa (Figura 6C).

Figura 5. Porcentagem de inibição da atividade amilásica de *Z. subfasciatus* por concentrações crescentes dos inibidores de trigo 0.19 (●) e 0.53 (○).

Figura 6 – Cromatografia de exclusão molecular do inibidor 0.19 (A), ZSA (B) e complexo ZSA + 0.19 (C). O complexo enzima-inibidor apresenta uma massa molecular aparente de 60 KDa.

5.5 Modelo de interação ZSA-0.19

O modelo da associação do inibidor de trigo 0.19, e de ZSA mostrou que o inibidor está fortemente acomodado no sítio de ligação da enzima, não apresentando nenhum impedimento estérico (Figura 7). A estrutura tridimensional do inibidor mostrou ser formado por 6 α -hélices curtas ligadas por longas alças sem estrutura secundária definida, além disso, uma pequena estrutura β pregueada foi identificada. A análise da superfície de contato mostrou uma área total de interação entre as moléculas de 3025,2 Å² (1370,7 Å² da amilase, somado a 1654,5 Å² do inibidor). Os resíduos de aminoácidos presentes na superfície de interação promovem a formação de 12 pontes de hidrogênio e a formação de uma ponte salina entre os resíduos de aminoácidos das proteínas (Figura 8). A partir dos resíduos apontados como importantes na formação do complexo verificou-se a interação do resíduo Ser2 do inibidor, formando 3 pontes de hidrogênio com os resíduos Asp 204, Arg 202 e His 304 da enzima. Uma região formada por interações hidrofóbicas contendo os aminoácidos Trp 52 e Cys 53 do inibidor e Trp 76 e Tyr 158 da amilase foi identificada. Os aminoácidos His 48 (inibidor) e aspartato 349 (enzima) apresentaram-se muito próximos formando uma ponte salina. Finalmente uma outra região formada por pontes de hidrogênio foi verificada. Esta região formada pelos aminoácidos Lys 108, Ser 100, Gly 101, e Asp 98 do inibidor, está associada aos aminoácidos Glu 71, Asn156 e Lys 122 da amilase.

Figura 7 - Modelo do complexo entre a α -amilase de *Z. subfasciatus* (ZSA - em amarelo) e o inibidor de amilase de trigo 0.19 (azul). O inibidor está ocupando a cavidade onde está presente o sítio ativo da enzima. A Interação entre os aminoácidos está mostrado como nuvens de interação.

Figura 8 - Superfície de interação entre a amilase de *Z. subfaciatus* e o inibidor 0.19 de trigo. Os resíduos mais importantes na formação do complexo estão identificados na figura. Os resíduos de aminoácidos referentes à α -amilase de *Z. subfaciatus* estão descritos com letras de cor laranja, enquanto os resíduos de aminoácidos referentes ao inibidor estão marcados com letras brancas.

5.6 Comparação entre as seqüências de aminoácidos das amilases de insetos que atacam plantas cultivadas

A análise de similaridade entre as seqüências de aminoácidos das amilases de *Z. subfasciatus*, *C. chinensis* (caruncho que ataca *Vigna unguiculata*), *T. molitor* (coleóptero que ataca trigo), *Phaedon Cochleariae* (inseto que ataca folhas de mostarda), *Diabrotica virgifera* (praga que ataca sementes de milho), *Tribolium castaneum* (praga que ataca farinha de diversos alimentos), *Drosophila melanogaster* e *Drosophila bocki* (moscas que atacam frutos), demonstram uma identidade acima de 58% (Figura 9).

A partir da similaridade da seqüência primária, foi possível separar estas amilases em três grandes grupos. O primeiro grupo, formado pela amilase de *T. molitor* e *T. castaneum*, *D. virgifera* e *P. cochleariae*, apresentou identidade acima de 65%. Este primeiro grupo foi dividido em dois subgrupos. O primeiro grupo foi formado por *T. molitor* e *T. castaneum* que apresenta identidade de 78%.

O segundo subgrupo formado por amilases de *D. virgifera* e *P. cochleariae* apresentou identidade de 74%. A seqüência primária que apresentou maior similaridade com a amilase de *Z. subfasciatus* foi a de *C. chinensis*, com um escore de 66%, formando o segundo grupo. O terceiro e ultimo grupo foi formado por amilases das espécies do gênero *Drosophila*, onde a identidade foi de 98%.

Figura 9 – Cladograma formado pela similaridade de seqüência entre as amilases de insetos que atacam plantas cultivadas. A similaridade encontrada entre os resíduos de aminoácidos foi: *T. molitor* e *T. castaneum* - 78%; *T. virgifera* e *P. cochleariae* – 74%; *Z. subfasciatus* e *C. chinensis* 66%; *D. Bocki* e *D. melanogaster* –98%.

5.7 Análise da identidade das regiões de interação entre 0.19 e ZSA, nas amilases de insetos

A partir do pareamento da seqüência primária das amilases dos insetos que atacam plantas cultivadas, foi verificada a presença dos aminoácidos responsáveis pela interação com o inibidor 0.19 (Figura 10). Desses aminoácidos, oito se encontram em posições conservadas em todas as amilases dos insetos testados, enquanto apenas dois resíduos presentes em ZSA, não correspondiam aos aminoácidos presentes nas outras amilases. O resíduo Glu 71 (aminoácido com carga negativa) presente em ZSA, encontra-se em uma região onde nas outras amilases há um encurtamento de seqüência de dois resíduos de aminoácidos, com exceção da amilase de *T. castaneum*, onde este aminoácido é substituído por uma serina. A presença de lisina 351 em ZSA é completamente não usual. Todas as amilases de insetos aqui estudadas apresentam um ácido aspártico nesta posição. O ácido aspártico 349 é conservado nas amilases de *T. molitor*, *D. bocki* e *D. melanogaster*, porém é substituída por serina em *C. chinensis* e *D. virgifera*, por triptofano em *P. cochleariae* e por asparagina em *T. castaneum*.

TMA	-----QKDANFASGRNSIVHLFEWKWNDIADECE	29
T. CASTANEUM	---MQFKPILVCLATLA-LGQKDPHFAADRNSIVHLFEWKWSDIADECE	46
D. BOCKI	--MFLARIIVCLGFLALA-TAQFDNTYASGRSGMVHLFEWKWDDIAEACE	47
D. MELANOASTER	--MFLARIIVCLGFLALA-TAQYDTNYASGRSGMVHLFEWKWDDIAEACE	47
ZSA	--MKLGVVQLILGLAVGF--TQKNSNFQPGRNSIVQMFENWGNLAKECE	46
C. CHINENSIS	--MRSTVLLLVL-AATCY--AQKNNNFVPGRNSIVQMFENWDDIANEACE	45
D. VIRGIFERA	--MKIVILFCALSVTVSSVIGQKDNHFAQGRNTIVHLFEWHWDIAEACE	48
P. COCHLEARIAE	MFLTSLVILCSLAALS---LGQKNNNFAPGRNTIVHLFEWHWDDIANEACE	47
	* : :: .*. :*:*. :* ***	
TMA	RFLQPQGFGGVQISPPNEYLVADG--RPWNEYQPVSYIINTRSGDESAF	77
T. CASTANEUM	RFLAPKGFGGVQISPPNENLVTTSSNRPWNEYQPVSYILNTRSGDEAAL	96
DR. BOCKI	NFLGPNGFAGVQVSPVNENAVKDS--RPWNEYQPISYKLVTTRSGNEEQF	95
D. MELANOASTER	NFLGPNGFAGVQVSPVNENAVKDS--RPWNEYQPISYKLVTTRSGNEEQF	95
ZSA	TFLGPKGFAGIQISPPNENVVVGDRPWNEYQPLSYQLTTRSGDEGAL	96
C. CHINENSIS	TFLGPKGFAGVQISP-SENIVVN--GRPWNEYQPLSYDLTTRSGDEGAL	92
D. VIRGIFERA	NFLGPKGFAGVQVSPNENSVIG--DRPWNEYQPVSYQLTTRSGDESAF	96
P. COCHLEARIAE	NFLGPKGFAGVQISPPAENTVIG--DRPWNEYQPISYALNTRSGDESAF	95
	** *:*. :*:*. :* * *****:*. :* *: *	
TMA	TDMTTRCNDAGVRIYDVAVINHMTGMNG-VGTSGSSADHDGMNYPVPY	126
T. CASTANEUM	ADMISRCNAVGVRIYDVTVINHMTGMGG-TGTAGSQADRDGKNYPVPY	145
D. BOCKI	ASMVRRCNNAGVRIYDVVFVNHMAADGGTYGTGGSTANPSSKSFPGVPYS	145
D. MELANOASTER	ASMVRRCNNAGVRIYDVVFVNHMAADGGTYGTGGSTANPSSKSFPGVPYS	145
ZSA	ADMIRRCNNAGVRVYADVFNHMAAKGG-SGTGGNNCDPSKKSYPVPY	145
C. CHINENSIS	KSMLSRCNKAGIRVYADLVINHMAAASG-SGTAGHSCDAGRSYPTVPY	141
D. VIRGIFERA	ANMVQRCNNVGRIYDVVFVNHMSATSG-GGTAGGSCDVGSLSYSPVFP	145
P. COCHLEARIAE	ASMIRRCNNAGVRIYDVAVINHMSATSG-IGTGGSSCDVEPSASVPY	144
	. * *** .*:*. :*:*. :* * * * . * * * . * * * :	
TMA	SGDFHSPCEVNTQDADNVRNCELVGLRDLNQGSDYVRGVLIDYMNHMD	176
T. CASTANEUM	SGDFHDSCTVNTQDASNVRNCELVGLADLNQGSDYVRSKIIEYMNHLVD	195
D. BOCKI	SLDFNPTCGINTNDANEVRNCELVGLRDLNQGNSYVQDKVVEFLDHLID	195
D. MELANOASTER	SLDFNPTCAINTNDANQVRNCELVGLRDLNQGNSYVQDKVVEFLDHLID	195
ZSA	PDDFHPDCMINTNQDVNNVRNCQLVGLPDLQSKQYVRDKIVGYLNHLVD	195
C. CHINENSIS	GADFHKSCPIINTNDPAEVRNCELVGLPDLQGRQYVKDKIVEYMNHLVD	191
D. VIRGIFERA	SNDFHSKCDVNTQDANNIRNCWLSGLPDLQSHDYVRQKIVEYLNHLVD	195
P. COCHLEARIAE	SGDFHGRCTSNITQDPNNIRNCWLSGLPDLQSKDYVRDKILEYLNHLVD	194
	** : * * *:*. :*:*. :* * * *:*. :* * : * : * : *	
TMA	LGVAGFVIAAKHMSPGDLVIFSLKLNLTNDYGFADGARPFYIYQEVIDL	226
T. CASTANEUM	LGVAGFVIAAKHMWPADLEAIYGSGLKLNLTNDHGFLLGQKPFIFQEVIDL	245
D. BOCKI	LGVAGFVIAAKHMWPADLGVYIGRIKLNLTNDHGFASGAKAYIVQEVIDM	245
D. MELANOASTER	LGVAGFVIAAKHMWPADLGVYIGRIKLNLTNDHGFASGAKAYIVQEVIDM	245
ZSA	LGIAGFVIAAKHMWPADLSAIYGSVKLNLSAY-FPGGSRPLFYQEVIDY	244
C. CHINENSIS	LGIAGFVIAAKHIWPADLQAMYASVKLNLTNTEF-FPENSRRPFYQEVIDF	240
D. VIRGIFERA	LGVAGFVIAAKHMWPADLEAIYGSVKDL-TGSGLS--GRPFIYQEVIDL	242
P. COCHLEARIAE	LGVAGFVIAAKHMWPADLQVIYGRVKDLNTDHGFSQGSRRPFYQEVIDL	244
	** : * * *:*. :*:*. :* * * *:*. :* * : * : * : *	
TMA	GGEAISKNEYTGFGCVLEFQFGVSLGNAFQGGNQLKLNLANWGPWGLLEG	276
T. CASTANEUM	GGEAISKHEYTGFGTVIEFQYGLSLGNAFQGGNQLANLANWGPWNLIDG	295
D. BOCKI	GGEAISKSEYTGMGAIETFRHSDSIGKVFRGKDQLRYLTNWGTAWGFAAS	295
D. MELANOASTER	GGEAISKSEYTGMGAIETFRHSDSIGKVFRGKDQLRYLTNWGTAWGFAAS	295
ZSA	GTEPIKKGEYTGFGVRLDFVHGGQLTNVFRGQNLKLNLSWGTWGLASG	294
C. CHINENSIS	GGDAIKREEYLGFGNVLEFRHGCELSKAFQGSNQLKLNKNWGTWGLMQP	290
D. VIRGIFERA	GGEAVKKTEYNSFGTVLEFKYGTGLGNAFQGHNAHLNENWGPWGLLAG	292
P. COCHLEARIAE	GGEVSKNEYTGFGTVLEFKYGTGLGNAFQGNALHNLENWGPWGLLEG	294
	* : :: * * .*: * : * * . : * * : * * .*: *	

TMA	LDAVVFVDNDNDNQR---	TGGSQILTYKNPKPYKMAIAFMLAHPYG-TTRI	322
T.CASTANEUM	LDAVAFIDNDNDNQR---	TGGSQILTYKNPKPYKMAIAFMLAHPYG-TTRL	341
D. BOCKI	DRSLVFVDNDNDNQRGHGAGGADVLTYKVAQYKMASAFMLAHPFG-TPRV		344
D.MELANOASTER	DRSLVFVDNDNDNQRGHGAGGADVLTYKVPKQYKMASAFMLAHPFG-TPRV		344
ZSA	SDTVVFIDNDNDTQRGDNG---	RVLTYKEAKQYKMANAFMLAHPYAEIPKL	341
C.CHINENSIS	HDSVIFVENDNDTQR-SGSGGVEILTYKKAREYKMAVAFMLAHPHGETTKL		339
D.VIRGIFERA	TDAVAFIDNDNDNQR-DGSS--	AILTYKNPKPYKMAIAFMLAHPYG-TTRL	338
P.COCHLEARIAE	TDAVVFIDNDNDNQR-TGSG--	AILTYKNPRPYKMAIGFMLAHPYG-TTRI	340
	:: *:***.**	:**** .: **** .*****.. .::	
TMA	MSSFDFDNDNDGPPQDGSGNLISPGINDNTCSNGYVCEHRWRQVYG-MV		371
T.CASTANEUM	MSSFAFDNDNDGPPQDGAGNLISPSINDGTCSNGYVCEHRWRQIFN-MV		390
D. BOCKI	MSSFSFSNDTDGPPTTDGHNIA SPIFNSDNCSGGWVCEHRWRQIYN-MV		393
D.MELANOASTER	MSSFSFSNDTDGPPTTDGHNIA SPIFNSDNCSGGWVCEHRWRQIYN-MV		393
ZSA	FSGYYFNNDNDGPPG-----	QDNICAEGSGWVCEHRWRQIAN-MV	380
C.CHINENSIS	FSGYSYDSNDNDGPPGYGDEILGAEIKDNCSNG--	WVCEHRWSQIYN-MV	386
D.VIRGIFERA	MSSYAFDSDNDGPPGQQPGFN---	ADGTCTNGWV--CEHRWREIFN-MV	381
P.COCHLEARIAE	MSSFSFDYNDNDGPPTQGPFGFN---	SVRNLHQ-WVGGANTGWRQILRMV	385
	:*.: : .****	.: *.: **	
TMA	GFRNAVEGTQVENWWSNDDNQIAFSRGSQGFVAFTN-GGDLNQNLNTGLP		420
T.CASTANEUM	GFRNAVQETGIENWWSNDDNQIAFGRGNKGFVAFTI-GYDLNQHFETGLP		439
D. BOCKI	AFRNTVGSDDIQNWWDNGSNQISFSRGSKGFVAFNNDNYDLNSSLQTGLP		443
D.MELANOASTER	AFRNTVGSDDIQNWWDNGSNQISFSRGSKGFVAFNNDNYDLNSSLQTGLP		443
ZSA	GFRNAVSGTDMTNWWTDGYQQIAFGRGNKGFVAFSL-SGDIKADLQTSLP		429
C.CHINENSIS	EFRNVVQGTPLTNWWTDGNQQIAFSRGNKGFVAFTV-SGDISADLQTSLP		435
D.VIRGIFERA	GFRNAVAGTDVTNWWSDGNQQIAFGRGHKGFIAFTL-QGDINQSIQTSLP		430
P.COCHLEARIAE	GFRNAVDTGISNWWSDGNQQIAFGRGDKGFVAFTL-AGDINGNLQTSLP		434
	***.* : *** .: **:*.** :*:*. .*: .:*.**		
TMA	AGTYCDVISGELSGGSCTGKSVTVGDNGSADISLGS AEDDGVLA IHVNAK		470
T.CASTANEUM	AGSYCDVISGNAENGSCSGKTITVGGDGYADISLGANEDDGVIA IHVNAK		489
D. BOCKI	AGTYCDVISGSKIGSSCSGKT VTVGSDGRASIYVGSSEDDGVLA IHVNAK		493
D.MELANOASTER	AGTYCDVISGAKIGSSCSGKT VTVGSDGRASIYVGSSEDDGVLA IHVNAK		493
ZSA	PGTYCDVITGDISNNSCTGKT VTVRGDGKATIHLS SGE PDGILAIHVSAK		479
C.CHINENSIS	AGSYCDLITGISSNNSCTGKVVTVDGSGKAHIDVSG--	VDGVLA IHVNSR	483
D.VIRGIFERA	AGTYCDVISGSLENGSCGKT VNVVDGSGKAAISLSTNEDDGVVA IHVNAK		480
P.COCHLEARIAE	AGSYCDIVSGKLENGSCGKT VNVVDGNGQAYITLSSGEDDGVFLAIHVGA K		484
	.*:***::~* ..**:* :.* .* * * :. **.:*****::		
TMA	L----	471	
T.CASTANEUM	L----	490	
D. BOCKI	L----	494	
D.MELANOASTER	L----	494	
ZSA	LTSKL	484	
C.CHINENSIS	LQSKL	488	
D.VIRGIFERA	-----	480	
P.COCHLEARIAE	V----	485	

Figura 10 – Alinhamento entre as seqüências primárias das amilases de *T. molitor*, *T. castaneum*, *D. bocki*, *D. melanogaster*, *Z. subfasciatus*, *C. chinensis*, *D. virgífera* e *P. cochleariae*. Os resíduos na superfície de contato com o inibidor 0.19 estão marcados em vermelho.

5.8 Identidade entre as seqüências de aminoácidos dos inibidores de α -amilase de cereais

O grau de similaridade na seqüência de aminoácidos dos inibidores de α -amilases de milho (*Zea mays*), cevada (*Hordeum vulgare*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*), além dos inibidores de trigo 0.19 e 0.53, variou de 15 a 95% (Figura 11). Os inibidores de trigo foram os que apresentaram a maior grau de identidade. O inibidor de cevada apresentou a menor similaridade com os inibidores de milho, sorgo e arroz, porém apresentou a maior identidade com os inibidores de trigo. Os inibidores de sorgo e milho apresentaram 48% de identidade e formaram um segundo grupo.

5.9 Análise da presença das regiões de interação entre 0.19 e ZSA, nos inibidores de amilase de cereais

A seqüência primária dos inibidores de amilases de cereais foi analisada em relação à presença dos aminoácidos responsáveis pela interação com a amilase de *Z. subfasciatus* (Figura 12). A amilase de cevada apresentou a maior similaridade em relação aos aminoácidos responsáveis pela interação com a amilase de *Z. subfasciatus*, havendo modificação em apenas duas posições. O Asp 98 é substituído pelo ácido glutâmico em cevada e a Lys 108 é substituída por um resíduo de tirosina. Quando comparada à seqüência primária dos outros inibidores, uma variação bem mais significativa é notada.

Figura 11 – Cladograma formado pela similaridade de sequência entre os inibidores de amilases de cereais. A identidade encontrada entre os resíduos de aminoácidos foi: 0.19 e 0.53 – 95%, *S. bicolor* e *Z. mays* - 48%; *H. vulgare*, 0.53 e 0.19 – 46%, *O. sativa*, *Z.mays* e *S. bicolor* – 15 - 34%.

053	-----MSPWM--	6
019	-----MSPWM--	6
H.vulgare	-----MGAMWMKSMLLVLLLCMLMVT	36
O.sativa	-----MASNKVVFVSVLLAVVSVLAATATMAEYHHQDQVVYT	37
S.bicolor	-----TVD	3
Z.mays	MPLTWCSSIFQVTNANCTKKSIERPSTGELMASSSSSSSHRRLILAAAVLLSVLAAASASA	60
	2	
	3	
053	---CYPGQASQVPALPGCRPLLKLQCNG-----SQVPEAVLRDCCQQLADIS--PWRC	55
019	---CYPGQAFQVPALPACRPLLRLQCNG-----SQVPEAVLRDCCQQLADIS--PWRC	55
H.vulgare	---CDPEMGHKVSPLTRCRALVKLECVG-----NRVPEDVLRDCCQEVANIN--PWRC	86
O.sativa	RARCQPGMGYPMYSLPRCRALVKRQCRGS-----AAAAEQVRRDCCRQLAAVDDSW--PWRC	91
S.bicolor	VTACAPGLAIPAPPLPTCRTFARPRTCGLGGPYGPVDPSPVLKQRCCELAAPV--SR--PWRC	62
Z.mays	GTSCVPGWAIPHNLPLPCRWYVTSRTCIG----PRLPWPELKRCCRELADIP--AY--PWRC	115
	48 51 53	
	50 52	
053	GALYSMLDSMKEHGV-SEGQAGTGAFPSCRREVVKLTAAS---ITAVCRLPIVVDA--SD	111
019	GALYSMLDSMKEH-----GAFPCRREVVKLTAAS---ITAVCRLPIVVDA--SD	102
H.vulgare	GDLGSMRLRSVAAALGV-GGGPE--EVFPGCQKDVMLLVAG---VPALCNVPIPN--AA--SD	140
O.sativa	EAISHMLGGINRELGAPDVGHMSEVFRGCRGDLERAAAS---LP AFCNV D I P N G G G G--SD	147
S.bicolor	AALGFMMMDGVDAP-----LQDFRGCTREMQR IYAVSRLTRAAECNLPTIPG----SD	108
Z.mays	TALSILMDGAIPPGPD-AQLEGRLEDLPGCPREVQRGFAAT-LVTEAECNLATISGVAEC	173
	66	
	99 101	
	100	
053	GAYVC--DVAAYPDA	125
019	GAYVC--DVAAYPDA	116
H.vulgare	RG-VCY-WSASTDT	152
O.sativa	---VCYWLARSGY-	157
S.bicolor	----GGCHLSNSPR	118
Z.mays	PWILGGGTMPSK--	185
	108	

Figura 12 – Alinhamento entre as seqüências primárias dos inibidores de amilases de cereais 0.53, 0.19, *H. vulgare*, *O. sativa*, *S. bicolor* e *Z. mays*. Os resíduos na superfície de contato com o inibidor 0.19 estão marcados em vermelho.

Apenas um resíduo de aminoácido responsável pela interação é mantido em todos os inibidores (Cys 53). O inibidor de α -amilase de arroz ainda apresenta dois resíduos em posições conservadas, nas posições referentes a Tyr 66 e Gly 101.

6. Discussão

Os Inibidores de α -amilase têm sido propostos como um fator importante no controle do desenvolvimento de insetos-praga que atacam diversas plantas cultivadas. Os inibidores protéicos de α -amilases presentes em leguminosas como o feijão comum, bem como em sementes de cereais, como o trigo têm a capacidade de inibir a α -amilase de *Z. subfasciatus*. O estudo do mecanismo de interação entre estes inibidores e as enzimas digestivas de insetos pode promover o desenho de inibidores potentes que atuem especificamente contra esta praga.

6.1 Isolamento dos inibidores de α -amilase de trigo

Os picos obtidos por HPLC em coluna de fase reversa foram numerados de 1 a 9. Após análise por eletroforese, bandas em torno de 28KDa e 13 KDa foram visualizadas além de outros contaminantes. Estas bandas foram previamente identificadas por Franco *et al.* (2000) como pertencentes ao dímero do inibidor 0.53 e ao inibidor 0.19 respectivamente. Estas bandas foram purificadas por eletro-eluição. Os demais picos visualizados por cromatografia foram descritos por Feng *et al.* (1996), como pertencentes a outros inibidores de trigo denominados WRP25, WRP26 e WRP27. Entre estes somente WRP25 possui atividade contra *Z. subfasciatus*.

6.2 Estudo da atividade dos inibidores 0.19 e 0.53 sobre a α -amilase de *Z. subfasciatus*

O ensaio de inibição entre os inibidores de trigo e a α -amilase de *Z. subfasciatus* mostrou 100% de inibição de atividade quando 1M dos inibidores eram incubados com a enzima. Este dado está de acordo com os resultados previamente apresentados por Franco *et al.* (2000). A inibição destes inibidores frente a α -amilases de diversas origens mostrou sua atividade contra α -amilase salivar humana, α -amilase de *Acantocelides obtectus*, *Callosobruchus maculatus* e mais recentemente sobre a α -amilase de *Diabrotica virgifera* (Titarenko & Chrispeels, 2000). Porém, somente o inibidor 0.19 é capaz de inibir a α -amilase de pâncreas de porco.

6.3 Estudos por filtração em gel da formação do complexo enzima-inibidor

O estudo da formação do complexo-enzima inibidor foi efetuado a partir da comparação entre os pesos moleculares dos picos obtidos na cromatografia em gel de Sephacryl S-200HR. Quando apenas o inibidor 0.19 foi aplicado na coluna, um pico em torno de 13 KDa foi obtido. A aplicação na matriz cromatográfica da α -amilase purificada gerava um pico em torno de 43 KDa. Quando a enzima e o inibidor eram pré-incubados a 37°C por 25 min em uma relação molar de 1:1, um pico predominante em torno de 60 KDa foi observado.

O estudo de mecanismos de interação entre α -amilase-inibidor mostram diferentes padrões. No caso do inibidor de α -amilase de feijão (α -AI1) em contato com a α -amilase de pâncreas de porco, foi observada a relação de duas moléculas de α -amilase interagindo com um dímero do inibidor (Bompard-Gilles *et al.*, 1996). O trabalho desenvolvido por Takase (1994) com o inibidor de trigo 0.19 e a α -amilase de *B. subtilis* mostrou que este inibidor quando em contato com esta enzima poderia formar pelo menos dois tipos de complexos, diferenciando-se em sua estequiometria de ligação. O primeiro complexo seria formado quando o inibidor encontra-se completamente saturado pela enzima, formando uma relação do tipo 2:1. Quando a enzima foi completamente saturada pelo inibidor, um complexo 1:1 era formado. Porém, este autor não demonstrou quais sítios poderiam ser utilizados pelo inibidor para conseguir ligar-se a duas moléculas de α -amilase.

O estudo da interação da α -amilase de ZSA e o inibidor 0.19 mostrou que apenas um tipo de interação foi formado entre o complexo constituído por eles. Apesar de ter sido observado a partir da estrutura cristal que o inibidor de α -amilase 0.19 é capaz de formar dímeros em solução (Oda *et al.*, 1997), apenas uma unidade está relacionada com a inibição da α -amilase de *Z. subfasciatus*.

6.4 Estudo da superfície de interação entre ZSA-0.19 por modelagem molecular

O modelo tridimensional do inibidor 0.19, em interação com a α -amilase de *Z. subfasciatus*, apresentou mudanças

estruturais quando comparado com a estrutura cristal já descrita do inibidor. As cinco α -hélices bem definidas na estrutura cristal são, arranjadas lado a lado, favorecendo o enovelamento da proteína (Oda *et al.*, 1997). No caso do modelo formado entre o 0.19 e ZSA, longas regiões sem estrutura definida são observadas, além de segmentos curtos formando α -helices. Estas mudanças conformacionais possivelmente foram causadas pela ligação à enzima, como sugerido no mecanismo de interação entre a α -amilase de *T.molitor* a o inibidor de *Amaranthus hypocondriacus* (Pereira *et al.*, 1999).

A área total de interação entre o complexo enzima-inibidor foi de 3025 Å². Este valor é superior ao encontrado na superfície de interação entre o inibidor 0.19 e a α -amilase de *T. molitor* (2450 Å²), e entre a α -amilase salivar humana (2859 Å²). A menor superfície de interação entre um inibidor protéico e uma α -amilase, descrita na literatura, foi a obtida pela interação entre o inibidor de amaranto, com uma superfície de 2402Å² (Pereira *et al.* 1999), enquanto que a maior superfície de interação é encontrada na interação entre PPA e- α Al1 (Bompard-Gilles *et al.*, 1996).

6.5 Estudo das forças responsáveis pela formação do complexo 0.19-ZSA

Os resíduos de aminoácidos da α -amilase que interagem com o inibidor está mostrado na figura 6. Entre estes, apenas o ácido aspártico corresponde a tríade catalítica da α -amilase, formada por Asp 204, Glu240 e Asp 305. O inibidor ocupa a depressão onde está contido o sítio catalítico da enzima. Os tipos de interação responsáveis pela estabilidade do complexo formam

regiões hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ocorre também a presença de uma ponte salina. Este mesmo tipo de forças foi encontrado na estrutura cristalizada entre o complexo α Al1 e PPA. Porém, os resíduos presentes no sítio catalítico estão diretamente envolvidos na ligação ao inibidor, através de pontes de hidrogênio (Bompard-Gilles, 1996). No caso do inibidor de amaranço, o resíduo Asp 287, formador do sítio catalítico da α -amilase de *T. molitor*, forma uma ponte salina diretamente com o resíduo de Arginina7 do inibidor. Os outros dois resíduos do sítio catalítico estão conectados aos grupos funcionais dos resíduos dos inibidores através de pontes de hidrogênio. O resíduo Glu 222(TMA) está ligado com a Arg 7 (Inibidor), enquanto que Asp 185(TMA) está conectado com o grupo hidroxila da Tyr 28 (inibidor).

Ensaio utilizando mutagênese sítio dirigida, mostraram que, quando os resíduos de aminoácidos responsáveis pelo sítio ativo da α -amilase de *B. subtilis* eram modificados quimicamente, uma drástica diminuição da inibição desta enzima pelo inibidor 0.53 era observada. Tal fato indica que estes resíduos são importantes para o reconhecimento da região de ligação por este inibidor de trigo (Takase, 1994). Porém, modelagem molecular do complexo entre α -amilase salivar humana e o inibidor 0.19 não mostrou nenhuma ligação entre os resíduos responsáveis pelo sítio ativo da α -amilase salivar humana (Asp 159, Glu 233 e Asp 300), mostrando que no caso do inibidor 0.19, outros tipos de ligações podem ser fundamentais para a inibição da enzima, através do impedimento do acesso do substrato ao sítio ativo da enzima por ligações hidrofóbicas do inibidor com a depressão onde está contida a tríade catalítica (Franco *et al.*, 2000). Neste mesmo trabalho o autor sugere que a possível explicação para a diferença de

atividade entre o inibidor 0.19 e 0.53 em relação a α -amilase pancreática estaria associada a mudança nos aminoácido His46 do 0.19 por um ácido aspártico do 0.53. Um ácido aspártico nesta posição poderia afetar a ligação com a α -amilase pancreática devido à proximidade com um resíduo de ácido aspártico na posição 347 gerando uma repulsão de cargas.

6.6 Identidade entre as α -amilases de insetos

A sequência primária das α -amilases de diversos insetos que atacam plantas cultivadas foi analisada quanto à presença dos resíduos responsáveis pela interação com o inibidor 0.19. Os resíduos Trp 76, Arg 78, Asn 156, Tyr 158, Arg 202, Asp 204, His 304 e Gln 352, identificados como responsáveis pela interação entre ZSA-0.19, são conservados em todas as α -amilases de insetos analisadas. O resíduo Glu 71 e Lys 351 não parecem ser cruciais para a interação com o inibidor já que a presença deste aminoácido na α -amilase de *T. molitor* não impede a ligação com 0.19, como já descrito. Estes resíduos não estão formando pontes salinas com os aminoácidos do inibidor, porém se aproximam dos resíduos Lys115 e Glu 49 do inibidor formando interação de cargas .

A presença do resíduo Asp 349 nas α -amilases dos insetos do gênero *Drosophila* e na α -amilase de *T. molitor* deve favorecer a ligação do inibidor a essas α -amilases. Este resíduo está fortemente ligado ao inibidor através de uma ponte salina com o resíduo His 48. Ensaios de inibição da α -amilase de *D. virgifera* com o inibidor de trigo não foram capazes de inibir 100% a

atividade da enzima (Titarenko & Chrispeels, 2000). A substituição do Asp349, um aminoácido carregado negativamente, por um resíduo de serina, aminoácido polar, pode explicar a fraca ligação entre o inibidor e a enzima, pela incapacidade da formação de uma ponte salina.

A presença dos resíduos Tyr 158 e Trp 76, em todas as α -amilases aqui estudadas, favorecem a interação com o inibidor 0.19, a partir de seus resíduos Trp 52 e Tyr 66, formando interações hidrofóbicas que podem impedir o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. Além disso, a presença dos resíduos Arg 202, Asp 204, His 303, presentes também nas α -amilases de insetos, podem estar fazendo pontes de hidrogênio com Ser 2 do inibidor, promovendo ainda mais a interação entre as diferentes moléculas.

6.7 Identidade entre os Inibidores de Cereais

Os inibidores de cereais aqui estudados apresentam uma similaridade inferior a 50%, excetuando-se os inibidores de trigo 0.19 e 0.53. Porém, foi observada similaridade nos domínios relacionados com a ligação à α -amilase de *Z. subfasciatus*.

Os inibidores de sorgo e milho apresentaram o menor índice de conservação dos resíduos de interação presentes em 0.19, onde apenas o resíduo Cys 51 é preservado. Estes resíduos não parecem promover grandes forças que mantenham a ligação do complexo, devido às suas posições na estrutura. A atividade do inibidor presente em sorgo foi descrita para os insetos *Locusta*

migratória e *Periplaneta americana*, não sendo relatada nenhuma inibição da atividade amilásica em insetos da ordem Coleóptera (*Z. subfasciatus*, *T. molitor*), nem da ordem Díptera (gênero *Drosophila*) (Bloch & Richardson, 1991). Estes inibidores são descritos como capazes de inibir as α -amilases por quelamento do cálcio, utilizado pela α -amilase (Franco *et al.* 2002) .

No inibidor bifuncional de arroz, os resíduos Tyr 66 e Gly 101 apresentam-se conservados e podem promover alguma interação com a α -amilase de *Z. subfasciatus*. porém outros aminoácidos são necessários para a inibição da α -amilase. Os inibidores bifuncionais de cereais, incluindo os inibidores de cevada e milho são caracterizados por inibirem enzimas de plantas, estando relacionadas com a regulação do metabolismo do amido durante o desenvolvimento da planta (Sidenius *et al.*, 1995). Estes inibidores interagem com as α -amilases através de pontes de hidrogênio e forças de Van Der Waals, próximas ao sítio catalítico da enzima.

O inibidor de α -amilase de cevada apresentou a maior similaridade com os inibidores de trigo, sendo capaz de inibir a α -amilase de *T. molitor* como mostrado por Barber *et al.* (1989). Devido às diversas semelhanças entre a seqüência primária da α -amilase de *T. molitor* e a α -amilase de *Z. subfasciatus*, o inibidor de cevada deve inibir ZSA. Além dos resíduos identificados como importantes na formação do complexo ZSA:0.19, os resíduos Pro 4, Trp 5 e Met 6 são conservados na região amino terminal . Além disso, os resíduos Arg 54 e Cys 55, situados próximo a região de interação hidrofóbica entre a enzima e o inibidor estão presentes garantindo a estrutura da molécula. Porém, a adição de um resíduo de asparagina entre a posição 49-50 do inibidor de trigo,

além da mudança do resíduo His 48 por Arginina podem interferir na interação. Apesar de não possuir carga líquida, este aminoácido é fortemente polar podendo levar ao afastamento entre os aminoácidos apolares Trp 49 do inibidor e Trp 76 da α -amilase. A presença de uma Tyr 118, no lugar de uma lisina não parece gerar qualquer impedimento da molécula de inibidor já que nenhuma interferência de cargas é formada.

Finalmente o inibidor 0.53, que possui 95% de identidade com o inibidor 0.19, apresenta, assim como o inibidor de cevada, uma modificação no resíduo His 46. Este resíduo é substituído por um resíduo de ácido aspártico podendo assim interferir nas interações hidrofóbicas entre as moléculas. Além disso, a presença de uma quantidade a mais de nove resíduos entre os aminoácidos His 66 e Gly 67 do inibidor 0.19, pode levar a mudanças nas interações entre os aminoácidos que formam o complexo enzima-inibidor. Porém, não é desprezada a possibilidade de interações desse inibidor com a enzima através da ligação com o sítio ativo da enzima, já que não há nenhum impedimento estérico para isso.

Os dados obtidos mostram o possível mecanismo que torna o inibidor 0.19 capaz de inibir uma gama de α -amilases, entre elas α -amilases de mamíferos e insetos. A presença de interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ponte salina promove uma maior força de interação, explicando sua forte capacidade de inibição. A dificuldade do inibidor 0.53 de fazer interações hidrofóbicas com α -amilases explica a diferença de especificidade e a incapacidade de inibir 100% a atividade da α -amilase pancreática, como também a α -amilase de *Diabrotica virgifera*.

Os inibidores de cereais 0.19, 0,53 e de cevada aqui estudados, são possíveis candidatos para o controle do desenvolvimento de larvas de *Z. subfasciatus*. Através de plantas transgênicas contendo o gene destes inibidores, sob o controle de um promotor de alta expressão, poderão ser produzidas sementes com resistencia ao ataque desta praga. Além do benefício na produção agrícola, culturas transgênicas codificando proteínas inseticidas apresentam um benefício potencial para o ambiente, pela diminuição no uso de pesticidas. A estratégia do uso de inibidor de α -amilase no controle de pragas, já foi utilizada com sucesso no controle do ataque de carunchos dos velho mundo *Bruchus pisorum*, *C. maculatus* e *C. chinensis*. Sementes de ervilha expressando o inibidor de feijão α AI1, em concentrações de 0,8-1% promovem a mortalidade das larvas no 1^o ou 2^o instar de desenvolvimento (Shade *et al.*, 1994, Schroeder *et al.*, 1995). Os inibidores 0.19, 0.53 e o inibidor de cevada apresentam, portanto uma boa alternativa do controle não somente do desenvolvimento de *Z. subfasciatus*, como também de diversos outros carunchos predadores de sementes.

7. Conclusões

O conjunto dos dados e resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- Existe uma alta similaridade entre as α -amilases dos insetos *Z. subfasciatus*, *C. chinensis*, *D. virgifera*, *D. melanogaster*, *P. chocleariae* e *T. castaneum*, chegando próximo aos 60%.
- Os inibidores de α -amilases de cereais apresentam de uma maneira geral, uma baixa siliaridade.
- A análise de estequiometria de inibição da α -amilase de *Z. subfasciatus* pela α -amilase de trigo 0.19 apresenta-se em uma relação de 1:1.
- Os inibidores 0.53 e o inibidor de cevada apresentaram maior similaridade nas regiões responsáveis pela interação com a α -amilase de *Z. subfasciatus*.
- O inibidor de trigo 0.19 interage com a enzima a partir de interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ponte salina envolvendo os resíduos Ser 2, Gly 3, His 48, Glu 51, Trp 52, Cys 53, Tyr 66, Asp 98, Ala 99, Ser 100, Gly 101 e Lys 108, do inibiidor e os resíduos Glu 71, Trp 76, Arg 78, Asn 156, Tyr158, Arg 202, Asp204, His304, Asp 349, Lys 351 e Gln352 da α -amilase de *Z. subfasciatus*.
- Os inibidores de trigo 0.19 e 0.53 além do inibidor de cevada apresentam um grande potencial para o uso na transformação de sementes com o objetivo de controle do desenvolvimento de *Z. subfasciatus*.

8. Bibliografia

- 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*). Biochimica et Biophysica. Acta vol. 913, p. 260-266, 1989.
- Barber D; Sanchez-Monge R; Gomez L; Carpizo J; Armentia A; Lopez-Otin C; Juan F; Salcedo G. A barley flour inhibitor of insect alpha-amylase is a major allergen associated with baker's asthma disease. FEBS Letters.vol. 248 n. (1-2), p.119-122, 1989.
- Beebe S. E. & Pastor-Corrales, M. A. Breeding for Disease Resistance. In: Common Bean: Research for Crop Improvement. (Van Schoonhoven, A. & Voysest, O. eds.) CIAT, Cali , Colombia, p7-53, 1991.
- Bernfeld, P. Amylase α and β . In: Methods in Enzimology, 1995 Colowick S. P. & Kaplan N.O. (Eds). Vol 1 Academic Press, Nova Iorque.
- Bloch C. Jr, & Richardson M.A New Family of Small (5 kDa) Protein Inhibitors of Insect Alpha-amylases From Seeds or Sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have Sequence Homologies with Wheat gamma-purothionins. FEBS Letters. Vol 279, p. 101-104. 1991.
- Bompard-Gilles, C.; Rousseau, P.; Rougé , P.; Payan, F. Substrate Mimicry in the Active Centre of a Mammalian α -amylase: Structural Analysis of an Enzyme Inhibitor Complex. Structure, vol. 4, p 1441-1452, 1996.

- Bressani, R. Grain Quality of Common Beans. Food Reviews International. vol. 9 p. 235-297, 1993.
- Buonocore, V.; Silano, V. Biochemical, Nutritional and Toxicological Aspects of Alpha-amylase Inhibitors From Plant Foods. Advances of Experimental Medicine and Biology. Vol.199, pp.483-507, 1986.
- Carlson, G. L. A Bean α -amylase Inhibitor Formulation (Starch Blocker) Is ineffective in Man. Science, vol, 219, p. 393- 395, 1983.
- CENPAF-EMBRAPA, A Cultura do Feijoeiro. Embrapa Arroz e Feijão. <http://www.cnpaf.embrapa.br/>. 2000-2002.
- Chrispells, M. J. Trasfer of Bruchid Resistence From Common Bean To The Starchy Grain Legume by Genetic Engineering With The α -amylase Inhibitor Gene. In: Carozzi,N. & Koziel, M. (Ed.) Transgenic Plants for The control old Insect Pests. Taylor & francis Publishers, 1996.
- Da Siva,M. C.M.; Grossi de Sá, M.F.; Chrispeels, M. J. ;Togawa, Neshich, G. Analysis of Structural and Physico-chemical Parameters Involved in Specificity of Binding Between α -Amylase and Their Inhibitors. Protein Engeneering, Vol. 13, p. 167-177, 2000.
- Evans, R.J. & Bauer, D. H. Studies odf The Poor Utilization by The Rat of Methionine and Cysteine in Heat Dry Bean Seed (*Phaseolus Vulgaris*). Journal of Agricultural an Food Chemistry, vol. 26, p 779-784, 1978.
- Feng G.; Chen, M.; Kramer, K. J. Reeck, G. R. Reversed-phase High-Performance Liquid Chromatographic Separation of wheat

- proteinaceous inhibitors of insect and mammalian α -amylase. Cereal Chemistry, Vol. 68, p. 95-99, 1991.
- 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, Vol 26, n. 5, p. 419-426, 1996.
- Finardi-Filho, F.; Mirkov, T. E.; Chrispeels, M.J. A Putative Precursor Protein in the Evolution of the Bean α -amylase Inhibitor. Phytochemistry, 43: 57-62, 1996.
- Franco, O.L.; Rigden, D.J.; Melo, F.R.; Bloch Jr, C.; Silva, C.P.; Grossi de Sa, M.F. Activity of Wheat α -Amylase Inhibitors Towards Bruchid α -Amylases and Structural Explanation of Observed Specificities. European Journal of Biochemistry. vol. 267, N. 8, p. 1466-1473, 2000.
- Franco O.L.; Rigden, D.J.; Melo, F.R.; Grossi-De-Sa, M.F. Plant Alpha-amylase Inhibitors and Their Interaction With Insect Alpha-amylases. European Journal of Biochemistry. Vol. 2, pp.397-412,2002.
- 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, vol. 224, p. 525-531,1994.
- Gatehouse, A.M.R. & Gatehouse, J.A. Identifying Proteins with Insecticidal Activity: Use of Encoding Genes to Produce Insect-Resistant Transgenic Crops. Pesticide Science, vol. 52, pp. 165-175, 1998.

- Gatehouse, A. M. R. & Hilder, U. A. Genetic Manipulation of Crops for Insect Resistance. In Marshall, G. & Walters, D. R. Molecular Perspectives: Crops Protection. p. 177-201, 1994.
- Gatehouse, A. M. R.; Dobie, P.; Hoges, R. J.; Meik, J.; Puztai, A.; Boutler d., Role of Carbohydrates in Insect Resistance in *Phaseolus vulgaris*. Journal of Insect Physiology, vol. 33, p. 943-950, 1987.
- Gatehouse, J.A.; Gilroy, J.; Hoque, M.S.; Croy, R. R. Purification, Properties and Amino Acid Sequence of a low-Mr Abundant Seed Protein From Pea (*Pisum sativum* L.), The Biochemical Journal, vol. 225, n. 1, p. 239-247, 1985
- Gepts, P. & Debouck, D. Origin, Domestication and Evolution Of The Comon Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in: Van Schoonhoven, A. & Voysest, O. (Ed.) , Common Bean: Research for Crop Improvement. CIAT, Cali , Colombia, p.7-53, 1991.
- Gepts, P. A Middle American and Andean Common Bean Pool. In: Gepts , P. (Ed.) Genetic Resources of Phaseolus Bean. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands, p. 375-390, 1988.
- Gepts, P. Osborn, T. C.; Rashka, K.; Bliss, F. A. Phaseolin Protein variability in Wild Forms and Landraces of The Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) Evidence for Multiple Centers of Domestication. Economical Botany, vol 40, p. 451-468, 1986.
- Gilles, C.; Astier, J. P.; Marchis-Mouren, G.; Cambillau, C.; Payan, F. Crystal Structure of Pig Pancreatic α -amylase Isoenzyme II, in Complex With the Carbohydrate Inhibitor Acarbose. European Journal of Biochemistry. Vol. 238, p. 561-569, 1996.

- Giri, A.P. & Kachole, M.V. Amylase Inhibitors of Pigeonpea (*Cajanus cajan*) Seeds. Phytochemistry, vol. 47, p. 197-202, 1998.
- Grahan, P. H. & Renali, P. Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Field Crops Research, vol 53, p. 131-146, 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. Vol. 27, p. 271-281, 1997.
- Guex, N. & Peitsch, M.C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. Electrophoresis. Vol.18, p. 2714-2723, 1997.
- Hemberg T. & Larsson I., Inhibitor Beta Complex From Resting Potato Tubers as an Inhibitor of α -amylase. Physiologia Plantarum, vol. 14: n. 4, p. 861- 870, 1961.
- Higgins D.; Thompson J.; Gibson T.; Thompson J.D., Higgins D.G.; Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressively multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research. Vol. 22, pp. 4673-4680, 1994.
- Ho, M.F. Naturally Occurring α -Amylase Inhibitors: Structure/Function Relationships. In: Protein Structure-Function Relationships in Foods. Yada, R.Y. (ed.). Blackie Academic, New York, 1994.
- Iguti, A. & Lajolo F.M. Occurrence and Purification of α -Amilase Isoinhibitors in Bean (*Phaseolus vulgaris*) Varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 39, p.122-126, 1991.

- Ishimoto, M. & Chrispeels, M. J. Protective Mechanism of the Mexican Bean Weevil Against High Levels of α -amylase Inhibitor in the Common Bean. Plant Physiology. vol. 111, 393-401, 1996.
- Ishimoto, M.; Sato, T.; Chrispeels, M. J.; Kitamura, K. Bruchid Resistance of Transgenic Azuki Bean Expressing Seed α -Amylase Inhibitor of Common Bean. Entomological Experimental Applied. vol. 79, p. 309-315, 1996.
- Iulek, J.; Franco, O.L.; Silva, M.; Slivinski, C.T.; Bloch, C., Jr; Rigden, D.J.; Grossi de Sá, M.F. Purification, Biochemical Characterisation and Partial Primary Structure of a New α -Amylase Inhibitor from *Secale cereale* (Rye). International Journal of Biochemistry and Cell Physiology. vol. 32, p. 1195-1204, 2000.
- Johnson, C. D. & Siemens, D. H. Oviposition Behavior, Guilds, Distribution and New Host Records for Genus *Mimosestes bridwell* (Coleoptera: Bruchidae) from Colombia, Ecuador, Venezuela and Mexico. The Coleopterists bulletin, vol. 50, n.2, p. 155-160, 1996.
- Jones, S. & Thornton, J.M. Principles of Protein-Protein Interactions Derived From Structural Studies. Proceedings of The National Academy of Science (U.S.A). Vol. 93 p.13-20, 1996.
- Jones, S. & Thornton, J.M. Protein-Protein Interactions: A Review of Protein Dimer Structures In: Progress in Biophysics and Molecular Biology. Vol. 63 p31-165, 1995.
- Jongsma, M. A. & Bolter C. The adaptation Of Insects to Plant Protease Inhibitor. Journal of Insect Physiology, vol. 43, p. 885-895, 1997.

- Kamitori, S.; Kondo, S.; Okuyama, K.; Yokota, T.; Shimura, Y.; Tonozuka, T.; Sakano, Y. (1999) Crystal Structure of Termomycetozyma Vulgaris R-47 α -amylase II (TVA II) Hydrolyzing Cyclodextrins and Pullulan at 2.6 Å resolution. Journal of Molecular Biology, vol. 287, p. 907-921, 1999.
- Kaplan, L. Archeology and Domestication in American *Phaseolus vulgaris*. Economical Botany, p. 358-368, 1965.
- 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 of Biochemistry, vol. 120, p. 177-183, 1996.
- Kim, M. J.; Lee, S. B.; Lee, H. B.; Lee, S. Y.; Baek, J. S.; Kim, D.; Moon, T.W.; Robyt, J. F.; Park, K.H. Comparative Study of the Inhibition of α -Glucosidase, α -Amylase, and Cyclomaltodextrin Glucanotransferase by Acarbose, Iso-acarbose, and Acarviosine-glucose. Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 371, p. 277-283, 1999.
- Kondo, H.; Nakatani, H.; Hiromi, K. (1990) *In vitro* Action of Human and Porcine α -Amylase on Cyclomalto-oligosaccharides. Carbohydrate Research. Vol. 204, p. 207-213, 1990.
- Kopitar G.; Dolinar M.; Strukelj B.; Pungercar J.; Turk V. Folding and Activation of Human Procathepsin S From Inclusion Bodies Produced in *Escherichia coli*. European Journal of Biochemistry. vol 236, n.2 p. 558-562, 1996.
- Kornegay, J. & Cardona, C. Breeding for Insect Resistance in Bean. In: Van Schoonhoven, A. & Voysest, O. (Ed.) , Common Bean:

- Research for Crop Improvement. CIAT, Cali , Colombia, p7-53, 1991.
- Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins During The Assembly of Head of Bacteriophage T4. Nature. Vol. 227, pp. 680-685, 1970.
- Lajolo, F. M.; Genovese, M. I.; Menezes, E. W. Qualidade Nutricional. In: Cultura do Feijoeiro Comum no Brasil. Araújo, R. S.; RAVA, C. A.; STONE, L. F.; Zimmermann, M. J. O. (Coord.) Associação Brasileira Para pesquisa da Potassa e do Fosfato, Piracicaba, São Paulo, Brasil, p. 23-56, 1996.
- Lankisch P.G. Acute Postprandial Gastrointestinal and Metabolic Effects of Wheat Amylase inhibitor (WAI) in Normal, Obese, and Diabetic Humans. Pancreas, 17; 176-181, 1998.
- Larson, S. B.; Greenwood, A.; Cascio, D.; Day, J.; McPherson, A. Refined Molecular Structure of Pig Pancreatic α -amylase at 2.1 Å Resolution. Journal of Molecular Biology, vol. 231, p. 1560-1584, 1994.
- Layer, P.; Carlson G. L.; DiMagno, E. P. Partially Purified White Bean, Amylase Inhibitor Reduces Starch Digestion *in vitro* and Inactivates Intoduodenal Amylase in Humans. Gastroenterology, vol 88, p. 1895-1902, 1985.
- Le Berre-Anton, V.; Nahoum, V.; Payan, F.; Rougé, P. Molecular Basis for the Specific Binding of Different α -Amylase Inhibitors from *Phaseolus vulgaris* Seeds to The Active Site of α -Amylase. Plant Physiology and Biochemistry, vol. 38, p. 657-665, 2000.
- Lehninger, A.L.; Nelson, D.L.; Cox M. M. Princípios de Bioquímica, Segunda Edição, Sarvier, São Paulo, 1995.

- Liener I.E.; Danatucci, D. A.; Tareza, J. C. Starch Blockers: A Potential Source Of Trypsin Inhibitors And Lectins. American Journal of Clinical Nutrition, vol. 39, p. 196-200, 1984.
- Magalhães, C.P.; Xavier-Filho, J.; Campos, F.A.P. Biochemical basis of the toxicity of manipueira (liquid extract of cassava roots) to nematodes and insects. Phytochemical Analysis. vol. 11, n. 1, p.57-60, 2000.
- Marshall, J.J. & Lauda, C.M. (1975) Purification and Properties of Phaseolamin, an Inhibitor of α -amylase, From the Kidney Bean, *Phaseolus vulgaris*. Journal of Biological Chemistry, vol. 250, p. 8030-8037, 1975.
- Mattoo A.K. & Modi V.V. Partial Purification and Properties of Enzyme Inhibitors from *Unripe mangoes*. Enzymologia vol. 39 n. 4, p. 237-47, 1970.
- Melo, F.R.; Sales, M.P.; Silva, L.S.; Franco, O.L.; Bloch C. Jr; Ary, M.B. α -Amylase from cowpea seeds. Protein and Peptides Letters, vol. 6, p. 387-392, 1999.
- Mirkov, T.E.; Whalstrom, J.M.; Hagiwara, K.; Finardi-Filho, F.; Kjemtrup, S.; Chrispeels, M.J. Evolutionary Relationships Among Proteins in the Phytohemagglutinin-arcelin α -amylase Inhibitor Family of the Common Bean and its Relatives. Plant Molecular Biology. vol. 26, p. 1103-1113, 1994.
- Morton, R.L.; Schroeder, H.E.; Bateman, K.S.; Chrispeels, M.J.; Armstrong, E.; Higgins, T.J.V. Bean alpha-amylase Inhibitor 1 in Transgenic Peas (*Pisum sativum*) Provides Complete Protection from Pea Weevil (*Bruchus pisorum*). Proceeds of National Academic Science USA 97, vol.8, pp.3820-3825, 2000.

- Oda, Y.; Matsunaga, T.; Fukuyama, K. Miyasaki, T.; Morimoto, J. T. Tertiary and Quaternary Structures of 0.19 α -Amylase Inhibitor from Wheat Kernels Determined by X-ray Analysis at 2.06 Å Resolution. Biochemistry, vol. 36, p.p. 13505-14511, 1997.
- Page, R. D. M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences. Vol. 12, pp. 357-358, 1996.
- Pereira, P. J. B.; Lozanov, V. Patthy, A., Huber, R.; Bode, W. Pongor, S. Strobl, S. Specific Inhibition of Insect α -amylases: Yellow Meal Worm α -amylase inhibitor at 2.0Å resolution. Structure, Vol. 7, N. 9, p.1079-1088, 1999.
- Prathibha, S.; Nambisan, B.; Leelamma, S. Enzyme Inhibitors in Tuber Crops and Their Thermal Stability. Plant Foods for Human Nutrition, vol. 3, pp.247-257,1995.
- Pueyo, J.J.; Hunt, D.C.; Chrispeels, M.J. Activation of Bean (*Phaseolus vulgaris*) α -amylase Inhibitor Requires Proteolytic Processing of The Pro-protein. Plant Physiology, vol.101, p. 1341-1348,1993.
- Richardson, M. Seeds Storage Proteins. The Enzyme Inhibitors. Methods in Plant Biochemistry, vol 5, p 260-304, 1991.
- Ryan, C.A. Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. Annual Review of Phytopathology. vol. 28, p. 425-449, 1990.
- Sathe, S. K. Deshpande, S. S. ; Salunkhe, D.K. Dry Bean of *Phaseolus*. A review. Part 2. Chemical Composition: Carbohydrates, Fiber, Minerals, Vitamins and Lipids. Critical

- Review In Food Science and Nutrition, Cleveland, vol. 21, p. 41-91, 1984.
- Sathe, S. K.; Deshpande, S. S.; Salunkhe, D.K. Dry Bean of Phaseolus. A review. Part 1. Chemical Composition: Proteins. Review In Food Science and Nutrition, Cleveland, vol. 21, p. 41-91, 1984.
- Schroeder, H. E.; Gollash, S.; Moore, A.; Tabe, L. M.; Craig, S.; Hardie, D.; Chrispeels, M. J.; Spencer, D.; Higgins, T. J. V. Bean α -amylase Inhibitor Confers Resistance to the Pea Weevil, *Bruchus pisorum*, in Genetically Engineered Peas (*Pisum sativum* L.). Plant Physiology, vol. 107, 1233-1239, 1995.
- Seltzer R. D. & Sturmeyer D. H. Purification and Characterization of Esculentamin, a Proteinaceous α -amylase Inhibitor from the Faro Root, *Colocasia esculenta*. Jornal of Food Biochemistry, p. 199-217, 1990.
- Shade, R. E.; Schroeder, H. E.; Pueyo, J. J.; Tabe, L. L.; Murdock, T. J. V.; Higgins, M. J.; Chrispeels, M.J. Transgenic Pea Seeds Expressing The α -amylase Inhibitor of The Common Bean are Resistant to Bruchid Beetles. Biology and Technology, vol. 12, p.p.793-796, 1994.
- Sharma K.K. & Pattabiraman T.N. Purification of porcine pancreatic amylase by affinity chromatography with amylase inhibitor of *Dioscorea alata* immobilized on DE AE-cellulose. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics, vol.1: pp.54-56, 1982.
- Sharma K. K. & Pattabiraman T. Natural Plant Enzyme Inhibitors. Isolation and Characterization of Two α -amylase Inhibitors from *Colocasia antiquorum* Tubers. Journal of the Science Food Agriculture, vol. 31: p. 981-991, 1980.

- Shivaraj, B; Sharma, K.K.; Pattabiraman, T.N. Natural Plant Enzyme Inhibitors: Part VII-Alpha Amylase Inhibitors & Amylases in Plant Tubers. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. vol.16, n. 2, p.52-55, 1979.
- Sidenius, U. Olsen, K. Svensson, B. Christensen, U. Stopped-Flow Kinetic Studies of the Reaction Barley α -amylase/ subtilisin Inhibitor and the High pI Barley α -amylase. FEBS letters, Vol. 361, p. 250-254, 1995.
- Silano, V. α -Amylase Inhibitors. In: Enzymes and Their Role in Cereal Technology (Kruger, J. & Lineback, D., eds), p. 141-199. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, 1987.
- Silva, C. P.; Terra, W. R.; Xavier-Filho, J; Grossi de Sá , M. F.; Isejima, E. M.; Da matta, R. A. Miguens, F. C.; Bifano, T. D. Digestion of Legume Starch Granules by Larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: bruchidade) and Induction of α -amilases in Response to Different Diets. Insect Biochemistry and Molecular Biology, vol. 31 p. 41-50, 2001.
- Silva, C.P. & Xavier-Filho, J Comparison between the levels of aspartic and cysteine proteinases of the larval midgut of *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Zabrotes subfasciatus* (Boh.)(Coleoptera:Bruchidae), Compared Biochemistry and Physiology. vol. 99B, p. 529-535 1991.
- 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 Biochemlstry and Molecular Biology. vol. 29, p. 355-366, 1999.

- Strobl, S.; Mühlhahn, P.; Bernstein, R; Wiltscheck, R.; Maskos, K. Wunderlich, M.; Huber R.; Glockshuber, R.; Holak, T.A. Determination of the Three Dimensional Structure of the Bifunctional α -amylase/ trypsin inhibitor from Ragi Seeds by NMR Spectroscopy. Biochemistry, Vol. 34, p. 8281-8293, 1995.
- Suetsugu, N.; Koyama, S.; Takeo, K.; Kuge, T. Kinetic Studies on the Hydrolases of α -, β - and χ -cyclodextrins by Taka-amylase. American Journal of Biochemistry, vol. 76, p. 57-63, 1974..
- Takase, K. Site-Directed Mutagenesis Reveals Critical Importance of The Catalytic Site in The Binding of α -amylase by Wheat Proteinaceous Inhibitor. Biochemistry, Vol. 33, p. 7925-7930, 1994.
- Taleskar, N. S. Biology Damage and Control of Bruchid pests of Mungbean. In: Shanmugasundaram, S. & McLean, B. T. (Ed.) Mungbean: Proceedings of The Second International Symposium. Bangkok, Thailand, p. 16-20, 1987.
- Tarashima, M. & Kator, S. Modification of α -amylase function by Protein Engineering. Annual New York Academic Science, vol. 779, p. 65-69, 1996.
- Titarenko, E. & Chrispeels, M.J. cDNA cloning, Biochemical Characterization and inhibition by Plant inhibitors of the α -amylases of the Western Corn Rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*. Insect Biochemistry and Molecular Biology, Vol 30, p.979-990, 2000.
- Van Gunsteren, W.F.. Biomolecular Simulation: The Gromos96 Manual and User Guide. Hochschulverlag, Zürich, 1996.
- Wolever, T. M. S.; Chan, C.; Law, C. bird, L.; Ramdath, D.; Moran J. J.; Jenkins J. A. The in Vitro and In Vivo Anti-amylase Activity

of Starch Blockers. Jornal of Plant Food, vol. 5, p.p. 23-30, 1983.

Zemke, K.J.; Müller-Fahrnow, A.; Jany, K.D.; Pal, G.P.; Saenger, W. The Three Dimensional Structure of Bifunctional Protease K/ α -amylase inhibitor from Wheat (PK13) at 2.5 Å resolution. FEBS Letters, Vol. 279, p. 240-242, 1991.