



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOQUÍMICA

Theo Cardozo Brascher

Isolamento e caracterização parcial de um inibidor de α -amilase das sementes de *Phaseolus lunatus* e sua relação com a indução de α -amilases nas larvas de *Zabrotes subfasciatus*

Florianópolis

2020

Theo Cardozo Brascher

Isolamento e caracterização parcial de um inibidor de α -amilase das sementes de *Phaseolus lunatus* e sua relação com a indução de α -amilases nas larvas de *Zabrotes subfasciatus*

Dissertação submetida ao Programa de pós graduação em bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em bioquímica.
Orientador: Prof. Dr. Carlos Peres Silva

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cardozo Brascher, Theo

Isolamento e caracterização parcial de um inibidor de α -amilase das sementes de *Phaseolus lunatus* e sua relação com a indução de α -amilases nas larvas de *Zabrotes subfasciatus* / Theo Cardozo Brascher ; orientador, Carlos Peres Silva, 2020.

56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. *Phaseolus vulgaris*. 3. Indução de enzimas digestivas. 4. Digestão de insetos. I. Peres Silva, Carlos . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Theo Cardozo Brascher

Título: Isolamento e caracterização parcial de um inibidor de α -amilase das sementes de *Phaseolus lunatus* e sua relação com a indução de α -amilases nas larvas de *Zabrotes subfasciatus*

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Dr.(a), José Henrique M. Oliveira
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.(a) Dr.(a), Alcir Luiz Dafre
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Bioquímica.

Prof.(a) Dr.(a), Ariane Zamoner Pacheco De Souza
Coordenador(a) do Programa

Prof., Dr. Carlos Peres Silva
Orientador

Florianópolis, 2020

Este trabalho é dedicado a todos meus amigos e aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a toda minha família que me proporcionou todo tipo de ajuda durante o mestrado. Especialmente para meu pai José Brascher, minha mãe Sandra Brascher, minha avó Ione Cardozo e minha irmã Thaís Brascher, pessoas que foram sempre o meu porto seguro, que sempre me ensinaram e que me proporcionaram ser a pessoa que sou hoje.

A todos os meus amigos que me ajudaram de alguma forma nesse mestrado. Quero deixar um agradecimento especial para Leonardo Kretzer, Gabriela Gubert, Fabíola Eckert e Maria Eduarda Borges, amigos do curso de Biologia, que sempre estiveram presentes, me proporcionando momentos felizes e todo tipo de apoio, que recordarei para sempre.

Agradecer aos meus colegas de laboratório, que sempre me ajudaram nas atividades acadêmicas, nas práticas laboratoriais e nos vários momentos de descontração.

Um agradecimento especial a minha namorada Bruna Polmann que me ajudou muito em todos os momentos vividos durante o mestrado, serei eternamente grato pela paciência e por ter sido meu porto seguro.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Peres Silva serei eternamente grato por sempre ter a paciência para me passar todo tipo de conhecimento, que me fez crescer muito profissionalmente.

Agradecer a banca e aos suplentes por aceitarem o convite para avaliar este trabalho. Todos são profissionais que admiro e que me espelho para meu futuro profissional.

Agradecer a CAPES, ao instituto nacional de ciência e tecnologia em entomologia molecular (INCT-EM) e ao conselho nacional de desenvolvimento científico e tecnológico (CAPES), que foram órgãos financiadores do projeto por ter concedido suporte ao nosso laboratório e a este projeto de pesquisa. Assim como, ao laboratório de biologia molecular e biotecnologia de leveduras e ao laboratório de defesas celulares que além de dividir o espaço de trabalho também ofereceu suporte a este projeto. Por fim, agradecer ao centro de biologia molecular estrutural (CEBIME) por conceder equipamentos e apoio a este projeto de pesquisa.

Esquecemos que tudo que foi criado por seres humanos também pode ser refeito por nós. (SOUZA jessé, 2019)

RESUMO

O caruncho *Zabrotes subfasciatus* tem grande impacto econômico uma vez que infesta três das principais espécies de leguminosas cultivadas no Brasil, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*. Eficientes mecanismos de defesa, que não sejam danosos ao meio ambiente e para os humanos e que repelem ou intoxicam estes insetos, podem ser encontrados em substâncias químicas das próprias plantas. Inibidores de α -amilase 1 (α -AI-1), presentes em sementes de *P. vulgaris*, são eficazes contra bruquídeos do Velho Mundo como *Callosobruchus chinensis* e *Callosobruchus maculatus*, porém, ineficazes contra *Z. subfasciatus*. Estes toleram a presença do α -AI-1 por terem a capacidade de modular a expressão de suas enzimas digestivas. O contato com o α -AI-1 promove a expressão e secreção de duas isoformas de α -amilase, sendo estas insensíveis à presença deste inibidor de α -amilase quando comparada com a isoforma constitutiva. Curiosamente, esta indução também foi observada quando estes insetos foram cultivados em sementes de *P. lunatus*, onde não há presença de inibidores de α -amilase ativos ou de atividade inibitória de α -amilase. No entanto, em sementes *P. lunatus* contém proteínas similares ao α AI de *P. vulgaris*, posteriormente intituladas de sequências que são relacionadas aos α -AI (“ α -amylase inhibitor like” - AIL). Neste trabalho foram explorados os motivos pelo quais as larvas de *Z. subfasciatus* promovem a indução de isoformas de α -amilases quando cultivados em sementes de *P. lunatus*. Exploramos a possibilidade de presença de atividade inibitória de α -amilase nas sementes de *P. lunatus* o que explicariam este evento. No presente trabalho, foi confirmada a presença de indução das duas isoformas de α -amilase quando as larvas de *Z. subfasciatus* são cultivadas e alimentadas pelas sementes de *P. lunatus*, que não contem a presença do α -AI-1. Também foram identificadas a presença de um inibidor de α -amilase nas sementes de *P. lunatus* que demonstram serem semelhantes ao α -AI-1 de *P. vulgaris* em relação à parâmetros moleculares e cinéticos. Podendo este ser o principal responsável por promover a modulação de amilases digestivas nas larvas de *Z. subfasciatus*. A caracterização do inibidor de *P. lunatus*, pode trazer novas informações em torno da evolução do locus gênico APA dentro do gênero *Phaseolus*. Não obstante, também aumentar o número de proteínas potencialmente tóxicas de plantas que podem ser usadas em plantas de interesse econômico que são alvos de insetos praga.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Indução de enzimas digestivas. Digestão de insetos.

ABSTRACT

The Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus* has a major economic impact as it infests three of the main legume species grown in Brazil, *Phaseolus lunatus*, *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata*. Effective defense mechanisms that are not harmful to the environment and humans and that repel or poison these insects can be found in the chemicals of the plants themselves. α -Amylase inhibitor 1 (α -AI-1), present in *P. vulgaris* seeds, has been shown to be extremely effective against Old World bruchids such as *Callosobruchus chinensis* and *Callosobruchus maculatus*, but ineffective against *Z. subfasciatus*. It tolerates the presence of α -AI-1 because it has the ability to modulate the expression of their digestive enzymes. The contact with α -AI-1 promotes the expression and secretion of two α -amylase isoforms, which are insensitive to the presence of this α -amylase inhibitor when compared to the constitutive isoform. Interestingly, this induction was also observed when these insects were cultivated in *P. lunatus* seeds, where there is no report of presence of active α -amylase inhibitors or α -amylase inhibitor activity. However, in *P. lunatus* seeds it contains proteins similar to the α AI of *P. vulgaris*, later called α -amylase inhibitor like sequences (AIL). In this work the reasons why *Z. subfasciatus* larvae promote the induction of α -amylase isoforms when cultivated in seeds of *P. lunatus* were explored. We explored the possibility of presence of α -amylase inhibitor activity in *P. lunatus* seeds, which could explain this event. In this work, the presence of the two α -amylase isoforms induction was confirmed when the larvae of *Z. subfasciatus* are cultivated and fed by the seeds of *P. lunatus*, which does not contain the presence of α -AI-1. The presence of an α -amylase inhibitor in the seeds of *P. lunatus* has also been identified, demonstrating to be similar to α -AI-1 of *P. vulgaris* in relation to molecular and kinetics parameters. This may be the main responsible for promoting the modulation of digestive α -amylases in *Z. subfasciatus* larvae. The complete characterization of the inhibitor of *P. lunatus* seeds may bring new information about the evolution of the APA gene locus within the *Phaseolus* genus. However, it also increases the number of potentially toxic plant proteins that can be used in plants of economic interest that are targets of pest insects.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Induction of digestive enzymes. Insect digestion.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Grãos de feijão mais cultivados no Brasil. A - Feijão de corda ou caupi (*Vigna unguiculata*); B - Feijão comum (*Phaseolus vulgaris*); C – Feijão lima (*Phaseolus lunatus*). Barra de tamanho corresponde a 1 centímetro.17
- Figura 2:** Adultos de *Zabrotes subfasciatus*. Barra de tamanho 0,1 centímetro.19
- Figura 3:** Ciclo de vida de *Zabrotes subfasciatus* crescidos em grãos de *Vigna unguiculata*. Os números entre parênteses representam os dias de desenvolvimento após a ovoposição. Barra de tamanho 0,1 centímetro.20
- Figura 4:** Danos ocasionados pela infestação de *Zabrotes subfasciatus* em sementes de *Vigna unguiculata*. Barra de tamanho 1 centímetro.21
- Figura 5:** Atividade de α -amilase digestiva *in vitro* das larvas de *Z. subfasciatus* crescidas no interior de sementes de *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus* e *P. vulgaris*. A- representação da atividade relativa a quantidade de proteína. B – Atividade representada por animal. Estes dados são médias representativas da repetição de três experimentos independentes contendo 10 insetos cada.34
- Figura 6:** Padrão de atividade de α -amilases digestivas das lavas de *Z. subfasciatus* em 4º instar de desenvolvimento dentro das sementes de *V. unguiculata*, *P. lunatus* e *P. vulgaris*. Foi aplicado um equivalente de 0,5 animal por raia. Após a migração eletroforética e renaturação das proteínas, as atividades foram analisadas. Z1 e Z2 indicam a duas isoformas induzidas de α -amilase. Z3 mostra a isoforma constitutiva da α -amilase.35
- Figura 7:** Atividade de α -amilase digestiva *in vitro* das larvas de *Z. subfasciatus* submetidas a pulsos alimentares com farinhas dos feijões de *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus* e *P. vulgaris*. Vc - Larvas cujo desenvolvimento ocorreu em sementes de *V. unguiculata*; Pc - Larvas cujo desenvolvimento ocorreu em sementes de *P. vulgaris*. A- Representação da atividade específica. B – Representação de atividade por animal. Estes dados são médias representativas da repetição de quatro experimentos independentes contendo 10 insetos cada.....37
- Figura 8:** Gel SDS-PAGE 7,5% do padrão de atividade de α -amilases digestivas das lavas de *Z. subfasciatus* em 4º instar de desenvolvimento após um pulso alimentar de 48h com farinhas

de *V. unguiculata* (raia 2), *P. lunatus* (raia 3) e *P. vulgaris* (raia 4). Foi aplicado um equivalente de 0.5 animal por raia. Após a migração eletroforética e renaturação das proteínas, as atividades foram analisadas. Vc - Larvas cujo desenvolvimento ocorreu em sementes de *V. unguiculata*; Pc - Larvas cujo desenvolvimento ocorreu em sementes de *P. vulgaris*. Z1 e Z2 indicam a duas isoformas induzidas de α -amilase. Z3 mostra a isoforma constitutiva da α -amilase.38

Figura 9: Cromatografia de troca iônica para presença de inibidores de α -amilases a partir dos extratos das sementes de *P. lunatus* (A) e *P. vulgaris* (B). Aplicado extrato proteico total dos feijões em coluna RESOURCE™ Q equilibrada com tampão imidazol 10 mM, pH 6,7. A coluna primeiramente foi lavada com 5 mL de tampão de equilíbrio e depois eluída num gradiente linear de NaCl 0-800 mM em tampão imidazol em seguida por duas eluições isocráticas de NaCl 1 M e de tampão de equilíbrio. Fluxo seguiu em 1.0 mL.min⁻¹ sendo coletadas frações de 1 mL. Frações coletadas tiveram suas proteínas quantificadas e feitos ensaios de inibição com a PPA. Linhas tracejadas correspondem aos gradientes usados ao longo da cromatografia. Uma unidade de atividade inibitória (UAI) equivale a diminuição de metade da atividade de PPA sem a adição de fração. Estes dados são representativos da repetição de quatro experimentos independentes.40

Figura 10: Efeito do aumento de volume de QL e QV (A e B, respectivamente) sobre a atividade da PPA. Uma unidade de atividade inibitória (UAI) equivale a redução de metade da atividade de PPA sem a incorporação das frações em meio de reação. Cada valor é a média \pm DP de três experimentos independentes.42

Figura 11: Visualização do padrão de proteínas presentes em QL (A) e QV (B) em gel SDS-PAGE 13,5%, utilizando o corante azul brilhante de comassie para visualização das bandas. Foram aplicadas equivalentes de proteínas entre os extratos proteicos totais e as amostras. ET – Extratos proteico total das sementes de *P. lunatus* (A) e *P. vulgaris* (B). M – Marcador de peso molecular 10-250 kD.43

Figura 12: Cinética enzimática da atividade de PPA sob diferentes concentrações de QL (● - 0; ■ - 0,13; ▲ - 0,16; ▼ - 0,22; ◆ - 0,32 e ○ - 0,65 μ M) (A), QV (● - 0; ■ - 0,10; ▲ - 0,13; ▼ - 0,17; ◆ - 0,25 e ○ - 0,50 μ M) (B) e de amido solúvel em tampão acetato de sódio 250 mM, pH 5.5. Os dados foram calculados a partir da média \pm DP de quatros experimentos independentes.45

Figura 13: Parâmetros cinéticos da atividade inibitória de *QP. lunatus*. (A) Gráfico de Lineweaver-Burk da atividade de PPA e com diferentes concentrações de *QP. lunatus* (● - 0; ■ - 0,13; ▲ - 0,16; ▼ - 0,22; ◆ - 0,32 e ○ - 0,65 μ M) e de amido solúvel em tampão acetato

de sódio 250 mM, pH 5.5. (B) Ângulos extraídos do gráfico de Lineweaver-Burk com as diferentes concentrações do pool de *P. lunatus*. (C) Gráfico do inverso da diferença dos ângulos de inclinação com o inverso da concentração de *QP. lunatus*. Os ângulos foram calculados a partir da regressão linear usando a média \pm DP de quatros experimentos independentes.47

Figura 14: Parâmetros cinéticos da atividade inibitória de *QP. vulgaris*. (A) Gráfico de Lineweaver-Burk da atividade de PPA usando diferentes concentrações de amido solúvel (%) e de *QP. vulgaris* (● - 0; ■ - 0,10; ▲ - 0,13 ; ▼ - 0,17 ; ◆ - 0,25 e ○ - 0,50 μ M) (B) Ângulos extraídos do gráfico de Lineweaver-Burk com as diferentes concentrações do pool de *P. vulgaris*. (C) Gráfico do inverso da diferença dos ângulos de inclinação com o inverso da concentração de *QP. vulgaris*. Os ângulos foram calculados a partir da regressão linear usando a média \pm DP de quatros experimentos independentes.48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de Velocidade máxima e de Km a partir da cinética enzimática da atividade da PPA sob diferentes concentrações de QL . Os dados foram calculados a partir da média de quatros experimentos independentes.46

Tabela 2: Valores de Velocidade máxima e de Km a partir da cinética enzimática da atividade da PPA sob diferentes concentrações de QV . Os dados foram calculados a partir da média de quatros experimentos independentes.....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -AIs - Inibidores de α -amilase

α -AI-1 – Inibidor de α -amilase 1

AIL – proteínas semelhantes aos inibidores de α -amilase

APA – locus gênico advindo da abreviação de Fitohemaglutininas, arcelinas e inibidores de α -amilase

ARL - arcelinas

EI - Complexo enzima e inibidor

ESI - Complexo enzima substrato e inibidor

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Ki - Constante de inibição

Mr – Massa molecular relativa

PHA – fitohemaglutininas

PPA – Amilase pancreática suína

SDS -Dodecil sulfato de sódio

QL – Frações unidas dos picos de atividade inibitória advindos de *P. lunatus*

QV - Frações unidas dos picos de atividade inibitória advindos de *P. vulgaris*,

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Considerações iniciais	15
1.2	<i>Zabrotes subfasciatus</i> inseto praga de grãos da família fabaceae	18
1.3	<i>Zabrotes subfasciatus</i> e sua relação com proteínas de defesa intrínsecas de plantas	21
1.1.1	OBJETIVOS	26
1.1.2	Objetivo geral.....	26
1.1.3	Objetivos Específicos	26
2	MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1	Colônia de Insetos.....	27
2.2	Dissecação das larvas	27
2.3	Pulso alimentar	27
2.4	Ensaio enzimático (α -amilase)	28
2.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS	28
2.6	Extrato das sementes.....	30
2.7	Cromatografia de troca iônica	30
2.8	Ensaio de inibição de alfa-amilase a partir das frações das cromatografias de troca iônica	30
2.9	Cinética enzimática.....	32
2.10	Determinação de proteína	33
2.11	Análise estatística	33
3	RESULTADOS	33
3.1	Análise do padrão de amilases de <i>zabrotes subfasciatus</i> em sementes de <i>phaseolus lunatus</i>	33
3.2	Análise de presença de atividade inibitória de alfa-amilase nas sementes de <i>phaseolus lunatus</i>	39

4	DISCUSSÃO	49
5	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO, 2017; FAO, 2019) levanta que atualmente, mesmo com todos os esforços, não possuímos uma produção de alimentos suficiente para toda a população humana. Esse cenário se torna mais agravante dado ao constante aumento populacional ao longo dos anos, sendo que a previsão para 2050 a população mundial atinja 9,7 bilhões de pessoas (HORTON; STECKEL, 2013; FAO, 2019). Estima-se que há necessidade de aumento de 60% na produção de alimentos para que esta sustente a demanda populacional (FAO, 2019). Além disso, a gradual redução de terras disponíveis para o plantio e a diminuição da disponibilidade de água tendem a agravar este cenário (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; FAO, 2017; FAO, 2019). Prevendo isso, é essencial o descobrimento de novos conhecimentos biológicos e tecnológicos que propiciem um aumento da produção alimentícia e uma diminuição quanto às suas perdas.

Nesse aspecto, o emprego da biotecnologia abre muitas oportunidades para o melhoramento genético de espécies cultivadas que propicie um aumento da sua produção em larga escala, do seu valor nutricional e de sua resistência contra pragas, patógenos e herbicidas. O uso destas técnicas referentes aos insetos-pragas tem o efeito de reduzir perdas significativas nas lavouras, tanto antes quanto depois da colheita (MEHRABADI; FRANCO; BANDANI, 2012). Esta prática também mostra importância em relação à sustentabilidade, por menor agressividade ao meio ambiente, uma vez que resíduos químicos, como inseticidas, tem seu uso dispensado (SILVEIRA; BORGES; BUAINAIN, 2005; GOMES; BÓREM, 2013).

No âmbito de produção alimentícia, o Brasil é o maior produtor e consumidor de feijão da América Latina e o segundo lugar na produção mundial, perdendo somente para a Índia (~ 3,4 milhões de toneladas em 2017 – IBGE, 2017; FAOSTAT, 2019). Quando combinado com o arroz, o feijão faz parte do prato típico do brasileiro de todas as classes sociais, em especial para a população de baixa renda, servindo como a principal fonte de aminoácidos, ferro, cálcio, zinco, carboidratos, fibras, magnésio e vitaminas essenciais (principalmente do complexo B), além de conter fitoquímicos biologicamente ativos importantes para a saúde humana (MESQUITA et al., 2007; ROCHFORT; PANOZZO, 2007; BLAIR et al., 2010; MYERS; KMIETIK, 2017). O feijão, portanto, detém uma grande importância social, econômica e nutricional (LAJOLO et al., 1996; MYERS; KMIETIK, 2017).

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) (Fig. 1B) faz parte do cenário de produção de grãos no Brasil. Uma Fabaceae originalmente pertencente ao Novo Mundo e hoje cultivada em todos os continentes, existindo dois principais pools gênicos desta espécie que ocorreram independentemente na América do Sul (Andina) e América Central/México (Mesoamérica) onde incluem populações selvagens e variedades cultivadas (DEBOUCK et al., 1993; HANCOCK, 2004; MYERS; KMIECIK, 2017). Possui grande variedade morfológica e fisiológica, o que permite sua produção em grande escala e com ampla produção territorial, ocorrendo em praticamente todo o território brasileiro (BLAIR et al., 2010; MYERS; KMIECIK, 2017).

Presente também no gênero *Phaseolus*, feijão-lima ou fava (*Phaseolus lunatus*) (Fig. 1C), é a segunda espécie que tem o maior cultivo no mundo, perdendo somente para o já citado feijão comum (*P. vulgaris*) (BAUDOIN et al. 2004). A organização genética desta espécie é identificada contendo três pools gênicos, sendo elas Andina, Mesoamérica 1 e Mesoamérica 2, possuindo tanto linhagens selvagens como cultivadas (GUTIÉRREZ-SALGADO; GEPTS; DEBOUCK, 1995; MARTÍNEZ-CASTILLO et al. 2014). No Brasil, ela é principalmente importante na região Nordeste, onde apresenta grande escala de produção e de consumo, uma vez que estes feijões apresentam tolerância a elevadas temperaturas e estações de seca (AZEVEDO et al., 2003).

Por fim, outra leguminosa com importância para economia brasileira é o feijão caupi (*Vigna unguiculata*) (Fig. 1A). Essa espécie se destaca por tolerar ambientes com altas temperaturas, índices pluviométricos irregulares ou secos e em solos alcalinos ou ácidos e com baixa fertilidade (FERY, 1990; FILHO et al., 2011). Com maior proeminências de cultivo em regiões equatoriais e subtropicais mais quentes e menos elevadas, sendo no Brasil produzidos nas localidades semiáridas do Nordeste (FILHO et al., 2011).

Todas estas espécies de feijões citadas acima são alvos de ataques de insetos pragas. Os danos causados por esses organismos são os mais importantes nas perdas pós-colheita de várias espécies de leguminosas (PIMENTEL, 1976; METCALF, 1996; WONG-CORRAL; CASTAÑÉ; RIUDAVETS, 2013). Oliveira e colaboradores (2014) mostraram que os insetos causam perda de cerca de 7,7% das principais culturas, causando anualmente para a economia do Brasil um prejuízo aproximado de 14,7 bilhões de dólares.

Figura 1: Grãos de feijão mais cultivados no Brasil. A - Feijão de corda ou caupi (*Vigna unguiculata*); B - Feijão comum (*Phaseolus vulgaris*); C – Feijão lima (*Phaseolus lunatus*). Barra de tamanho corresponde a 1 centímetro.



Fonte: Autor

Entre os principais predadores, encontram-se insetos da ordem Coleoptera, pertencentes à subfamília Bruchinae, mais conhecidos como carunchos do feijão, responsáveis por infestar uma ampla variedade de espécies de leguminosas (SOUTHGATE, 1974; RAMOS, 2007).

O caruncho *Zabrotes subfasciatus* (Boheman, 1833) é considerado um dos principais insetos-praga de grãos armazenados de leguminosas, inclusive das já citadas acima (SOUTHGATE 1974; RAMOS, 2007). Esses insetos ocorrem principalmente nas regiões tropicais da América Latina, podendo ser encontrados, também, em clima temperado e frio (SOUTHGATE, 1974; DECGECO et al., 1986; RAMOS, 2007). Os danos ocasionados por esses insetos são decorrentes da passagem no interior dos grãos durante algumas etapas do seu ciclo de vida. Esta infestação causa vários prejuízos, como a diminuição parcial ou total do poder germinativo das sementes predadas, diminuição da aceitabilidade e palatabilidade pelo consumidor e diminuição do valor comercial. Além disso, facilita a proliferação de fungos pela abertura de orifícios, assim como, pelo aumento da umidade (JACKAI; DAOUST, 1986; PAUL, et al., 2009; WONG-CORRAL; CASTAÑÉ; RIUDAVETS, 2013).

Portanto, o sucesso no melhoramento genético para a redução das perdas ocasionadas por esses insetos depende de uma série de informações, dentre as quais destaca-se o conhecimento das relações inseto-planta.

1.2 ZABROTES SUBFASCIATUS INSETO PRAGA DE GRÃOS DA FAMÍLIA FABACEAE

A ordem Coleoptera tem importante papel na agricultura por apresentar diversas famílias que causam injúria a muitas plantas de interesse econômico. Cerca de 500 espécies têm sido registradas como causadoras de danos a produtos armazenados, tanto de origem animal como vegetal (HAINES, 1991). Dentro do reino animal, esta ordem é a mais numerosa, sendo estimado um número de 350.000 a 375.000 espécies descritas. É característico desta ordem um corpo, em geral, altamente esclerotizado; asas anteriores esclerotizadas e modificadas em tampas rígidas (élitros) que cobrem as asas posteriores e o corpo; asas posteriores membranosas, frequentemente reduzidas ou ausentes; peças bucais mastigadoras; antenas geralmente com oito a 11 ‘artículos’, protórax grande e móvel; mesotórax reduzido; abdômen tipicamente com cinco (ou até oito) segmentos; sem ovipositor; genitália masculina retrátil (BRUSCA; BRUSCA, 2007).

Os bruquídeos (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) são amplamente encontrados em todas as regiões do mundo, apresentando maior diversidade em regiões do Novo Mundo (RAMOS, 2007). A maioria de seus representantes é associado com as plantas da família Fabaceae, sendo, seus grãos o principal alvo de hospedagem de suas larvas (JOHNSON, 1981; RAMOS, 2007). Como característica geral apresentam pigídios grandes não cobertos pelos élitros; um corpo ovalado; rostró curto e achatado com antenas possuindo 11 segmentos; cabeça livre; e antenas nunca mais largas que a longitude do corpo (GALLO et al., 1988; RAMOS, 2007).

De acordo com Kingsolver (2004), *Z. subfasciatus* (Boheman, 1833) (Fig. 2) possui enquadramento taxonômico no: Reino Animalia; Filo Arthropoda; Classe Insecta; Ordem Coleoptera; Família Chrysomelidae; Subfamília Bruchinae; Gênero *Zabrotes*; Espécie *Zabrotes subfasciatus*. São insetos originalmente do Novo Mundo que, através da extensa comercialização e exportação, foram espalhados em praticamente todas as regiões, preferencialmente em lugares com climas tropicais e subtropicais onde há melhores condições para seu crescimento e proliferação (SOUTHGATE, 1979). Possuem alto potencial de infestação em vários gêneros de leguminosas (*Cassia*, *Cajanus*, *Cicer*, *Dolichos*, *Phaseolus*, *Vigna*, *Pisum*, etc.), sendo que, em seu lugar de origem na América Central e nas partes nortes da América do Sul, é uma das principais pragas do feijão comum (*P. vulgaris*) (SOUTHGATE, 1979; BONET et al., 1987).

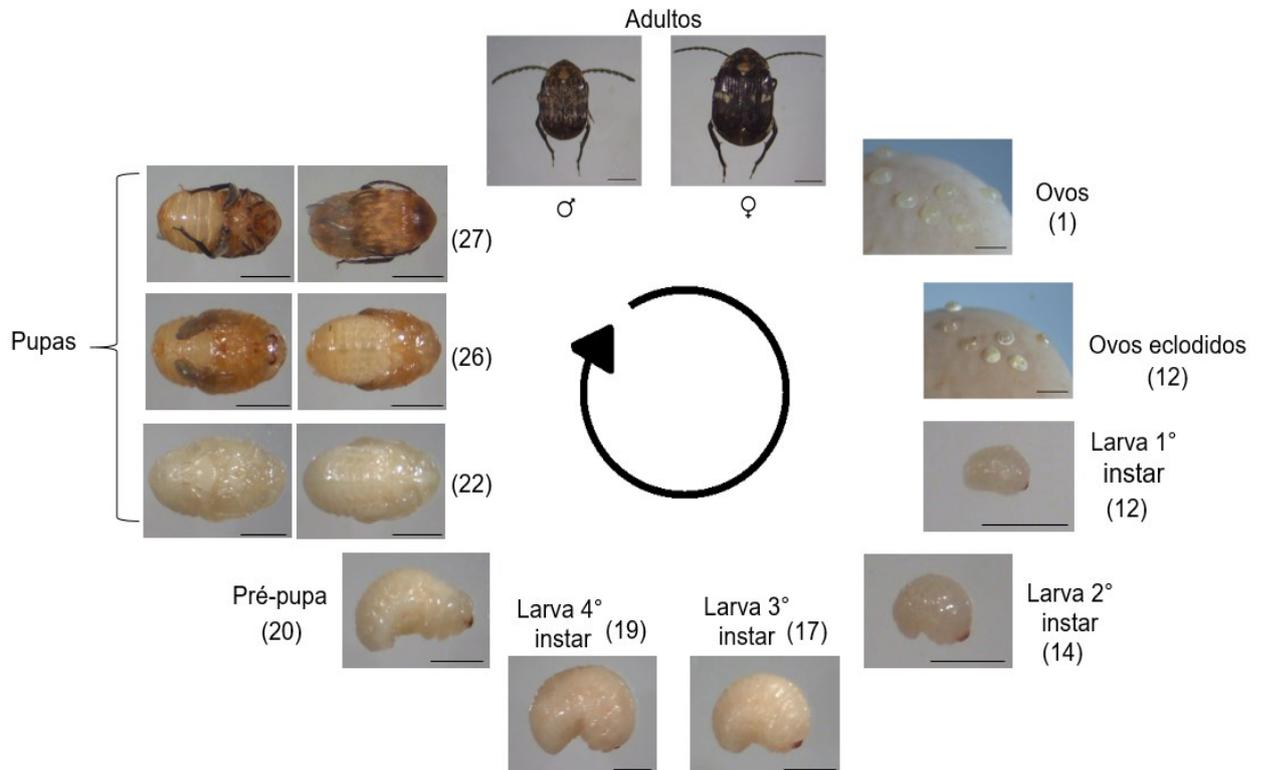
Figura 2: Adultos de *Zabrotes subfasciatus*. Barra de tamanho 0,1 centímetro.



Fonte: Autor

O ciclo de vida desses insetos é demonstrado na Figura 3. Tudo se inicia pela postura de ovos pela fêmea fecundada na superfície da semente. Ao contrário de outros bruchídeos as fêmeas não anexam seus ovos em vagens e o contato direto com a semente é importante para a estimulação da produção de ovócitos (PIMBERT; PIERRE, 1983; PIMBERT, 1985). A larva primária ou neonata é correspondente ao primeiro instar larval, ela penetra imediatamente pelo tegumento da semente para seu interior em busca de sua fonte alimentícia. As larvas secundárias correspondem aos próximos estágios larvais, que para *Z. subfasciatus* é até o 4º instar. É nesse período onde ela formará galerias no interior das sementes e é onde mais irá se alimentar e crescer. Antes de atingir o estágio de pupa, a larva de 4º instar prepara um orifício circular em direção ao exterior, chamado de janela pupal, por onde facilmente saíra o adulto. A larva então passa por um breve período pré-pupal até atingir o período de pupa, onde ocorrerá a metamorfose e posterior saída do adulto de dentro dos grãos através da janela pupal (SOUTHGATE, 1979; RAMOS, 2007).

Figura 3: Ciclo de vida de *Zabrotes subfasciatus* crescidos em grãos de *Vigna unguiculata*. Os números entre parênteses representam os dias de desenvolvimento após a ovoposição. Barra de tamanho 0,1 centímetro.



Fonte: Autor.

Adultos, ao emergirem, chegam a um tamanho máximo de 5 mm com tempo de vida em torno de 10 a 20 dias. Podem produzir várias gerações e posterior retorno ao ciclo de vida deixando cavidades (galerias) e danos às sementes (Fig. 4) (SOUTHGATE, 1979; JOHNSON, 1981; RAMOS, 2007). Apresentam um dimorfismo sexual bem evidente (Fig. 2), onde a fêmea é geralmente maior e possui bandas elitrais brancas, enquanto os machos são menores e são mais marrons (RAMOS, 2007).

Figura 4: Danos ocasionados pela infestação de *Zabrotes subfasciatus* em sementes de *Vigna unguiculata*. Barra de tamanho 1 centímetro.



Fonte: Autor

1.3 ZABROTES SUBFASCIATUS E SUA RELAÇÃO COM PROTEÍNAS DE DEFESA DE PLANTAS

Ao longo da evolução das plantas, principalmente pela coevolução com os insetos, elas desenvolveram substâncias químicas que repelem ou intoxicam insetos herbívoros, muitas vezes através da desorganização das suas funções digestivas (MOSOLOV et al., 2001; TERRA; FERREIRA, 2005). Essas substâncias se mostram possíveis alvos de manipulação, seja pela sua expressão endógena ou pela transferência para uma outra planta de interesse econômico (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; ANDOW et al., 2008).

Dentro deste enfoque, destaca-se uma família de proteínas homólogas que englobam as fitohemaglutininas (PHA), arcelinas (ARL) e inibidores de α -amilase (α -AIs). São importantes proteínas de reserva e de defesa destas plantas, detendo diferentes mecanismos de ação que culminam para a resistência contra insetos fitófagos e mamíferos herbívoros (ISHOMOTO; KITAMURA, 1989; HUESING et al., 1991; CHRISPEELS; RAIKHEL, 1991). Estas proteínas foram primeiramente caracterizadas em sementes de *P. vulgaris*, sendo que atualmente estas também já foram identificadas em outras espécies dentro do gênero *Phaseolus* (MIRKOV et al., 1994; PUEY; DELGADO-SALINAS, 1997). As PHA, ARL e α -AI pertencem a um mesmo locus gênico, chamado APA, que vem das iniciais destas três proteínas. Estudos filogenéticos mostram que seu surgimento é relacionado a eventos de duplicações parálogas e divergência

de um gene ancestral, que primeiramente deram origem às verdadeiras lectinas ou PHA e posteriormente as ARL e α Als, chamadas proteínas relacionadas a lectinas (ou “lectin-like”) (SPARVOLI et al., 2001, LIOI et al., 2003; LIOI et al., 2007).

Dentre essas proteínas, destaca-se o inibidor de α -amilase (α -AI) que é amplamente encontrado dentro do gênero *Phaseolus*, tanto em linhagens cultivadas como em linhagens selvagens, existindo quatro isoformas diferentes, α -AI-0, α -AI-1, α -AI-2 e α -AI-3 (ISHIMOTO et al., 1995). α -AIs são glicoproteínas vacuolares presentes nas sementes destas leguminosas e tem sido descritas como uma glicoproteína dimérica ($\alpha_2\beta_2$) tendo a massa molecular de 43 kD (FINARDI-FILHO; MIRKOV; KASAHARA et al., 1996; BERRE-ANTON et al., 1997). Estão presente em grandes quantidades nas sementes destas leguminosas e possuem a capacidade de inibir α -amilases intestinais de coleópteros e mamíferos (salivar e pancreática) (ISHIMOTO; KITAMURA, 1989; HUESING et al., 1991). Importante ressaltar que nós seres humanos não sofremos com essa atividade inibitória do α -AI, uma vez que o processo de cozimento destes grãos ocasionam a desnaturação destas proteínas.

A isoforma α -AI-1 é a mais comumente encontrada em sementes cultivadas de *P. vulgaris*, sendo esta uma glicoproteína dimérica (ISHIMOTO et al., 1995; KASAHARA et al., 1996; SUZUKI; ISHIMOTO; KITAMURA, 1994; BERRE-ANTON et al., 1997). Sua estrutura tridimensional exhibe um padrão de dobramento “jelly roll” muito similar ao encontrado nas verdadeiras lectinas ou PHA (HAMELRYCK et al., 1996; KASAHARA et al., 1996). No entanto, os α -AI-1 se diferem por não conterem a presença de dois *loops* ou alças de quinze e seis resíduos de aminoácidos (HAMELRYCK et al., 1996; KASAHARA et al., 1996). A ausência destas alças na estrutura do α -AI-1 tem se mostrado importante para sua atuação em inibir a amilase pancreática suína (PPA), uma vez que permite a sua entrada na fenda catalítica desta enzima (SANTIMONE et al., 2004). Em adição a isto, estas proteínas se diferem dos outros membros do locus APA, por serem sintetizadas como pró-proteínas (32-36 kD). Estas pró-proteínas passam por maturações proteolíticas, ocorrendo no resíduo Asn⁷⁷, dando origem a cadeias α (1-77 resíduos de aminoácido, 10,8 kD) e β (78-223 resíduos de aminoácido, 15 kD) sendo estes responsáveis pela atividade inibitória a amilases de animais predadores (PYEYO; HUNT; CHRISPEELS, 1993; BERRE-ANTON et al., 1997; SANTIMONE et al., 2004). Uma vez maturadas, estas subunidades α e β se oligomerizam originando heterodímeros de $\alpha_2\beta_2$ (SUZUKI; ISHIMOTO; KITAMURA, 1994; KASAHARA et al., 1996; BERRE-ANTON et al., 1997).

A cinética inibitória do α -AI-1 tem sido intensamente estudado sobre a atividade da PPA. Este inibidor apresenta uma atividade de um inibidor não-competitivo misto, com a possibilidade do α -AI-1 de formar diferentes complexos com a PPA, principalmente após a formação do complexo enzima-substrato (ES) (BERRE-ANTON et al., 1997; SANTIMONE et al., 2004). Em contrapartida, a estrutura cristalográfica do complexo α -AI-1 – PPA indica que cada monômero do heterodímero ($\alpha_2\beta_2$) é capaz de interagir com uma molécula de PPA, formando complexos de duas PPA para um inibidor (E_2I) (BOMPARD-GILLES et al., 1996; GILLES et al., 1996).

Importante ressaltar que as α -amilases (α -1,4-glicano-4-glicano-hidrolases), pertencentes da família 13 de glicosil hidrolases, são enzimas que se encontram em uma ampla quantidade de animais, plantas e microrganismos. Participam das primeiras etapas da digestão, sendo responsáveis pela quebra ou hidrólise das ligações α -1,4 dos polímeros de glicose, como o amido e o glicogênio. Seu mecanismo de ação permite que essas grandes estruturas resultem pequenos oligossacarídeos (como maltose e maltotriose), permitindo a assimilação pelos organismos. Vários insetos predadores exclusivos de sementes dependem desta enzima para a digestão dos polissacarídeos encontrados nas mesmas. Este amido disponibiliza a estes herbívoros a energia necessária para a sua sobrevivência e seu ciclo de vida (CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; MEHRABADI et al., 2012).

Casos em que genes que codificam inibidores de α -amilases, extraídos a partir do genoma de *P. vulgaris*, quando inseridos em ervilhas (*Pisum sativum*) (SHADE et al., 1994, SCHROEDER et al., 1995; CAMPBELL et al., 2011), feijão vermelho (*Vigna angularis*) (ISHIMOTO et al., 1996), feijão de corda (*V. unguiculata*) (SOLLETI et al., 2008) e grão de bico (*Cicer arietinum*) (SARMMAH et al., 2004; CAMPBELL et al., 2011) tornaram estas plantas resistentes a espécies de bruquídeos do gênero *Callosobruchus* do Velho Mundo. Em condições de campo, resultados positivos já foram demonstrados por Morton e colaboradores (2000). Estes resultados mostram o grande potencial para futuras aplicações de engenharia genética em plantas que são alvos dos insetos pragas (MOSOLOV et al., 2001; CARLINI; GROSSI-DE-SÁ, 2002; ANDOW et al., 2008).

Ishimoto e Kitamura (1989) e Huesing e colaboradores (1991) confirmaram que a resistência de *P. vulgaris* a *C. chinensis* e *C. maculatus* era atribuída à presença do α -AI em seus grãos. Anteriormente, a resistência de *P. vulgaris* a estes bruquídeos era referida à presença de lectinas em seus grãos. Ishimoto e Kitamura (1989) encontraram quantidades insuficientes de lectinas em seus grãos. Ishimoto e Kitamura (1989) descartando que a resistência estaria atribuída à presença destas

proteínas. Huesing e colaboradores (1991) investigaram as preparações de lectinas vindas da Sigma® Chemical Co., Londres, que eram amplamente utilizadas pela comunidade científica, principalmente nos estudos envolvendo os bruquídeos, e notou que elas vinham contaminadas com o inibidor de α -amilase 1 (α -AI-1). Portanto, α -AI-1 que é a forma mais comum em sementes de linhagens cultivadas de *P. vulgaris*, é o verdadeiro fator responsável por atribuir resistência aos bruquídeos do Velho Mundo, sendo altamente tóxicos para *C. chinensis* e *C. maculatus*. Ambos são incapazes de se desenvolver nestas sementes.

No entanto, Ishimoto e Kitamura (1992) notaram que *Z. subfasciatus* e *Acanthoscelides obtectus*, bruquídeos do Novo Mundo, são resistentes a expressão de α -AI-1 e são capazes de infestar o feijão comum. Eles sugeriram que as larvas de *Z. subfasciatus* teriam a capacidade de causar uma digestão proteolítica do inibidor de α -amilase tornando-os tolerantes à sua presença. Num estudo posterior, Ishimoto e Chrispeels, (1996) analisando α -AI-1 com amostras intestinais de *Z. subfasciatus*, concluíram que insetos do Novo Mundo possuem amilases insensíveis a esses inibidores e, também, possuem uma proteinase do tipo serínica que promove a hidrólise do α -AI-1, liberando um peptídeo C-terminal, tendo como resultado a sua inativação.

Ao analisar o efeito de diferentes dietas ofertadas a *Z. subfasciatus* viu-se a possibilidade de modulação na expressão de suas enzimas digestivas. Quando alimentado com as sementes de *P. vulgaris* esses insetos expressam duas isoformas de α -amilases a mais, quando comparado à alimentação em *V. unguiculata*, sendo especulado que seria uma resposta a diferença na estrutura dos grânulos de amido encontrado nestes grãos (SILVA et al., 1999). Os estudos previamente feitos utilizavam grãos de amido gelatinizado, não representando a forma natural desses grânulos. No entanto, essa relação direta não pareceu estar envolvida na indução dessas diferentes amilases por esses insetos não desenvolverem variações ao serem ofertados a grânulos de amido intactos ou mecanicamente danificados de *P. vulgaris* e *V. unguiculata* (SILVA et al., 2001a). Além disso, foi constatado que as formas induzidas de α -amilase devem funcionar como dímeros pelo fato de que elas são sempre eluídas juntas durante os processos de purificação em cromatografia, sendo dissociado somente em condições semi-desnaturantes da eletroforese (SILVA et al., 1999, 2001a).

A sobre expressão de amilases de *Z. subfasciatus* em *P. vulgaris* tem relação direta com a ingestão do α -AI-1. O contato com esse inibidor, mesmo que por um curto período, é suficiente para induzir a expressão de isoformas de α -amilases. Essa indução passa a ser constitutiva e irreversível (perpetuada por todos os estágios larvais), além de haver evidências de que ela seja mediada por receptores ligado às microvilosidades intestinais (SILVA et al.,

2001b; BIFANO et al., 2010). Além disso, foi constatado que o α -AI-1 possui atividade inibitória tanto sobre as duas isoformas de baixa migração eletroforética e, com maior intensidade, na isoforma majoritária de α -amilase de *Z. subfasciatus* (SILVA et al., 2001b). Esta inibição foi vista quando estas α -amilases foram submetidas a ensaios com o α -AI-1 utilizando como substrato grânulos de amidos semelhantes aos encontrados no interior dos cotilédones (ainda, macerados mecanicamente para assimilar o processo de mastigação das larvas) de *P. vulgaris*, evento este que não é observado quando utilizado grânulos de amido gelatinizados (ISHIMOTO; CHRISPEELS, 1996; SILVA et al., 2001b). Portanto, *Z. subfasciatus* consegue se adaptar à presença de proteínas potencialmente tóxicas presentes em linhagens cultivadas de *P. vulgaris*, como α -AI-1, pela modulação das suas enzimas digestivas.

Intrigantemente, nos trabalhos de Silva e colaboradores (2001b) foi observado que *Z. subfasciatus* também promove esse padrão de indução das duas isoformas de α -amilases quando estes são cultivados nas sementes de *P. lunatus*, de maneira similar ao observado nas sementes de *P. vulgaris*. No entanto, a literatura disponível relata que não há presença de inibidores de α -amilase ativos ou de atividade inibitória de α -amilase nas sementes de *P. lunatus*.

Pueyo e Delgado-Salinas (1997), ao estudarem linhagens cultivadas de *P. lunatus*, não observaram presença de polipeptídeos do α -AI quando extratos proteicos advindos destas sementes foram ofertados ao anticorpo anti- α -AI de *P. vulgaris*. Além disso, não observaram atividade inibitória sobre amilases do besouro *Tenebrio molitor* e da amilase pancreática suína comercial (PPA). Estes autores sugeriram que outras defesas estariam substituindo a presença do α -AI nas sementes de *P. lunatus*.

Estudos posteriores identificaram proteínas similares ao α -AI de *P. vulgaris* presentes nas sementes de *P. lunatus*, posteriormente intituladas de sequências que são relacionadas aos α -AI (“ α -amylase inhibitor like” - AIL) (SPARVOLI et al., 1998; SPARVOLI et al., 2001; LIOI et al., 2007). No entanto, apesar destas sequências AIL compartilharem similaridades aos α -AIs, a evolução para a forma ativa de α -AI parece se restringir a outras espécies de *Phaseolus*, uma vez que novamente não foram encontradas atividades inibitórias de α -amilase (LIOI et al., 2007).

Como citado anteriormente, a forma ativa α -AI se refere ao processo de maturação proteolítica, gerando a forma do α -AI responsável pela atividade inibitória de α -amilase (PYEYO; HUNT; CHRISPEELS, 1993; BERRE-ANTON et al., 1997). Curiosamente, no trabalho de Sparvoli e colaboradores (1998), ao submeterem amostras proteicas totais de

sementes de *P. lunatus* em cromatografia de troca iônica e ofertarem as frações com o anticorpo anti α -AI de *P. vulgaris*, constataram a presença de proteínas em torno de 40, 15 e 29 kD. Estes autores sugerem que estes polipeptídios menores podem ter surgido a partir de maturações proteicas advindas das proteínas de 40 kD, e não descartam a possibilidade de conter atividade inibitória sob outras fontes de α -amilase.

Portanto, resta explorar o motivo pelo qual as larvas de *Z. subfasciatus* promovem a indução das duas isoformas de α -amilase quando estes são cultivados nas sementes de *P. lunatus*. A possibilidade de conter atividade inibitória de α -amilase nas sementes de *P. lunatus* não está totalmente descartada, e isto pode estar implicado na resposta adaptativa de modulação de enzimas digestivas observadas nas larvas de *Z. subfasciatus*. Ainda, a presença de AIL e de outras proteínas do locus APA nas sementes de *P. lunatus*, mesmo não possuindo atividade inibitória de α -amilase, podem conter semelhanças estruturais aos α AI de *P. vulgaris* que seria suficiente para gerar esta indução, podendo ser uma resposta adaptativa à presença dos α AI.

1.1.1 OBJETIVOS

1.1.2 Objetivo Geral

Investigar os mecanismos pelos quais *Z. subfasciatus* conseguem se adaptar à ingestão de proteínas potencialmente tóxicas de origem vegetal.

1.1.3 Objetivos Específicos

- Confirmar o padrão de indução de α -amilases de *Zabrotes subfasciatus* quando estes são cultivados e alimentados pelas sementes de *Phaseolus lunatus*.
- Avaliar se sementes de *P. lunatus* são capazes de inibir atividade de α -amilase.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLÔNIA DE INSETOS

As colônias de *Z. subfasciatus* foram mantidas em sementes de *V. unguiculata*, *P. lunatus* e *P. vulgaris* previamente desinfestadas por congelamento a -20°C de qualquer infestação anterior de campo. As mesmas são mantidas em uma sala com uma temperatura entre $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa em torno de $25 \pm 5\%$, no laboratório de Bioquímica de Insetos do Departamento de Bioquímica - CCB - UFSC.

2.2 DISSECAÇÃO DAS LARVAS

As larvas de *Z. subfasciatus* foram obtidas das colônias cultivadas no laboratório (ver item 2.1). Por apresentarem tempos diferentes de desenvolvimento em cada semente, as larvas crescidas nas sementes de *P. lunatus* e *P. vulgaris* foram retiradas após o 18º dia de infestação, enquanto as larvas crescidas em sementes de *V. unguiculata* após o 15º dia de infestação, períodos que em que as larvas se encontram no quarto instar. A obtenção das amostras dos intestinos médio de *Z. subfasciatus* foram coletados com auxílio de pinças cirúrgicas. As larvas foram dissecadas em solução NaCl 250 mM gelada e transferidas diretamente para tubos contendo uma proporção de 10 animais para 150 μL de água destilada (67 animais/mL) onde foram homogeneizados. As homogeneizações das amostras de intestinos médio foram realizadas com o uso do homogeneizador Potter-Elvehjem em gelo. O material homogeneizado foi centrifugado a $20000 \times g$ 30 min a 4°C , sendo coletado o sobrenadante para posterior estudo e análise.

2.3 PULSO ALIMENTAR

As larvas de *Z. subfasciatus* foram submetidas a diferentes dietas com as farinhas das sementes de *V. unguiculata*, *P. lunatus* e *P. vulgaris*, com o intuito de analisar a indução de α -amilases. As farinhas foram confeccionadas a partir dos feijões de *V. unguiculata*, *P. lunatus* e *P. vulgaris* submetidas ao moedor de grãos de café convencional. Para este pulso alimentar, larvas de terceiro instar de *Z. subfasciatus* foram retiradas de sementes de *V. unguiculata* e inseridas em eppendorf de 1,5 mL contendo as diferentes farinhas isoladamente, por um tempo

de 48 horas. Após este período, as larvas foram retiradas e dissecadas os intestinos médio (ver item 2.2). Essas amostras foram utilizadas para posterior análise do padrão e atividade de α -amilases.

2.4 ENSAIO ENZIMÁTICO (α -AMILASE)

As quantificações das atividades de α -amilases dos bioensaios (item 2.2 e 2.3) foram determinadas pelo aumento do poder redutor por DNS (ácido dinitrosalicílico). A partir de solução de amido 1% em tampão acetato de sódio 100 mM (NaCl 20 mM e CaCl₂ 2 mM, pH 5,5), segundo Noelting e Bernfeld (1948). Foram utilizados 25 μ L da solução de amido 1% mais 25 μ L de fonte enzimática, totalizando 50 μ L em meio de reação e concentração final de 0,5% da solução de amido. As reações foram incubadas em banho-maria a 30 °C por quatro intervalos de tempo (10, 20, 30 e 40 minutos), após o período de incubação foram adicionados mais 100 μ L de DNS para o fim da reação. Com o término dos intervalos de tempo, foram colocados os tubos em água fervente por cinco minutos e, por fim, adicionados mais 100 μ L de água destilada em cada tubo. Foram aplicados 200 μ L de amostra em cada poço da placa de 96 poços e feita a leitura com comprimento de onda de 550 nm em aparelho Rchisto tecan. Cálculos foram atribuídos considerando que uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a clivagem de 1 μ mol de substrato/min.

2.5 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA CONTENDO SDS

Foram feitas corridas eletroforéticas semi-desnaturantes em géis de poliacrilamida SDS-PAGE (LÄEMMLI, 1970) para separação das proteínas e posterior ensaios em gel para a visualização do padrão de bandas de α -amilases das amostras advinda dos bioensaios (Item 2.2 e 2.3). Para os ensaios de atividade in gel de amilases foram utilizadas placas de vidro de tamanho 8 x 10 cm e espaçadores de 1 mm. O gel de separação de acrilamida 7,5% foi preparado misturando-se: 4,85 mL de água destilada, 2,5 mL de tampão 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,1 mL de SDS 10%, 2,5 mL de solução acrilamida-bisacrilamida (30:0,8), 0,05 mL de persulfato de amônio, 0,005 mL de TEMED, o que totaliza uma solução de 10 mL. O gel de empilhamento ("stacking gel") foi preparado misturando-se: 3,05 mL de água destilada, 1,25 mL de tampão Tris/HCL 0,5 M, pH 6,8, 0,05 mL de SDS 10%, 0,665 mL de bis-acrilamida (estoque 30%),

0,025 mL de persulfato de amônio, 0,005 mL de TEMED, com uma solução final de 5,045 mL. O tampão de corrida utilizado na cuba de eletroforese foi o tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM, e SDS 0,1%, pH 8,3. Amostras foram primeiramente diluídas em tampão de amostra (SDS 2%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0,1% em tampão Tris/HCl 200 mM, pH 6,8), com uma proporção final em que 15 µL de amostra contenha a proporção de 0,5 animal (sem fervura), e, em seguida, submetidas à eletroforese usando um sistema de mini-géis BioRad MiniProtean 3. Após migração, os géis foram transferidos para uma solução aquosa de Triton X-100 2,5% (m/v) durante 20 minutos para renaturação das proteínas. Depois da renaturação, os géis foram transferidos para uma solução de amido 1% (p/v) em tampão acetato de sódio 100 mM (NaCl 20 mM e CaCl₂ 2 mM, pH 5,5) e incubados por uma hora à temperatura de 30 °C. Após isto, os géis foram transferidos para uma solução de iodo (I) 1,3% e KI 3% (m/v). Depois da coloração e lavagem do gel com água destilada, bandas claras aparecem contra um fundo marrom (coloração negativa), indicando as atividades amilásicas.

Foram também feitos géis SDS-PAGE (LÄEMMLI, 1970) para a separação de proteínas das amostras resultantes de cromatografias de troca iônica e extratos proteico de sementes de *P. vulgaris* e *P. lunatus* (ver adiante item 2.6 e 2.7). As amostras advindas das cromatografias de troca iônica foram anteriormente submetidas ao equipamento SpeedVac vacuum, com o intuito de concentrá-las para melhor visualização de suas bandas em gel. Das amostras, então, foram aplicados equivalentes de proteína em gel de separação de acrilamida de 13,5%, sendo o preparo deste: 2,85 mL de água destilada, 2,5 mL de tampão 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 0,1 mL de SDS 10%, 4,5 mL de solução acrilamida-bisacrilamida (30:0,8), 0,05 mL de persulfato de amônia, 0,005 mL de TEMED, o que totaliza uma solução de 10,005 mL. O gel de empilhamento (“stacking”), tampão de corrida e o tampão de amostra foram igualmente utilizados como descrito acima. Após a migração dos géis, estes foram submetidos ao corante de azul brilhante de comassie R 1% (m/v) (etanol 25% – v/v e ácido acético 5% - v/v) por aproximadamente doze horas. Em seguida os géis foram descorados utilizando o descorante (etanol 25% – v/v e ácido acético 5% - v/v) até a visualização das bandas azul escuro num fundo transparente. Nestes géis também foram aplicados marcadores de peso molecular – Precision plus protein™ Dual color standards (BIO-RAD; 10-250 kD) diluído em tampão de amostra (como descrito anteriormente) e beta mercaptoetanol 2%, para cálculos de massa molecular relativa (*Mr*).

2.6 EXTRATO DAS SEMENTES

Foram preparados extratos proteicos das sementes de *P. lunatus* e *P. vulgaris* utilizando farinhas confeccionadas destes feijões (ver item 2.3). As farinhas foram adicionadas em H₂O MILI-Q® numa concentração de 0, 1g.mL⁻¹, estas foram deixadas sob agitação por uma hora em temperatura ambiente. Após este tempo, elas foram submetidas a uma centrifugação de 20000 x g 30 min a 4°C, sendo o sobrenadante coletado e utilizado para posterior estudo e análise.

2.7 CROMATOGRAFIA DE TROCA IÔNICA

Com intuito de fazer uma análise discriminativa da presença de atividade inibitória de α -amilase em sementes de *P. lunatus* e *P. vulgaris*, como um controle da técnica, foram feitas cromatografias de troca iônica dos extratos destes feijões (Item 2.6). Para isto, foram aplicados 500 μ L dos extratos das sementes na coluna RESOURCE™ Q (6,4 x 30 mm, 1 mL) equilibrada em tampão imidazol 10 mM, pH 6,7, utilizando o equipamento ÄKTA Purifier. Após aplicação das amostras dos feijões, a coluna foi lavada com 10 mL de tampão imidazol e depois eluída num gradiente linear de 40 mL de 0-800 mM de NaCl em tampão imidazol. Após a eluição, a coluna passou por 10 mL de NaCl 1 M em tampão imidazol e por fim mais 10 mL de tampão imidazol somente. O fluxo seguiu de 1 mL.min⁻¹ sendo coletadas frações de 1 mL que rapidamente foram coladas em gelo e reservadas para posteriores análises.

2.8 ENSAIOS DE INIBIÇÃO DE ALFA-AMILASE A PARTIR DAS FRAÇÕES DAS CROMATOGRAFIAS DE TROCA IÔNICA

A frações coletadas das cromatografias de troca iônica dos extratos das sementes de *P. lunatus* e *P. vulgaris*, foram incorporadas aos ensaios de atividades de α -amilase para identificação de frações contendo atividades inibitórias de α -amilase. Para isto foi utilizada a amilase pancreática suína comercial – PPA - (SIGMA A-6255), sendo sua atividade medida pelo aumento do poder redutor por DNS (ácido dinitrosalicílico). Para a reação, primeiramente foi adicionado as frações das cromatografias (aplicada 30 μ L) e a PPA (aplicado 10 μ L), que então foram submetidas a uma pré-incubação de 37 °C por 15 minutos. Após esta pré-incubação foi adicionado à solução de amido 2,5% em tampão acetato de sódio 100 mM (NaCl 20 mM e

CaCl₂ 2 mM, pH 5,5) (aplicado 10 µL), totalizando 50 µL em meio de reação, e posterior incubação em banho-maria a 30 °C por um único tempo de 20 minutos. Após o período de incubação foram adicionados 100 µL de DNS para o fim da reação. Por fim, foram colocados os tubos em água fervente por cinco minutos, sendo após este período adicionadas mais 100 µL de água destilada em cada tubo. Foram aplicados 200 µL de amostra em cada poço da placa de 96 poços e feita a leitura com comprimento de onda de 550 nm em aparelho Rchisto tecan. Cálculos foram atribuídos considerando que uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a clivagem de 1 µmol de substrato/min.. Para os cálculos de inibição, foram atribuídos que uma unidade de atividade inibitória (UAI) como equivalente a diminuição da metade (50%) da atividade enzimática total de PPA sem adição das frações. As frações que apresentaram picos de atividade inibitória sobre a PPA, foram juntadas em uma única fração: Frações unidas dos picos advindos de *P. lunatus* – QL; Frações unidas dos picos advindos de *P. vulgaris*– QV.

Para confirmar a presença de atividade inibitória de α-amilase contidas nestas frações unidas (QL e QV), foram analisadas as atividades da PPA sob o aumento gradual de volume de QL e QV ao meio de reação. Para reação, primeiramente foram adicionados diferentes volumes de QL (5 - 40 µL) e de QV (5 – 30 µL), com a PPA (aplicado 5 µL e 10 µL, respectivamente) para uma pré-incubação de 37 °C por 15 minutos. Após esta pré-incubação foi adicionado à solução de amido 5% em tampão acetato de sódio 100 mM (NaCl 20 mM e CaCl₂ 2 mM, pH 5,5) (aplicado 5 µL) nas reações envolvendo QL, e solução de amido 2,5% em tampão acetato de sódio 100 mM (NaCl 20 mM e CaCl₂ 2 mM, pH 5,5) (aplicado 10 µL), nas reações envolvendo QV, totalizando 50 µL em meio de reação. Após isto, as reações foram incubadas em banho-maria a 30 °C por quatro intervalos de tempo (10, 20, 30 e 40 minutos). Terminada a incubação, foram adicionadas 100 µL de DNS para o fim da reação. Com o término dos intervalos de tempo, foram colocados os tubos em água fervente por cinco minutos e, por fim, adicionada mais 100 µL de água destilada em cada tubo. Foram aplicados 200 µL de amostra em cada poço da placa de 96 poços e feita a leitura com comprimento de onda de 550 nm em aparelho Rchisto tecan. Cálculos de atividade (U) e de inibição (UAI) foram os igualmente atribuídos como descrito anteriormente neste item.

2.9 CINÉTICA ENZIMÁTICA

Foram feitas análises de parâmetros cinéticos da atividade inibitória encontrada nas frações unidas resultantes das cromatografias de troca iônica das sementes de *P. lunatus* e de *P. vulgaris*, sobre a atividade da PPA. Inicialmente, foram feitas estimativas da concentração molar da proteína de interesse nestas frações, para os ensaios de cinética enzimática, da seguinte maneira: Primeiro, foi calculado os pesos moleculares relativos (*Mr*) das proteínas presentes nas frações de QL e QV; Segundo, foram analisadas as densitometrias ópticas das bandas presentes nestes géis, utilizando o programa aberto “ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Após isto, as proteínas foram comparadas em relação ao total das áreas de densitometria óptica, e relacionadas à quantidade, em porcentagem, destas proteínas presentes nas frações de QL e QV. Por fim, os *Mr*, a relação da porcentagem em que estas proteínas estão presentes nas amostras e os cálculos de quantidade de proteína total (ver adiante item 2.10), serviram para elaborar uma estimativa da concentração molar da proteína de interesse.

Para a cinética enzimática, as atividades foram medidas pelo aumento do poder redutor por DNS (ácido dinitrosalicílico). A reação consistiu na utilização de cinco concentrações diferentes (concentrações finais, considerando a PPA e também a solução de amido) de QL (0 – 0,65 μ M) e de QV (0 - 0,50 μ M) (aplicado 15 μ L), que foram adicionados juntamente com a PPA (aplicado 10 μ L) e submetidas a uma pré-incubação de 15 minutos a 37 °C. Após esta pré-incubação de foram adicionadas cinco diferentes concentrações de solução de amido (0,1 - 2%) em tampão acetato de sódio 100 mM (NaCl 20 mM e CaCl₂ 2 mM, pH 5,5) (aplicado 25 μ L), finalizando 50 μ L em meio de reação, e posterior incubação em banho-maria a 30 °C por 20 minutos. Terminada a incubação, foram adicionadas 100 μ L de DNS para o fim da reação. Por fim, foram colocados os tubos em água fervente por cinco minutos e adicionada mais 100 μ L de água destilada em cada tubo. Foram aplicados 200 μ L de amostra em cada poço da placa de 96 poços e feita a leitura com comprimento de onda de 550 nm em aparelho Rchisto Tecan. Cálculos de atividade (U) foram os igualmente atribuídos como descrito anteriormente (ver item 2.8).

2.10 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA

A concentração de proteína dos bioensaios (item 2.2 e 2.3) e das frações coletadas das cromatografias (item 2.7) foram determinadas de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) para confecção da curva padrão.

2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os dados obtidos foi utilizado a análise de variância unidirecional (ANOVA) para analisar diferenças ao nível de significância de $P < 0,05$. Para análises entre médias foi utilizado o pós teste de Turkey's.

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE DO PADRÃO DE AMILASES DE *ZABROTES SUBFASCIATUS* EM SEMENTES DE *PHASEOLUS LUNATUS*

Foram coletadas amostras intestinas de larvas de 4º instar de *Z. subfasciatus*, obtidos a partir do cultivo em feijões de *P. lunatus*. As atividades *in vitro* e seu padrão de bandas em géis de eletrofose SDS-PAGE foram analisados. Para comparar estes padrões, foram utilizadas larvas crescidas em *V. unguiculata*, como controle negativo de indução de amilases digestivas, e em *P. vulgaris* como um controle positivo desta indução, uma vez que possuem α -AI-1 em suas sementes. Os perfis de atividade de α -amilase *in vitro*, das amostras intestinas de larvas de 4º instar de *Z. subfasciatus* nos diferentes cultivos, não apresentarem diferença estatística significativa. No entanto, apresentaram uma tendência no aumento de atividade de α -amilase nas larvas cultivadas em sementes de *P. lunatus*, muito semelhantes quando estas estão em *P. vulgaris*. Quando analisado o padrão de α -amilase em ensaios em gel SDS-PAGE (Fig. 6), os animais retirados das sementes de *P. lunatus* mostraram ser capazes de promover, de forma similar, o padrão de indução α -amilase encontrados em sementes de *P. vulgaris*. Tanto em *P. lunatus* quanto em *P. vulgaris* estes insetos demonstraram grande expressão das duas isoformas de α -amilase de baixa migração eletroforética (Z1 e Z2), enquanto que quando crescidos em *V. unguiculata* somente aparecem num nível basal de expressão.

Figura 5: Atividade de α -amilase digestiva *in vitro* das larvas de *Z. subfasciatus* crescidas no interior de sementes de *V. unguiculata*, *P. lunatus* e *P. vulgaris*. A- representação da atividade relativa a quantidade de proteína. B – Atividade representada por animal. Estes dados são médias representativas da repetição de três experimentos independentes contendo 10 insetos cada.

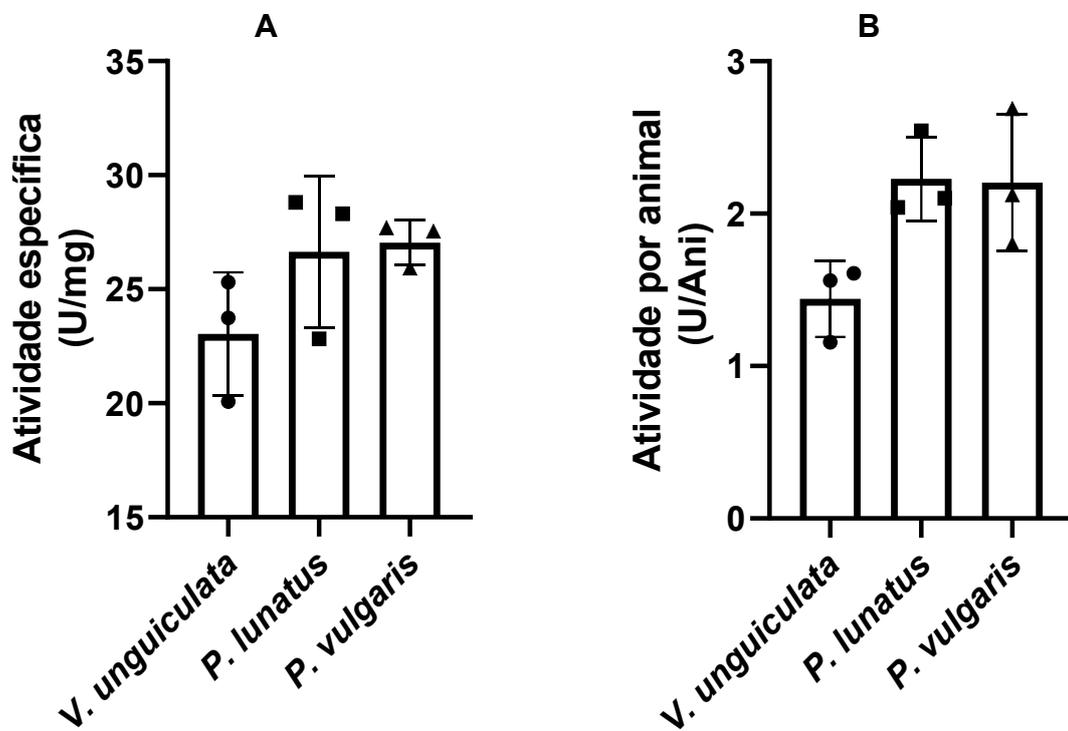
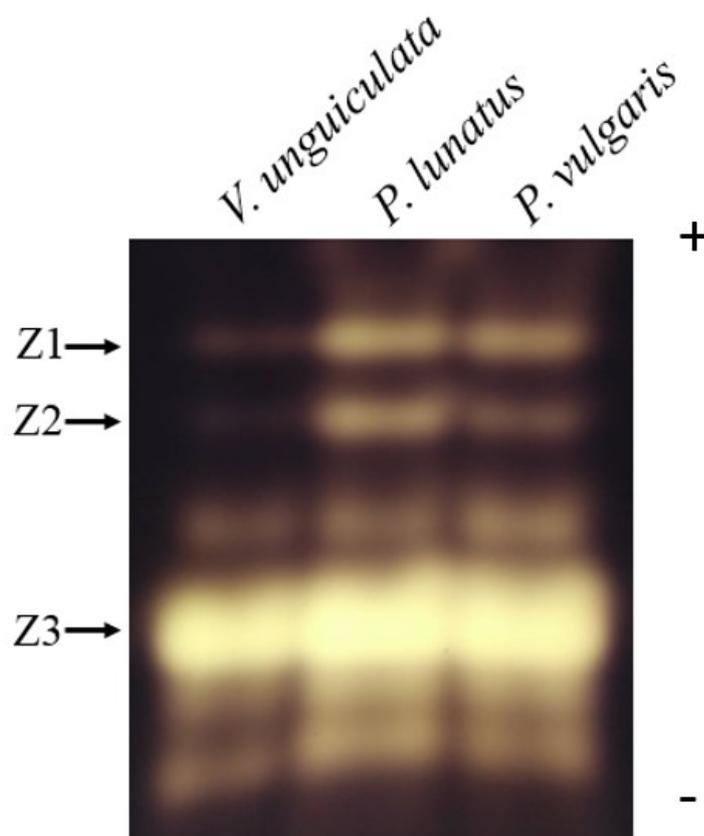


Figura 6: Padrão de atividade de α -amilases digestivas das lavas de *Z. subfasciatus* em 4º instar de desenvolvimento dentro das sementes de *V. unguiculata*, *P. lunatus* e *P. vulgaris*. Foi aplicado um equivalente de 0,5 animal por raia. Após a migração em gel SDS PAGE 7,5 % e renaturação das proteínas, as atividades foram analisadas. Z1 e Z2 indicam a duas isoformas induzidas de α -amilase. Z3 mostra a isoforma constitutiva da α -amilase.



Diante da indução das duas isoformas de α -amilase quando *Z. subfasciatus* se encontra em sementes de *P. lunatus*, foram realizados pulsos alimentares para analisar se o padrão de resposta se assemelha ao encontrado em *P. vulgaris*. Para isso, larvas de 3º instar foram retiradas de sementes de *V. unguiculata* e foram ofertadas a diferentes dietas com farinhas das sementes de *P. vulgaris*, *P. lunatus* e *V. unguiculata* por 48 horas. Após este pulso alimentar, as larvas foram dissecadas e quantificadas as atividades intestinais de α -amilase (Fig. 7). Apesar da atividade específica não apresentar diferenças estatísticas (Fig. 7, A), foram observadas

diferenças quando comparado estas atividades por unidade de animal (Fig. 7, B). Os animais que passaram a se alimentar de farinha de *P. lunatus*, apresentaram atividades muito semelhantes aos encontrados nos insetos que se alimentaram de *P. vulgaris*. Larvas que passaram a se alimentar com a farinha de *V. unguiculata* apresentaram menores atividades quando comparada com os demais grupos, inclusive quando comparada aos animais que foram somente cultivados nas sementes de *V. unguiculata* (Fig. 7, *Vc*). Isto pode estar relacionado a um possível estresse que esses animais enfrentam na passagem do interior dos grãos para eppendorfs contendo farinha destas sementes. Os padrões de α -amilases também foram analisadas em ensaios em gel SDS-PAGE 7,5%, conjuntamente com os controles positivos e negativos de indução (*Vc* e *Pc*, respectivamente) (Fig. 8). O período de 48 horas de desafio alimentar pelas farinhas das sementes de *P. lunatus* e *P. vulgaris*, foi suficiente para resposta de indução das duas isoformas de α -amilase (Z1 e Z2) nas larvas de *Z. subfasciatus*. Este padrão de indução foi similar ao encontrado nas larvas retiradas do cultivo de *P. vulgaris* (*Pc*), diferente da expressão basal encontrada tanto nas larvas retiradas do cultivo de *V. unguiculata* (*Vc*) quanto as ofertadas a farinhas das mesmas (raia 2).

Figura 7: Atividade de α -amilase digestiva *in vitro* das larvas de *Z. subfasciatus* submetidas a pulsos alimentares com farinhas dos feijões de *Vigna unguiculata*, *Phaseolus lunatus* e *P. vulgaris*. Vc - Larvas cujo desenvolvimento ocorreu em sementes de *V. unguiculata*; Pc - Larvas cujo desenvolvimento ocorreu em sementes de *P. vulgaris*. A- Representação da atividade específica. B – Representação de atividade por animal. Estes dados são médias representativas da repetição de quatro experimentos independentes contendo 10 insetos cada.

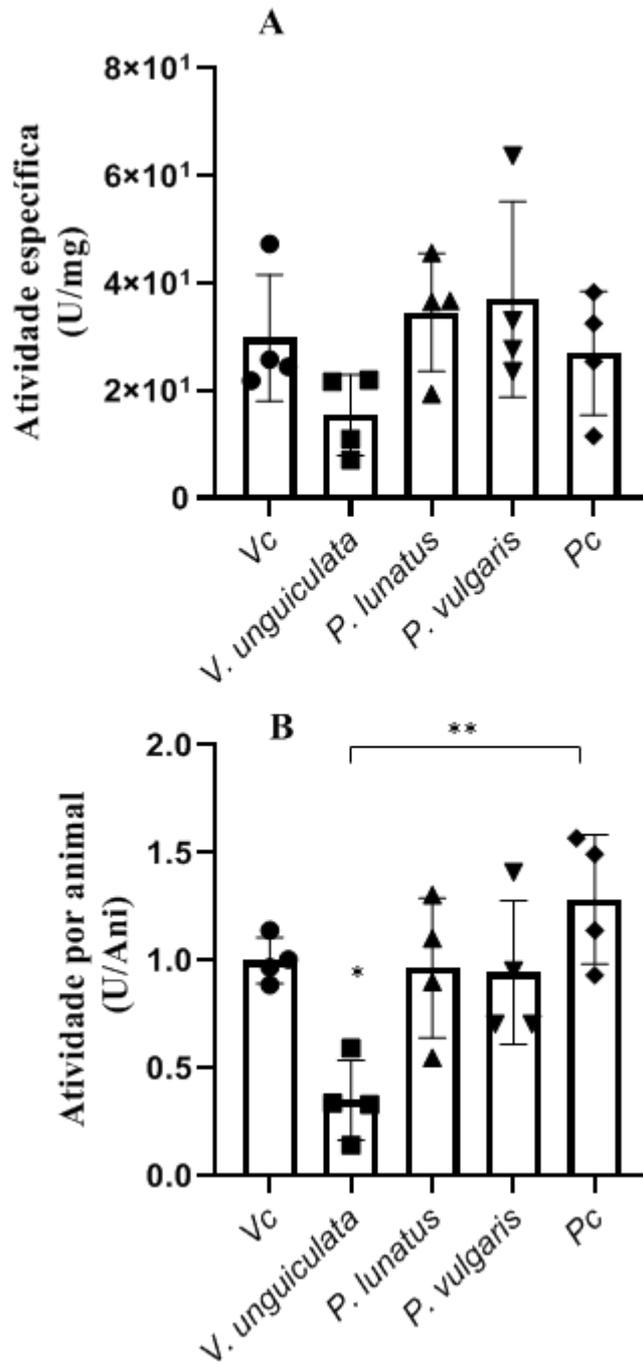
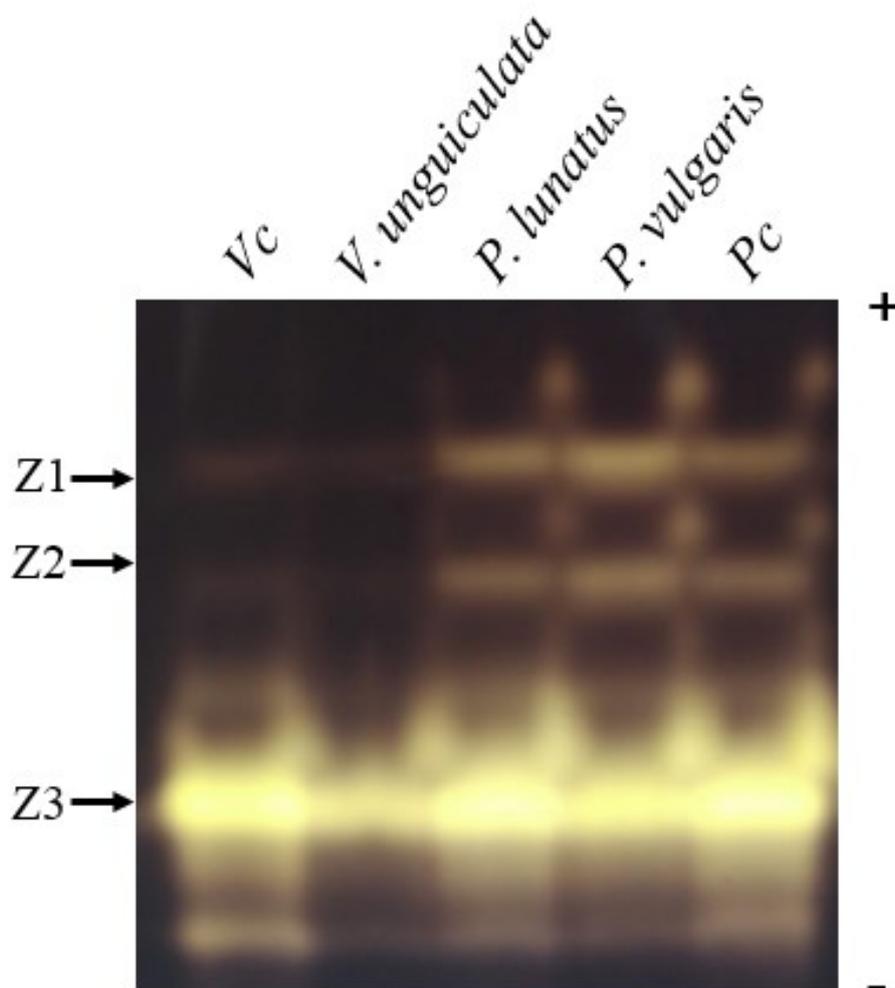


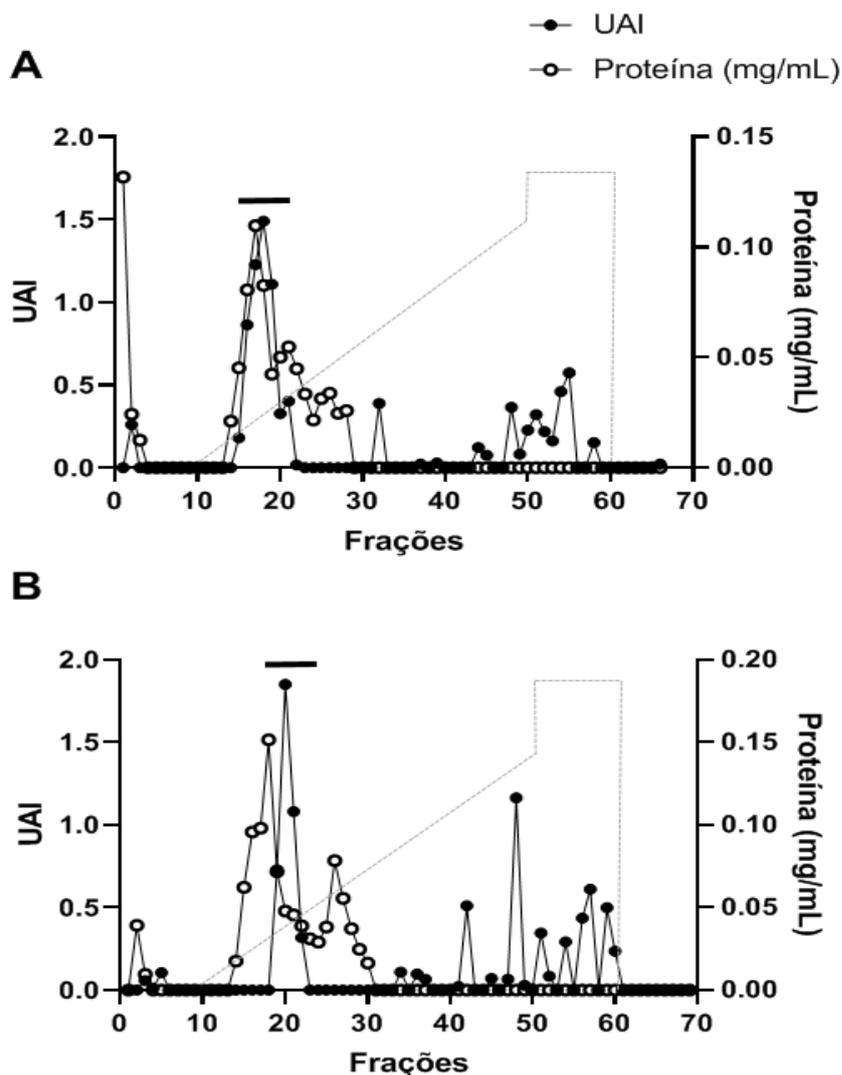
Figura 8: Gel SDS-PAGE 7,5% do padrão de atividade de α -amilases digestivas das lavas de *Z. subfasciatus* em 4º instar de desenvolvimento após um pulso alimentar de 48h com farinhas de *V. unguiculata* (raia 2), *P. lunatus* (raia 3) e *P. vulgaris* (raia 4). Foi aplicado um equivalente de 0.5 animal por raia. Após a migração eletroforética e renaturação das proteínas, as atividades foram analisadas. Vc - Larvas cujo desenvolvimento ocorreu em sementes de *V. unguiculata*; Pc - Larvas cujo desenvolvimento ocorreu em sementes de *P. vulgaris*. Z1 e Z2 indicam a duas isoformas induzidas de α -amilase. Z3 mostra a isoforma constitutiva da α -amilase.



3.2 ANÁLISE DE PRESENÇA DE ATIVIDADE INIBITÓRIA DE ALFA-AMILASE NAS SEMENTES DE *PHASEOLUS LUNATUS*

Para um método discriminativo para a presença ou não de atividade inibidora de α -amilase nas sementes de *P. lunatus*, foram realizadas cromatografias de troca iônica com os extratos proteicos totais das sementes de *P. lunatus* e *P. vulgaris*. As frações resultantes destas cromatografias foram coletadas e passaram por uma pré-incubação com a amilase pancreática suína (PPA) e após mensuradas a atividade de α -amilase, sendo estas comparadas com as atividades da PPA pré-incubadas sem a adição das frações e somente com tampão imidazol 10 mM (pH 6,7) (Fig. 9). Foram encontradas atividades inibitórias de α -amilase nas frações coletadas de sementes de *P. lunatus* em pontos muito similares aos encontrados nas frações das sementes de *P. vulgaris* (Fig. 9, barras pretas). As atividades inibitórias encontradas nas frações de *P. lunatus* apresentaram uma inibição mais branda quando comparadas às frações de *P. vulgaris*. Observou-se, também, outros picos de inibição que foram considerados inespecíficos ou artefatuais, uma vez que estes não demonstraram ser constantes com a repetição dos experimentos e por não apresentaram quantidades mensuráveis de proteína nestas frações.

Figura 9: Cromatografia de troca iônica para presença de inibidores de α -amilases a partir dos extratos das sementes de *P. lunatus* (A) e *P. vulgaris* (B). Aplicado extrato proteicos totais dos feijões em coluna RESOURCE™ Q equilibrada com tampão imidazol 10 mM, pH 6,7. A coluna primeiramente foi lavada com 5 mL de tampão de equilíbrio e depois eluída num gradiente linear de NaCl 0-800 mM em tampão imidazol em seguida por duas eluições isocráticas de NaCl 1 M e de tampão de equilíbrio. Fluxo seguiu em 1.0 mL.min⁻¹ sendo coletadas frações de 1 mL. Frações coletadas tiveram suas proteínas quantificadas e feitos ensaios de inibição com a PPA. Linhas tracejadas correspondem aos gradientes usados ao longo da cromatografia. Uma unidade de atividade inibitória (UAI) equivale a diminuição de metade da atividade de PPA sem a adição de fração. Estes dados são representativos da repetição de quatro experimentos independentes.



As frações de *P. lunatus* e *P. vulgaris* que obtiveram atividade inibitória sobre a PPA foram unidas numa única fração (Fig. 9, barras pretas), chamadas agora e adiante de *QL* e *QV*, respectivamente. Como as análises anteriores foram pontuais, estas amostras agora unidas foram reavaliadas quanto a presença de atividade inibitória de α -amilases. Para isto, diferentes volumes de *QL* e *QV* foram pré-incubados juntamente com a PPA. Após esta pré-incubação, suas atividades foram quantificadas e comparadas com as atividades da PPA pré-incubada somente em tampão imidazol 10 mM, pH 6,7 (Fig. 10). O aumento do volume tanto de *QL* como de *QV* culminou com uma diminuição da atividade absoluta da PPA e consequente aumento da unidade de atividade inibitória (UAI). Foi observado uma inibição mais acentuada vindo de *QV* quando estes são comparados com *QL*. Não obstante, estes resultados confirmam a presença de atividade de inibitória de α -amilase contida nestas amostras.

Uma vez confirmada a presença de atividade inibitória de α -amilases nestas frações, partimos por analisar o padrão de proteínas presentes em *QL* e *QV*. Primeiramente, as amostras foram concentradas, por apresentarem baixa quantidade de proteína (*QL* - $0,05 \pm 0,01$ mg/mL; *QV* - $0,04 \pm 0,01$ mg/mL), e então foram aplicadas, juntamente com os extratos proteicos totais destas sementes, em géis SDS-PAGE 13,5 % (Fig. 11). Todas as amostras foram aplicadas com quantidades equivalentes de proteínas, sendo $6,75 \mu\text{g}$ de proteína por raia. Os padrões de bandas encontrados em *QL* e *QV* demonstram ser muito similares. Em relação a *QL* observamos que esta fração é enriquecida, de maneira mais proeminente, de uma proteína com massa molar relativa (M_r) de 30,8 kD, e, numa proporção mais branda, de uma proteína de menor mobilidade eletroforética com a M_r de 102,29 kD. Este padrão basicamente se repete em *QV*, apresentando um maior enriquecimento também de uma proteína de maior migração eletroforética com a M_r de 32,03 kD, sendo esta circundada por outras bandas de menor intensidade com M_r s de 39,01 kD e 25,02 kD. Nesta fração também foi observado uma proteína de menor migração eletroforética com M_r de 118,42 kD, sendo esta de maneira mais acentuada quando comparado a *QL*.

Figura 10: Efeito do aumento de volume de QL e QV (A e B, respectivamente) sobre a atividade da PPA. Uma unidade de atividade inibitória (UAI) equivale a redução de metade da atividade de PPA sem a incorporação das frações em meio de reação. Cada valor é a média \pm DP de três experimentos independentes.

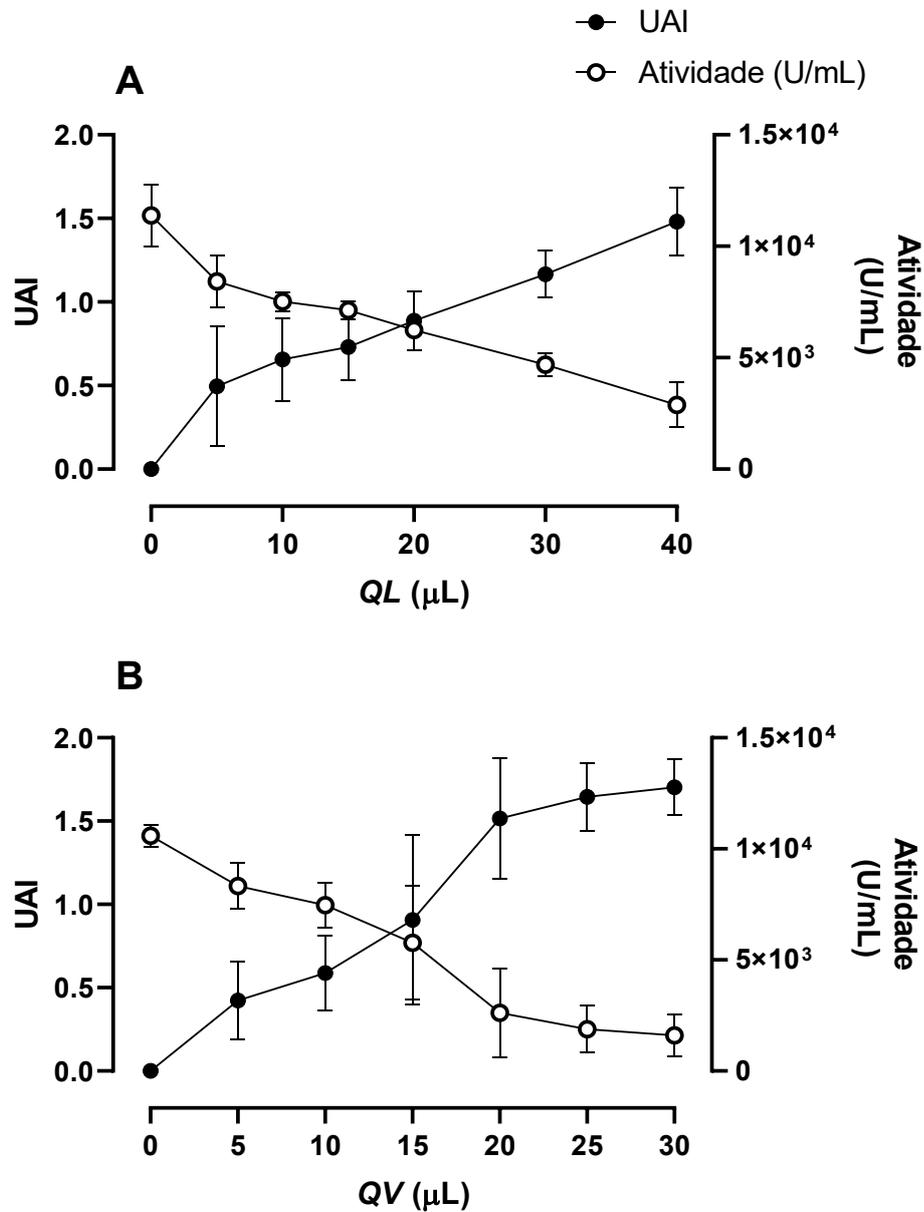
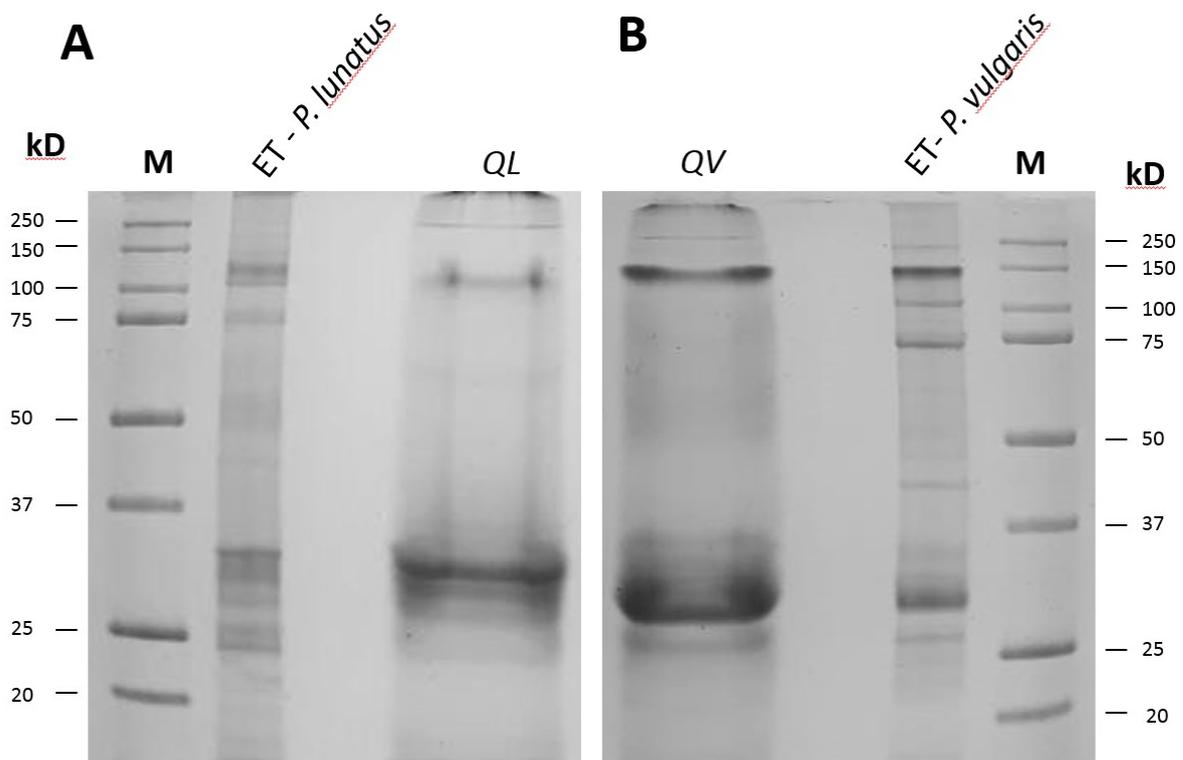


Figura 11: Visualização do padrão de proteínas presentes em *QL* (A) e *QV* (B) em gel SDS-PAGE 13,5%, utilizando o corante azul brilhante de comassie para visualização das bandas. Foram aplicadas equivalentes de proteínas entres os extratos proteicos totais e as amostras. ET – Extratos proteico total das sementes de *P. lunatus* (A) e *P. vulgaris* (B). M – Marcador de peso molecular 10-250 kD.



Após *QL* e *QV* mostrarem semelhanças em relação a presença de atividade inibitória de α -amilase e padrão de bandas em géis de eletroforese SDS-PAGE (Fig. 10 e 11). Foram analisadas se esta similaridade também se mantém em relação a parâmetros cinéticos de sua inibição. Inicialmente, foram feitas estimativas das concentrações molares das proteínas presentes nas frações *QL* e *QV* (ver item 2.9). As proteínas levadas em conta para esta estimativa foram a de *Mr* 30,80 kD de *QL* e *Mr* 32,03 kD de *QV* por dois motivos: (1) Foram as proteínas majoritárias presentes nestas amostras; (2) A proteína de *Mr* 32,03 kD em *QV* provavelmente corresponde à proproteína α -AI-1 não processada, como já observado e sugerido por Moreno e Chrispeels (1989), Pueyo, Hunt e Chrispeels (1993) e Berre-Anton e colaboradores (1997). Partindo deste pressuposto, foi estimada a proteína de *Mr* 30,80 kD em *QL* que provavelmente corresponde as proteínas AIL observados por Sparvoli e colaboradores (1998 e 2001).

Portanto, foram analisadas as cinéticas enzimáticas da PPA sob diferentes concentrações de *QL* e *QV*. A utilização de *QV* foi para um propósito comparativo, uma vez que o padrão de inibição do α -AI-1, contido nestas sementes, já é bem caracterizado (BERRE-ANTON, et al. 1997; SANTIMONE et al. 2004). Novamente, *QL* e *QV* demonstraram semelhanças em relação aspectos da sua inibição sob a PPA (Fig. 12). Em ambos, o aumento da concentração de *QL* e *QV*, em meio de reação, ocasionaram a diminuição tanto no K_m quanto na $V_{m\acute{a}x}$, (Tabela 1 e 2). Ao analisar o gráfico de Lineweaver-Burk da atividade de PPA, também foi possível observar este padrão além de um cruzamento de retas no segundo quadrante (Fig. 12 e 13 A). Os gráficos secundários feitos a partir dos dados de Lineweaver-Burk também foram muito similares (Fig. 12 e 13, B e C). Em relação ao gráfico que compara os ângulos destas retas com a concentração de *QL* e *QV* (Fig. 12 e 13, B), em ambos tiveram um aumento dos ângulos conforme o aumento da concentração de *QL* e *QV*, sendo mais proeminente em *QV*. A única diferença foi observado no terceiro gráfico (Fig. 12 e 13, C). Este relaciona o inverso da diferença dos ângulos de inclinação (ângulo da reta com inibidor menos o ângulo da reta sem o inibidor) com o inverso da concentração de *QL* e *QV*. Foi observado que *QL* apresentou um padrão hiperbólico enquanto que em *QV* sigmoide, porém ambos continuaram apresentando o aumento dos ângulos de inclinação conforme o aumento das concentrações de *QL* e *QV*. Foram também estimados as constantes de inibição (K_i) destes inibidores, sendo que para *QL* foi de $0,36 \pm 0,03 \mu\text{M}$ e para *QV* $0,14 \pm 0,01 \mu\text{M}$.

Figura 12: Cinética enzimática da atividade de PPA sob diferentes concentrações de *QL* (● - 0; ■ - 0,13; ▲ - 0,16; ▼ - 0,22; ◆ - 0,32 e ○ - 0,65 μM) (A), *QV* (● - 0; ■ - 0,10; ▲ - 0,13; ▼ - 0,17; ◆ - 0,25 e ○ - 0,50 μM) (B) e de amido solúvel em tampão acetato de sódio 250 mM, pH 5.5. Os dados foram calculados a partir da média \pm DP de quatros experimentos independentes.

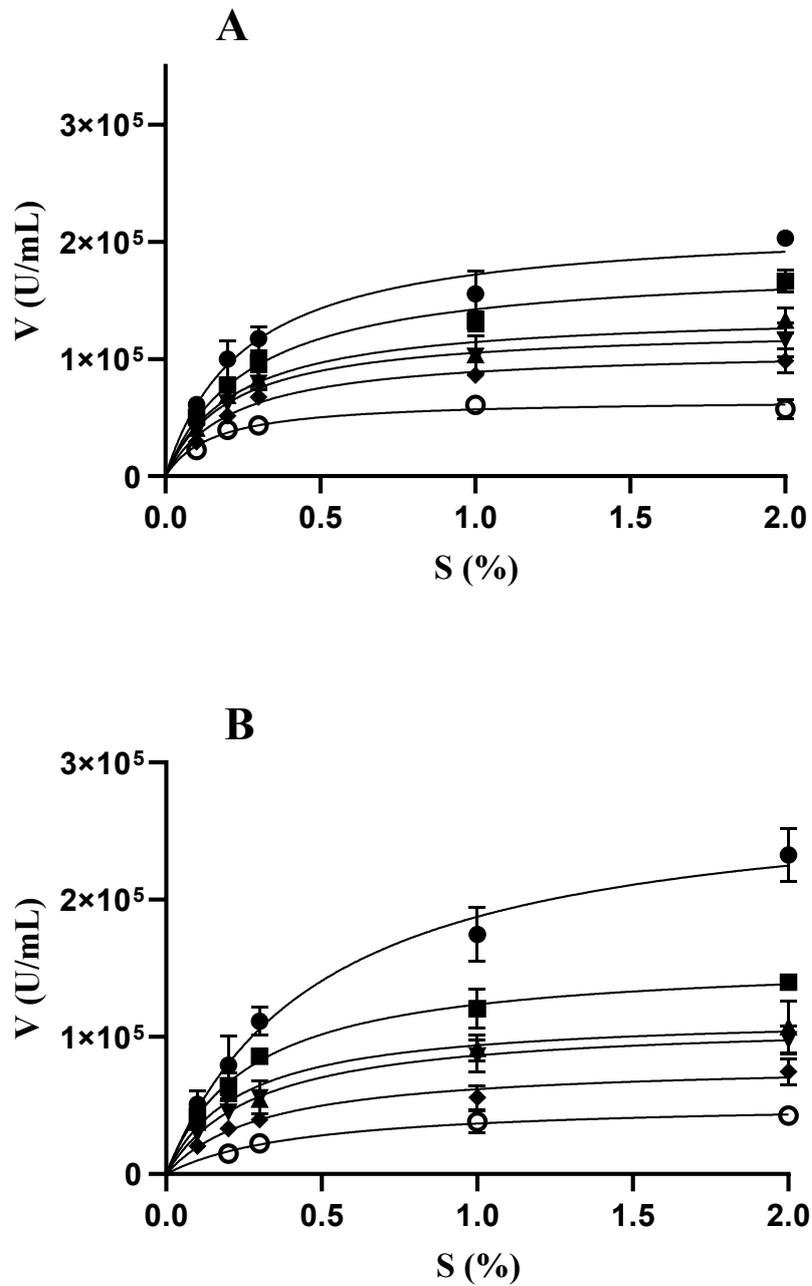


Tabela 1: Valores de Velocidade máxima e de Km a partir da cinética enzimática da atividade da PPA sob diferentes concentrações de *QL*. Os dados foram calculados a partir da média de quatros experimentos independentes.

<i>QL</i>	V_{máx}	K_m
0 μM	215.930	0,26
0,13 μM	180.867	0,27
0,16 μM	140.241	0,23
0,22 μM	127.263	0,21
0,32 μM	108.762	0,22
0,65 μM	65.766	0,15

Fonte: Autor

Tabela 2: Valores de Velocidade máxima e de Km a partir da cinética enzimática da atividade da PPA sob diferentes concentrações de *QV*. Os dados foram calculados a partir da média de quatros experimentos independentes.

<i>QV</i>	V_{máx}	K_m
0 μM	280.719	0,50
0,1 μM	157.214	0,27
0,13 μM	116.498	0,24
0,17 μM	111.876	0,29
0,25 μM	81.621	0,32
0,5 μM	53.042	0,44

Fonte: Autor

Figura 13: Parâmetros cinéticos da atividade inibitória de *QL*. (A) Gráfico de Lineweaver-Burk da atividade de PPA e com diferentes concentrações de *QL* (● - 0; ■ - 0,13; ▲ - 0,16; ▼ - 0,22; ◆ - 0,32 e ○ - 0,65 μM) e de amido solúvel em tampão acetato de sódio 250 mM, pH 5.5. (B) Ângulos extraídos do gráfico de Lineweaver-Burk com as diferentes concentrações de *QL*. (C) Gráfico do inverso da diferença dos ângulos de inclinação com o inverso da concentração de *QL*. Os ângulos foram calculados a partir da regressão linear usando a média \pm DP de quatros experimentos independentes.

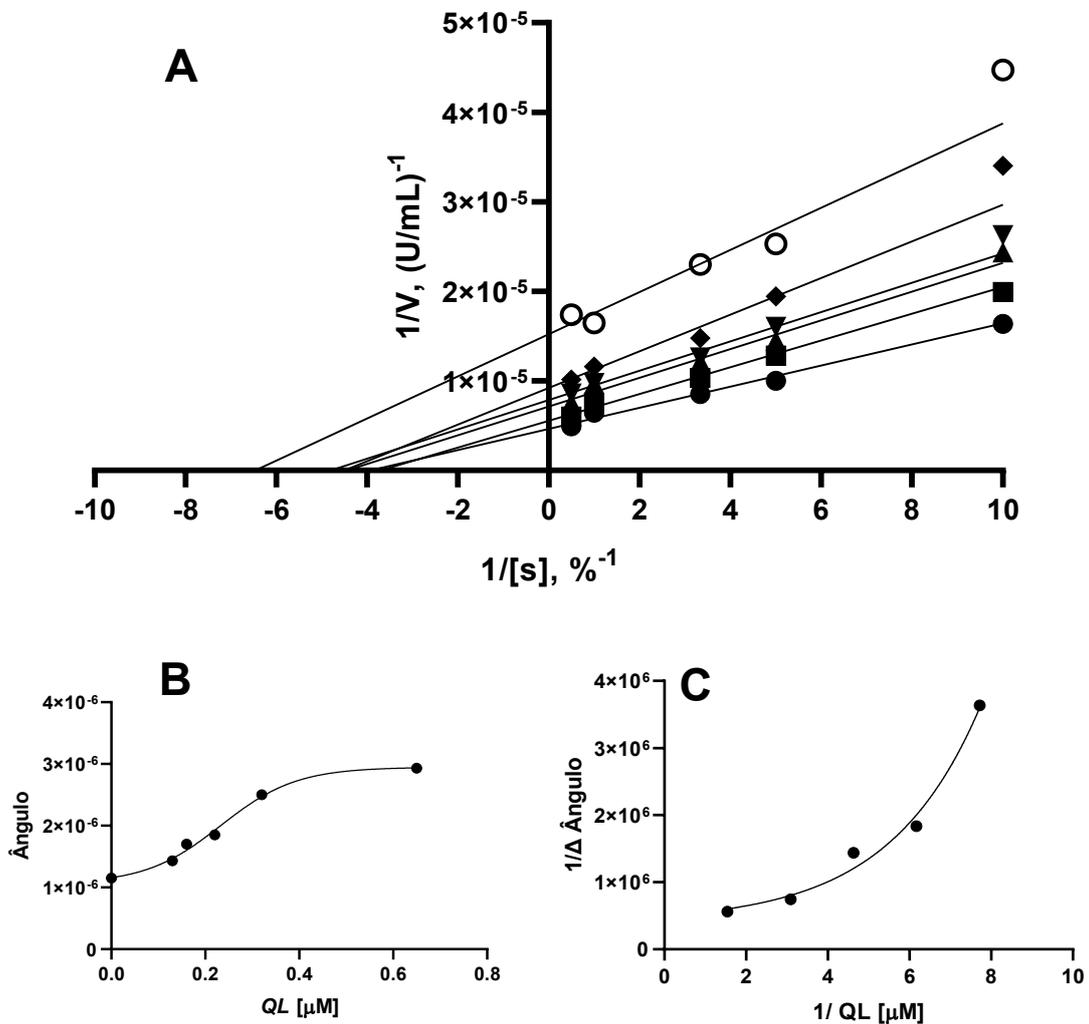
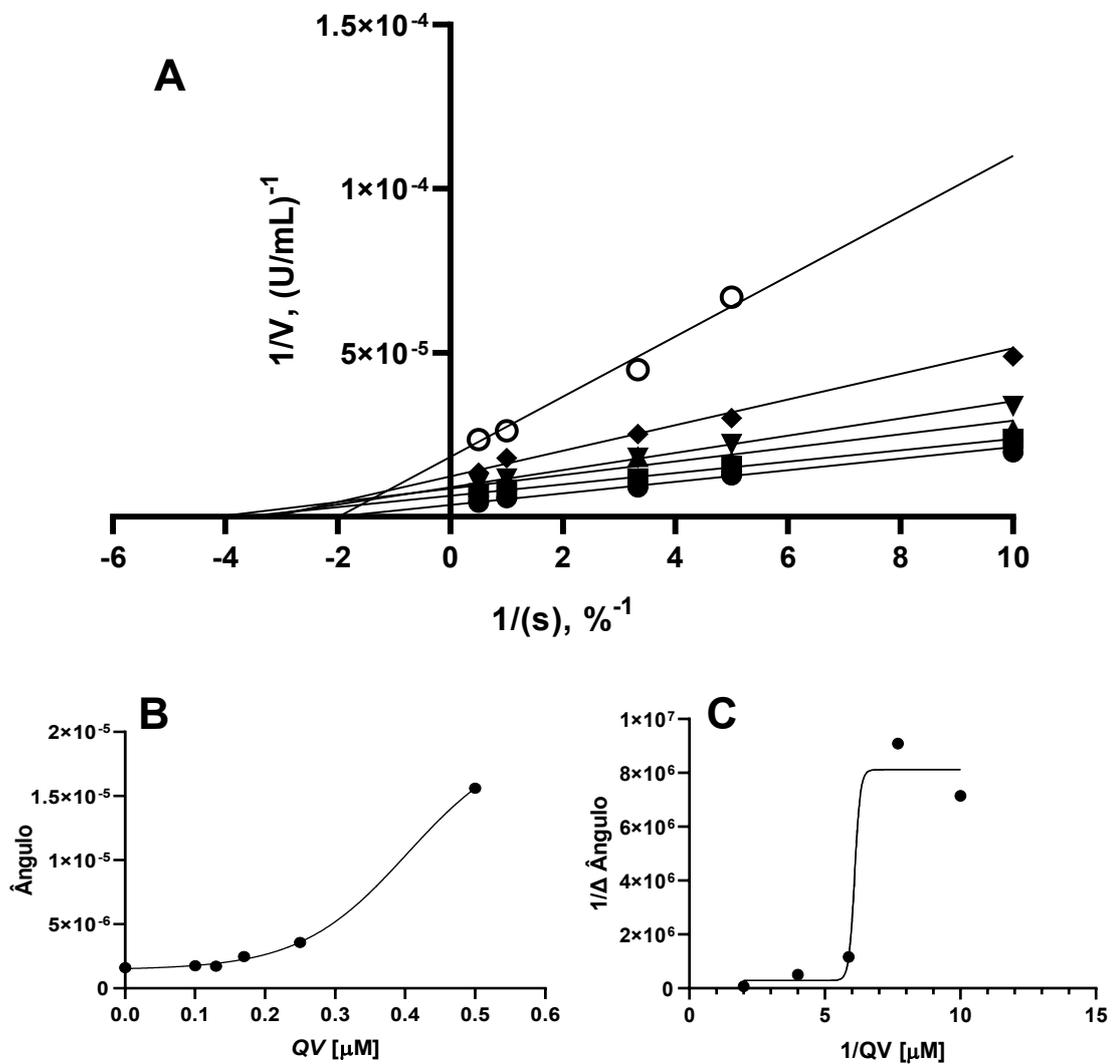


Figura 14: Parâmetros cinéticos da atividade inibitória de *QV*. (A) Gráfico de Lineweaver-Burk da atividade de PPA usando diferentes concentrações de amido solúvel (%) e de *QV* (● - 0; ■ - 0,10; ▲ - 0,13 ; ▼ - 0,17 ; ◆ - 0,25 e ○ - 0,50 μM) (B) Ângulos extraídos do gráfico de Lineweaver-Burk com as diferentes concentrações de *QV*. (C) Gráfico do inverso da diferença dos ângulos de inclinação com o inverso da concentração de *QV*. Os ângulos foram calculados a partir da regressão linear usando a média \pm DP de quatros experimentos independentes.



4 DISCUSSÃO

A modulação de enzimas digestivas em larvas de *Z. subfasciatus*, devido a presença de α -AI-1 nas sementes de *P. vulgaris*, foi primeiramente demonstrado por Silva e colaboradores (2001b). Esta seria uma resposta adaptativa, visto que as duas novas isoformas de α -amilase são insensíveis a presença do α -AI-1, quando comparadas com intensidade com que a isoforma constitutiva é inibida (SILVA et al., 2001b). Estes autores também observaram este evento quando as larvas de *Z. subfasciatus* foram cultivadas em sementes de *P. lunatus*, sendo o motivo desta indução algo ainda a ser investigado. Neste trabalho foi identificado a presença de um inibidor de α -amilase também nas sementes de *P. lunatus* (Fig. 12), podendo este ser o principal responsável por promover a modulação de enzimas digestivas nas larvas de *Z. subfasciatus* (Fig. 6 e 8). Futuras análises de como este inibidor atua sobre as α -amilases destes insetos, pode trazer maiores informações se esta resposta tem um papel similar à resposta com o α -AI-1 de *P. vulgaris*. Não obstante, estes resultados indicam uma versatilidade presente nas larvas de *Z. subfasciatus* em reconhecer inibidores proteicos presentes no gênero *Phaseolus*, uma vez que promovem a indução de α -amilases quando ofertado a estas duas sementes.

Bifano e colaboradores (2010) elaboraram pulsos alimentares para análise da resposta das larvas de *Z. subfasciatus* aos α -AI-1 presente nas sementes de *P. vulgaris*, e observaram que 48 horas foi tempo suficiente para indução das duas isoformas de α -amilase. Similar a isto, esta rápida modulação de enzimas digestivas também se repete quando as larvas são submetidas a pulsos alimentares feitos a partir das sementes de *P. lunatus* (Fig. 7). Esta imediata resposta sugere que exista um semelhante reconhecimento e resposta das larvas de *Z. subfasciatus* aos inibidores de α -amilase presentes nas sementes de *P. lunatus* e de *P. vulgaris*. Ao observar a biologia destes insetos, é relevante a presença desta rápida resposta adaptativa, uma vez que as larvas destes insetos não podem sair destas sementes e se locomover para se alimentar de outra fonte alimentícia (NISHIZAWA et al., 2007).

Os detalhes de como os insetos conseguem detectar a presença de inibidores proteicos e os processos que culminam para a expressão e secreção de enzimas digestivas ainda são desconhecidos (JONGSMA; BOLTER, 1997). Ishimoto e colaboradores (1996), demonstraram que as larvas de *Z. subfasciatus* promovem hidrólise do α -AI-1 de *P. vulgaris*, por uma protease do tipo serínica, liberando um peptídeo C-terminal. Ainda, há evidências de que existem receptores nas microvilosidades dos enterócitos das larvas de *Z. subfasciatus* que reconhecem

e se ligam aos α -AI-1 (BIFANO et al., 2010). A hipótese levantada pelo nosso grupo de trabalho é que estes eventos de hidrólise do peptídeo C-terminal e posterior ligação as membranas microvilares, sejam importantes para acionar uma cascata de reações que culminam para a expressão e secreção das duas novas isoformas de α -amilase. Ambos os eventos podem também estar ocorrendo com o inibidor de α -amilase presente nas sementes de *P. lunatus*, o que pode trazer maiores informações sobre a importância deste evento de hidrólise e dos mecanismos subjacentes à modulação de enzimas digestivas em insetos.

Durante toda a análise da presença e caracterização de atividade inibitória de α -amilase nas sementes de *P. lunatus*, foram utilizadas conjuntamente amostras oriundas das sementes de *P. vulgaris* com o intuito comparativo e de controle das técnicas, uma vez que estas sementes possuem atividade inibitória de α -amilase advinda da presença dos α -AI-1. Os inibidores de α -amilase presente nas sementes de *P. lunatus* mostraram uma inibição menos proeminente quando comparada com a inibição vista nas sementes de *P. vulgaris*. Importante ressaltar que os ensaios envolvendo as frações de cromatografia e posteriores ensaios de QL e QV (Fig. 9 e 10, respectivamente) não foram alinhadas com as quantidades de proteína presentes nestas amostras, podendo ter impacto em relação às diferenças de intensidade de inibição observadas entre estas sementes. Ao comparar as constantes de inibição (K_i) de QL e QV ($0,36 \pm 0,03 \mu\text{M}$ e $0,14 \pm 0,01 \mu\text{M}$, respectivamente) é observado uma tendência de maior eficiência dos inibidores presentes nas sementes de *P. vulgaris* em inibir a PPA quando comparados ao inibidor presente nas sementes de *P. lunatus*.

Os inibidores de α -amilase de *P. lunatus* e *P. vulgaris* apresentaram grande semelhança em relação a cinética inibitória sobre a PPA (Figs., 12 e 13). Ambos apresentaram características de um inibidor não competitivo misto, ou seja, ambos devem se ligar às enzimas livres e também aos complexos enzima-substrato (ES). Corroborando com isto, Santimone e colaboradores (2004) também demonstraram a atuação de um inibidor não competitivo misto ao analisar a cinética de inibição do α -AI-1, de *P. vulgaris*, sob a atividade da PPA. Estes autores sugerem que os α -AI-1 formam diferentes complexos com a PPA que surgem a partir do complexo enzima-inibidor (EI) (E_2I , EI_2 , ESI e ESI_2). Dada as similaridades entre os inibidores de *P. lunatus* e *P. vulgaris* é possível que estes complexos também estejam sendo formados. No entanto, futuras análises em relação a cinética inibitória sobre a PPA devem ser refeitas com frações mais purificadas com o inibidor de α -amilase de *P. lunatus*, uma vez que as concentrações molares apresentadas aqui foram advindas de cálculos estimados e por apresentarem mais de uma proteína nestas frações (Fig. 11).

As similaridades apresentadas até aqui entre os inibidores de α -amilase de *P. lunatus* e *P. vulgaris*, também se mantêm quando analisada as proteínas presentes nas frações QL e QV (Fig. 11). Como já dito anteriormente, a banda de *Mr* 32,03 kD na fração QV (Fig. 11 B) provavelmente corresponde a forma não processada do inibidor α -AI-1, enquanto que as proteínas de *Mrs* de 39,01 kD e 25,02 kD provavelmente são representações de diferentes glicosilações do α -AI-1 (MORENO; CHRISPEELS, 1989; BERRE-ANTON et al., 1997). Relacionado a isto, a proteína de *Mr* 30,80 kD em QL é a provável responsável pela atividade inibitória de α -amilase encontrada nestas frações, uma vez que possuem similares valores de *Mr* aos α -AI-1 não processados e por haver outros lotes com a presença de atividade inibitória e ausência da proteína de *Mr* de 102,29 kD (Dados não apresentados). Corroborando com esta hipótese, Sparvoli e colaboradores (1998 e 2001) observaram a presença de proteínas semelhantes aos α -AI-1 (AIL) em sementes de *P. lunatus*, que apresentaram diferentes *Mrs* conforme a origem de seu pool gênico, sendo as de origem Andina em torno de 40 e 42 kD e Mesoamérica de 34 e 37 kD, o que reforça a possibilidade de que as proteínas de *Mr* 30,80 kD em QL sejam o inibidor de α -amilase em *P. lunatus*. Futuras análises com o foco no sequenciamento das proteínas de *Mr* 30,80 kD em QL e posterior comparação com as sequências AIL depositadas e caracterizadas por Sparvoli e colaboradores (1998 e 2001), poderia trazer mais confirmações sobre a identidade destas proteínas.

Pueyo e colaboradores (1993) ao avaliar se a forma não processada do α -AI-1 de *P. vulgaris* poderia ter atividade inibitória sobre PPA, realizaram uma mutação sítio dirigida no gene que codifica α -AI-1, transformando o aminoácido Asn⁷⁷, sítio de hidrólise da proproteína, para Asp⁷⁷ e expressaram em plantas de tabaco. Estes autores observaram a presença de atividade inibitória de α -amilase presente somente nas formas hidrolisadas e ativas do α -AI-1. Porém, chama a atenção a presença de eventos de hidrólise do α -AI-1 mesmo na ausência do sítio Asn⁷⁷, sugerindo a existência de clivagens aberrantes advindas de asparaginas próximas (Asn⁶⁵ e Asn⁶⁹). Ao analisar as sequências depositadas de AIL (GenBank: CAB96394.1; CAB96395.1) encontrada por Sparvoli e colaboradores (2001), não é observado a presença de Asn⁷⁷ nestas sequências, porém consta a presença de asparaginas em regiões próximas - Asn⁸¹ e Asn⁸⁷. Isto pode estar relacionado com os dados obtidos por Sparvoli e colaboradores (1998), que constataram a presença de proteínas de 40 kD e subunidades menores de 15 e 29 kD, sendo estas últimas possivelmente advindas de maturações proteolíticas da subunidade maior (que foram identificadas com anticorpo anti- α -AI-1 em frações advindas de cromatografias de troca iônica de amostras proteicas totais de sementes de *P. lunatus*). Neste trabalho, não foi possível

observar a presença de proteínas menores de 20 kD nos géis realizados, o que poderia apresentar as formas hidrolisadas e ativas do α -AI-1 e possíveis hidrolisados advindos da banda de *Mr* 30,80 kD em QL. No entanto, não é descartado a possibilidade de eventos de hidrólise proteolítica em AIL e nas proteínas *Mr* 30,80 kD em sementes de *P. luntus*, o que segue ainda a ser elucidado.

Portanto, os resultados apresentados aqui mostraram a presença de diversas similaridades entre os inibidores de α -amilase presentes nas sementes de *P. lunatus* e *P. vulgaris*. Importante ressaltar que a completa caracterização do inibidor de *P. lunatus*, pode trazer novas informações em torno da evolução do locus gênico APA dentro do gênero *Phaseolus*. Não obstante, também aumentar o número de proteínas potencialmente tóxicas intrínsecas de plantas que podem ser usadas, por métodos de engenharia genética, em plantas de interesse econômico que são alvos de insetos praga. Futuros experimentos para estes propósitos estão em andamento no laboratório.

5 CONCLUSÃO

- Foi constatado a presença de inibidor de α -amilase nas sementes de *P. lunatus*, sendo este o provável responsável por promover a modulação de enzimas digestivas nas larvas de *Z. subfasciatus*.
- Uma rápida modulação de enzimas digestivas nas larvas de *Z. subfasciatus*, a partir do desafio alimentar pelas farinhas das sementes de *P. lunatus*, indica grande semelhança no reconhecimento e resposta aos inibidores de α -amilase presentes nas sementes de *P. lunatus* e de *P. vulgaris*.
- O inibidor de α -amilase nas sementes de *P. lunatus* possui a característica de um inibidor não competitivo misto, sendo este menos eficiente ao inibir a PPA quando comparado com o α -AI-1 de *P. vulgaris*.
- A proteína de *Mr* 30,08 kD em QL provavelmente corresponde a forma não processada do inibidor de α -amilase de *P. lunatus*, sendo que não foi possível constatar prováveis hidrolisados advindos dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- ANDOW, D. A., FITT G. P., GRAFUS E. J., JACKSON R. E., RADCLIFFE, E. B., RAGSDALE, D. W., ROSSITER, L. **Pesticide and transgenic plant resistance management in the field. Global Pesticide Resistance in Arthropods.** Whalon ME, Mota Sanchez D & Hollingsworth RM (Ed.), CAB International, Wallingford, UK., p. 118-144, 2008.
- AZEVEDO, J.N.; FRANCO, L.J.D.; ARAÚJO, R.O.C. **Composição química de sete variedades de feijão-fava.** Embrapa Meio-Norte, p. 1-4, 2003.
- BAUDOIN, J-P, ROCHA, O., DEGREEF, J., MAQUET, A., GUARINO, L. Ecogeography, demography, diversity and conservation of *Phaseolus lunatus* L. in the Central Valley of Costa Rica. **Systematic and ecogeographic studies on crop gene pools**, n. 12, p. 84, 2004.
- BERRE-ANTON, V., BOMPARD-GILLES, C., PAYAN, F., ROUGÉ, P. **Characterization and functional properties of the α -amylase inhibitor (α -AI) from kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology, v. 1343, n. 1, p. 31-40, 1997.
- BIFANO, T. D., SAMUELS, R. I., ALEXANDRE, D., SILVA, C. P. **Host-mediated induction of α -amylases by larvae of the Mexican bean weevil *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) is irreversible and observed from the initiation of the feeding period.** Archives of Insect Biochemistry and Physiology, v. 74, n. 4, p. 247–260, 2010.
- BLAIR, M. W., GONZÁLEZ, L. F., KIMANI, P. M., BUTARE, L. **Genetic diversity, inter-gene pool introgression and nutritional quality of common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from Central Africa.** Theoretical and Applied Genetics, v. 121, n. 2, p. 237-248, 2010.
- BOMPARD-GILLES, C., ROSSEAU, P., ROUGÉ, P., PAYAN, F. **Substrate mimicry in the active center of a mammalian α amylase: structural analysis of an enzyme–inhibitor complex.** Structure, v. 4, p. 1441-1452, 1996.
- BONET, A., B. LEROI, J. C., BIEMONT, G., PEREZ B., PICHARD, B. **Has the *Acanthoscelides obtectus* group evolved in the original zone of its host plant (*Phaseolus* L.)?** In: LABEYRIE, V., FABRES, G., LACHAISE, D. (Ed.), *Insects-Plants*. Junk Publishers, p. 378, 1987.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical biochemistry, v. 72, n. 7, p. 248-254, 1976.
- BRUSCA, R.C., BRUSCA, G.J. **Invertebrados.** Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2^a ed. 968p, 2007.

- CAMPBELL, P. M., REINER, D., MOORE, A. E., LEE, R. Y., EPSTEIN, M. M., HIGGINS, T. J. **Comparison of the α -amylase inhibitor-1 from common bean (*Phaseolus vulgaris*) varieties and transgenic expression in other legumes-post-translational modifications and immunogenicity**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.59, n. 11, p. 6047-6054, 2011.
- CARLINI, C. R.; GROSSI-DE-SÁ, M. D. **Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides**. Toxicon, v. 40, p. 1515–1539, 2002.
- CHRISPEELS, M. J., RAIKHEL, N. V. **Lectins, lectin genes, and their role in plant defense**. Plant cell, v. 3, n. 1, p. 1-9, 1991.
- DEBOUCK, D. G., TORO, O., PAREDES, O. M., JOHNSON, W. C., GEPTS, P. **Genetic Diversity and Ecological Distribution of *Phaseolus vulgaris* (Fabaceae) in Northwestern South America**. Economic Botany, v. 47, n. 4, p. 408–423, 1993.
- DECHECO, A., MONCADA, B., ORTIZ, M. **Desarrollo de *Zabrotes subfasciatus* sobre seis variedades de frijol en Lima**. Revista Peruana de Entomología. v. 29 p. 77-79, 1986.
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP; WHO. **The State of Food Security and Nutrition in the World 2019**. Safeguarding against economic slowdowns and downturns. Rome, FAO, 2019.
- FAOSTAT, Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAOSTAT (database)**. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>. Acessado em: 18 nov. 2019.
- FERY, R. L. **The cowpea: production, utilization, and re-search in the United States**. Horticultural Reviews, v. 12, p. 197-222, 1990.
- FILHO, F. R. F., RIBEIRO, V. Q., ROCHA, M. M., DAMASCENO E SILVA, K. J., NOGUEIRA, M. S. R., RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, p. 1-84, 2011.
- FINARDI-FILHO, F., MIRKOV, T. E., CHRISPEELS, M. J. **A putative precursor protein in the evolution of the bean α -amylase inhibitor**. Phytochemistry, v. 43, p. 57-62, 1996.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The future of food and agriculture – Trends and challenges**. Rome. 2017.
- GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARCALHO, R. P. L., BATISTA, G. C., BERTI FILHO, E., PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A., ALVES, S. B., VENDRAMIM, J. D. **Manual de entomologia agrícola**. Agronômica Ceres, p. 649, 1988.
- GILLES, C., ROSSEAU, P., ROUGÉ, P., PAYAN, F. **Crystallization and preliminary X-ray analysis of pig pancreatic α -amylase in complex with a bean lectin-like inhibitors**. Acta Crystallographica, v. D52, p. 581-582, 1996.

GOMES, W. S.; BORÉM, A. **Biotechnologia: novo paradigma do agronegócio brasileiro.** Revista de Economia e Agronegócio, v.11, n. 1, p. 115–136, 2013.

GUTIÉRREZ-SALGADO, A. GEPTS, P., DEBOUCK, D. G. **Evidence for two gene pools of the Lima bean, *Phaseolus lunatus* L., in the Americas.** Genetic Resources and Crop Evolution, V. 42, n. 1, p. 15-22, 1995.

HAMELRYCK, T., DAO-THI, M-H., POORTMANS, F., CHRISPEELS, M. J., WYNS, L., LORIS, R. **The Crystallographic Structure of Phytohemagglutinin-L.** Journal of Biological Chemistry, v. 271, p. 20479-20485, 1996.

HANCOCK, J.F. Protein plants, In: Hancock J.F. (Ed.) **Planta evolution and the origin of crop species.** CAB international Cambridge, 2 ed., p. 195-208, 2004.

HAINES, C. P. **Insects and arachnids of tropical stored products: Their biology and identification.** Natural Resources Institute, ed. 2, 1991.

HORTON, S., STECKEL, R.H. **Malnutrition: global economic losses attributable to malnutrition 1900–2000 and projections to 2050.** In B. Lomborg, ed. How much have global problems cost the world? p. 247–272, 2013. Cambridge, UK, Cambridge University Press.

HUESING, J. E., SHADE, R. E., CHRISPEELS, M. J., MURDOCK, L. **α -Amylase Inhibitor, Not Phytohemagglutinin, Explains Resistance of Common Bean Seeds to Cowpea Weevil.** Plant Physiology, v. 96, p. 993-996, 1991.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA.** Rio de Janeiro, v. 30, n. 1, p. 1-8, 2017.

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, v. 111, p. 393-401, 1996.

ISHIMOTO, M., KITAMURA, K. **Growth Inhibitory Effects of an α -Amylase Inhibitor from the Kidney Bean, *Phaseolus vulgaris* (L.) on Three Species of Bruchids (Coleoptera: Bruchidae).** Applied entomology and zoology, v. 24, p. 281-286, 1989.

ISHIMOTO, M., KITAMURA, K. **Tolerance to the Seed α -Amylase inhibitor by the Two Insect Pests of the Common Bean, *Zabrotes subfasciatus* and *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae).** Applied entomology and zoology, v. 27, p. 243-251, 1992.

ISHIMOTO, M., SATO, T., CHRISPEELS, M. J., KITAMURA, K. **Bruchid resistance of transgenic azuki bean expressing seed alpha-amylase inhibitor of common bean.** Entomologia Experimentalis et Applicata, v. 79, n. 3, p.309-315, 1996.

ISHIMOTO, M., SUZUKI, K., IWANAGA, M., KIKUCHI, F., KITAMURA, K. **Variation of seed α -amylase inhibitors in the common bean.** Theoretical Application Genetics, v. 90, p. 425-429, 1995.

- JACKAI, L. E. N., DAOUST, R. A. **Insect pest of cowpeas.** Annual Review of Entomology, v. 31, p. 95-119, 1986.
- JOGSMA, M. A., BOLTER, C. **The adaptation of insects to plant protease inhibitors.** Journal of Insect Physiology, v. 43, n. 10, p. 885-895, 1997.
- JOHNSON, C. D. **Seed Beetle Host Specificity and the Systematics of the Leguminosae.** Advances in Legume Systematics, v. 2, p. 995-1027, 1981.
- 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 an α -Amylase Inhibitor from Phaseolus vulgaris White Kidney Beans.** The Journal of Biochemistry, v., 120, p. 177-183, 1996.
- KINGSOLVER, J. M. **Handbook of the Bruchidae of the United States and Canada.** Technical Bulletin, n. 1912, v. 1, p. 1-324, 2004.
- LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I.; MENEZES, E. W. **Qualidade nutricional.** In: ARAUJO, R. S.; AGUSTÍN-RAVA, C.; STONE, L. F.; ZIMMERMANN, M. J. de O. (Coords.). Cultura do feijoeiro comum no Brasil. Piracicaba: Potafos, p. 71-99, 1996.
- LIOI, L., FALASSO, C. LANAVE, M., DAMINATI, G., BOLLINI, R., SPARVOLI, F. **Evolutionary analysis of the APA genes in the *Phaseolus* genus: wild and cultivated bean species as sources of lectin-related resistance factors?** Theoretical Application Genetics, v. 115, p. 959-970, 2007.
- LIOI, L., SPARVOLI, I., GALASSO, C., LANAVE, C., BOLLINI, R. **Lectin-related resistance factors against bruchids evolved through a number of duplication events.** Theoretical application Genetics, v. 107, p. 814-822, 2003.
- MARTÍNEZ-CASTILLO, J., CAMACHO-PÉREZ, L., VILLANUEVA-VIRAMONTES, S., ANDUEZA-NOH, R. H., CAMACHO-PÉREZ, M.I. **Genetic structure within the Mesoamerican gene pool of wild *Phaseolus lunatus* (Fabaceae) from Mexico as revealed by microsatellite markers: implications for conservation and the domestication of the species.** American Journal of Botany, v. 101, n.5, p. 851-864, 2014.
- MEHRABADI, M., FRANCO, O. L., BANDANI, A. R. **Plant preteinaceous alpha-amylase and proteinase inhibitors and their use in insect pest control.** New perpecrives in plant protection, Prof. Ali R. Bandani (Ed.), ISBN: 978-953-51-0490-2, 2012. In Tech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/new-perspectives-in-plant-protection/plant-proteinaceous-amylase-and-prteinase-inhibitors-and-their-use-in-insect-pest-control>
- MESQUITA, F. R., CORRÊA, A. D., ABREU, C. M. P., LIMA, R. A. Z., ABREU, A. F. B. **Linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.): composição química e digestibilidade protéica.** Ciência e Agrotecnologia, v. 31, n. 4, p. 1114–1121, 2007.

METCALF, R. L. **Applied Entomology in the Twenty-First Century**. American Entomologist, v. 42, n. 4, p. 216-227, 1996.

MIRKOV, T. E., WAHLSTROM, J. M., HAGIWARA, K., FINARDI-FILHO, F., KJEMTRUP, S., CHRISPEELS, M. **Evolutionary relationships among proteins in the phytohemagglutinin-arcelin- α -amylase inhibitor family bean and its relatives**. Plant Molecular Biology, v. 26, p. 1103-1113, 1994.

MORENO, J., CHRISPEELS, M. **A lectin gene encodes the α -amylase inhibitor of the common bean**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), v. 86, p. 7885-7889, 1989.

MOSOLOV, V. V.; GRIGOR'EVA, L. I.; VALUEVA, T. A. **Involvement of proteolytic enzymes and their inhibitors in plant protection (review)**. Applied Biochemistry and Microbiology, v. 37, n. 2, p. 115-123, 2001.

MYERS, J. R., KMIETIK, K. **Common Bean: Economic Importance and Relevance to Biological Science Research**. The Common Bean Genome, p. 1-20, 2017.

NISHIZAWA, K., TERAISHI, M., UTSUMI, S., ISHIMOTO, M. **Assessment of the importance of α -amylase inhibitor-2 in bruchid resistance of wild common bean**. Theoretical Application Genetics, v. 114, p. 755-764, 2007

OLIVEIRA, C. M., AUD, A. M., MENDES, S. M., FRIZZAS, M. R. **Crop losses and the economic impact of insect pests on Brazilian agriculture**. Crop Protection, v. 56, p. 50-54, 2014.

PAUL, U.V., LOSSINI, J.S, EDWARDS, P.J., HILBECK, A. **Effectiveness of products from four locally grown plants for the management of *Acanthoscelides obtectus* (Say) and *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (both Coleoptera: Bruchidae) in stored beans under laboratory and farm conditions in Northern Tanzania**. Journal of Stored Products Research, v. 45, p. 97-107, 2009.

PIMBERT, M. P. PIERRE, D. **Ecophysiological aspects of bruchid reproduction. I. The influence of pod maturity and seeds of *Phaseolus vulgaris* and the influence of insemination on the reproductive activity of *Zabrotes subfasciatus***. Ecological Entomology, v. 8, n. 1, p. 87-94, 1983.

PIMBERT, M. **A Model of Host Plant Change of *Zabrotes subfasciatus* Boh. (Coleoptera: Bruchidae) in a Traditional Bean Cropping System in Costa Rica**. Biological Agriculture and Horticulture, v. 3, n. 1, p. 39-54, 1985.

PIMENTEL, D. **World food crisis: energy and pests**. Entomological Society of America, v. 22, n. 1, p. 20-26, 1976.

PUEYO, J. J., HUNT, D. C., CHRISPPEELS, M. **Activation of Bean (*Phaseolus vulgaris*) α -Amylase Inhibitor Requires Proteolytic Processing of the Proprotein.** *Plant Physiology*, v. 101, p. 1341-1348, 1993.

PUEYO, J. J., DELGADO-SALINAS, A. **Presence of α -amylase inhibitor in some member of the subtribe Phaseolinae (PHASEOLEAE: FABACEAE).** *American Journal of Botany*, v. 84, n. 1, p. 79-84, 1997.

RAMOS, R. Y. **Genera de Coleópteros de la Península Ibérica e Islas Baleares: familia Bruchidae (Coleoptera, Chrysomeloidea).** *Boletín de la Asociación española de Entomología*, v. 31, n. 1-2, p. 65-114, 2007.

ROCHFORT, S., PANOZZO, J. **Phytochemicals for health, the role of pulses.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 20, p. 7921-7994, 2007.

SANTIMONE, M., KOUKIEKOLO, R., MOREAU, Y., BERRE, V. L., ROUGÉ, P., MARCHIS-MOUREN, G., DESSEAUX, V. **Porcine pancreatic α -amylase inhibition by the kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) inhibitor (α -AI1) and structural changes in the α -amylase inhibitor complex.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, v. 1696, n. 2, p. 181-190, 2004.

SARMAH, B. K., MOORE, A., TATE, W., MOLVIG, L., MORTON, R. L., REES, D. P., CHIAIESE, P., CHRISPPEELS, M. J., TABE, L. M., HIGGINS, T. J. V. **Transgenic chickpea seeds expressing high levels of a bean α -amylase inhibitor.** *Molecular Breeding*, v. 14, p. 73-82, 2004.

SCHROEDER, H. E., GOLLASCH, S., MOORE, A., TABE, L. M., CRAIG, S., HARDIE, D. C., CHRISPPEELS, M. J., SPENCER, D., HIGGINS, T. **Bean α -Amylase Inhibitor Confers Resistance to the Pea Weevil (*Bruchus pisorum*) in Transgenic Peas (*Pisum sativum* L.).** *Plant Physiol*, v. 107, p. 1233-1239., 1995.

SHADE, R. E., SCHROEDER, H. E., PUEYO, J. J., TABE, L. M., MURDOCK, L. L., HIGGINS, T. J. V., CHRISPPEELS, M. J. **Transgenic pea seeds expressing the α -amylase inhibitor of the common bean are resistant to Bruchid beetles.** *Bio/Technology*, v. 12, p. 793-796, 1994.

SILVA, C. P., TERRA, W. R., DE SÁ, M. F. G., ISEJIMA, E. M., BIFANO, T. D., ALMEIDA, J. S. **Induction of digestive α -amylase in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of the common bean α -amylase inhibitor 1.** *Insect Physiology*, v. 47, p. 2831290, 2001a.

SILVA, C. P., TERRA, W. R., XAVIER-FILHO, J., GROSSI DE SÁ, M. F., ISEJIMA, E. M., DAMATTA, R. A., MIGUENS, F. C., BIFANO, T. D. **Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α amylases in response to different diets.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 31, p. 41-50, 2001b.

SILVA, C. P., TERRA, W. R., XAVIER-FILHO, J., GROSSI DE SÁ, M. F., LOPES, A. R., PONTES, E. G. **Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes***

***subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, v. 29, p. 355-366, 1999.

SILVEIRA, J. M. F. J., BORGES, I. C., BUANIAIN, A. M. **Biotecnologia e Agricultura da ciência e tecnologia aos impactos da inovação.** *São Paulo em Perspectiva*, v. 19, p.101-114, 2005.

SOLLETI, S. K., BAKSHI, S., PURKAYASTHA, J., PANDA, S. K., SAHOO, L. **Transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) seeds expressing a bean α -amylase inhibitor 1 confer resistance to storage pests, bruchid beetles.** *Plant Cell Reports*, v. 27, n. 12, p. 1841–1850, 2008.

SOUTHGATE, B. J. **Biology of the Bruchidae.** *Annual Review of Entomology*, v. 24, n. 1, p. 449–473, 1979.

SPARVOLI, F., GALLO, A., MARINELLI, D., SANTUCCI, A., BOLLINI, R. **Novel lectin-related proteins are major components in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1382, p. 311-323, 1998.

SPARVOLI, F., LANAVE, C., SANTUCCI, A., BOLLINI, R., LIOI, L. **Lectin and lectin-related proteins in Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) seeds: biochemical and evolutionary studies.** *Plant Molecular Biology*, v. 45, p. 587-597, 2001.

SUZUKI, K., ISHIMOTO, M., KITAMURA, K. **cDNA sequence and deduced primary structure of an α -amylase inhibitor from a bruchid-resistant wild common bean.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, v. 1206, p. 289-291, 1994.

TERRA, W. R., FERREIRA, C. **Biochemistry of Digestion.** *Comprehensive Molecular Insect Science*, p.171-224, 2005.

WONG-CORRAL, F. J., CASTAÑÉ, C., RIUDAVETS, J. **Lethal effects of CO₂-modified atmospheres for the control of three Bruchidae species.** *Journal of Stored Products Research*, v. 55, p. 62-67, 2013.