



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS GENÔMICAS E  
BIOTECNOLOGIA  
CENTRO DE ANÁLISES PROTEÔMICAS E BIOQUÍMICAS



**ANÁLISES PROTEÔMICAS  
APLICADAS À DESCOBERTA DE  
BIOINSETICIDAS PROVENIENTES  
DE FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS ATIVOS  
CONTRA *Callosobruchus maculatus***

**André Melro Murad**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE BRASÍLIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS GENÔMICAS E  
BIOTECNOLOGIA  
CENTRO DE ANÁLISES PROTEÔMICAS E BIOQUÍMICAS



**ANÁLISES PROTEÔMICAS  
APLICADAS À DESCOBERTA DE  
BIOINSETICIDAS PROVENIENTES  
DE FUNGOS  
ENTOMOPATOGÊNICOS ATIVOS  
CONTRA *Callosobruchus maculatus***

**André Melro Murad**

**Orientação: Octávio Luiz Franco**

Brasília, Agosto de 2007

**Trabalho de Tese para obtenção do grau de Doutor em Ciências Genômicas e Biotecnologia junto e realizado na Universidade Católica de Brasília sob a orientação do Dr. Octávio Luiz Franco e co-orientação da Dra. Eliane Ferreira Noronha.**

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

Tese defendida e aprovada como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Genômicas e Biotecnologia em 17 de agosto de 2007 pela banca examinadora constituída por:

---

**Prof. Dr. Octávio Luiz franco**  
**Orientador / UCB**

---

**Prof. Dr. Ruy Araújo Caldas**  
**Examinador Interno / UCB**

---

**Profa. Dra. Maria Fátima Grossi de Sá**  
**Examinador Interno / UCB**

---

**Dr. Carlos Bloch Júnior**  
**Examinador Externo / Cenargen-Embrapa**

**Para Thaina, minha amada esposa,  
pelos momentos de compreensão e  
ajuda durante toda a tese.**

## **Agradecimentos**

Deus por todos os mistérios que iluminaram meu caminho.

Meus pais pelo apoio.

Prof. Dr. Octávio Luiz Franco por sua amizade, ensinamentos, apoio nos momentos difíceis.

Profa. Dr. Eliane por sua ajuda na compreensão de bioquímica.

A dee dee por sua pentelhice.

Leonardecz, padrinho e amigo.

Carol, minha fiel escudeira.

Erivaldo por sua amizade, apoio e aleatoriedade.

Jack, Simone e Patrícia pelos momentos de diversão no lab.

Pollyanna por ser uma tratante.

A todos do CAPB.

Mariana pela atenção e cuidado com os insetos.

Dr. Thales e a Dr. Fátima pelos ensinamentos, inspirações, apoio e acolhimento em seus laboratórios.

Fábio e Idacuy (Ida), pelo apoio técnico no laboratório.

Ana Lúcia, que de certa maneira me ajudou a pegar meu rumo, mas sempre deixando de comparecer nos compromissos marcados.

Luciano Paulino pela paciência comigo e ajuda na espectrometria de massa.

Dr. Ruy Caldas e ao Dr. Carlos Bloch cuja genialidade serviu de inspiração e motivação durante toda a tese.

*God doesn't always shave with Occam's razor.*  
Malcom Dixon  
New Scientist 23/4/94 p.51

*Em um experimento em que tudo pode dar certo, se existir uma única  
possibilidade de dar errado, vai dar errado!*  
Lei de Murphy.

**ESTE TRABALHO FOI REALIZADO COM O AO  
AUXÍLIO DAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES:**

- **Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES).**
- **Programa de Pós Graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília – UCB.**
- **Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen/EMBRAPA).**

# Sumário

<i>Lista de Figuras</i>	XI
<i>Lista de Tabelas</i>	XIII
<i>Abreviaturas e Definições</i>	XIV
<i>Resumo</i>	XV
<i>Abstract</i>	XVII
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 O problema	2
1.2 As pragas <i>C. maculatus</i> e <i>Z. subfasciatus</i>	4
1.3 O exoesqueleto dos bruquídeos	5
1.4 Quitinases	7
1.5 $\beta$ -1,3 glucanases	14
1.6 Proteinases	17
1.7 Estratégia: O uso dos fungos <i>M. anisopliae</i> e <i>B. Bassiana</i> no controle de <i>C. maculatus</i>	24
1.8 A proteômica	28
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
2.1 Objetivos específicos	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
3.1 Insetos	34
3.2 Avaliação da patogenicidade de isolados de <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i>	34
3.3 Obtenção e cultivo de esporos dos fungos entomopatogênicos <i>B. bassiana</i> e <i>M. anisopliae</i>	35
3.4 Quantificação de proteínas	36
3.5 Ensaio de proteinases alcalinas	36
3.6 Ensaio de quitinase	36
3.7 Ensaio de atividade amilolítica.	37
3.8 Análise de massa molecular por SDS-PAGE	38
3.9 Análise proteômica da secreção de <i>M. anisopliae</i> e <i>B. bassiana</i>	39
3.10 Coloração de géis	40
3.11 Remoção da Coloração	40
3.12 Digestão de Proteínas em Gel	41
3.13 Análise por Espectrometria de Massa	41
3.14 Identificação de Proteínas	42
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>

<b>4.1 <i>Metarhizium anisopliae</i></b>	<b>45</b>
4.1.1 Quantidade de proteínas obtidas, ensaios enzimáticos e análise de massa molecular por eletroforese	46
4.1.2 Identificação de <i>spots</i> e vias metabólicas.	53
<b>4.2 <i>Beauveria bassiana</i></b>	<b>63</b>
4.2.1 Quantidade de proteínas obtidas, ensaios enzimáticos e análise de massa molecular por eletroforese	64
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>71</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	<b>73</b>
<b>7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>76</b>
<b>8. ARTIGOS</b>	<b>92</b>
8.1 Screening and secretomic analysis of enthomopatogenic <i>Beauveria bassiana</i> isolates in response to cowpea weevil ( <i>Callosobruchus maculatus</i> ) exoskeleton	93
8.2 Screening of entomopathogenic <i>Metarhizium anisopliae</i> isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil ( <i>Callosobruchus maculatus</i> ) exoskeleton	94
8.3 Proteomic analysis of a <i>Metarhizium anisopliae</i> secretion in the presence of <i>Calosobruchus maculatus</i> exoskeleton	95
8.4 Novel insights on the mechanism of action of $\alpha$ -amylase inhibitors from plant defensins family	96
8.5 Structural and biochemical insights of a novel antimicrobial glycine rich peptide from guava ( <i>Psidium guajava</i> ) seeds: can storage molecules work effectively at plant defence system?	97
8.6 Structure and Enzyme Properties of <i>Zabrotes subfasciatus</i> $\alpha$ -Amylase	98
8.7 Cloning and Structural Analysis of an Indian Little Millet ( <i>Panicum sumatrense</i> ) Zein Like Storage Protein: Implications for Molecular Assembly	103
8.8 Identification of a cowpea $\gamma$ -thionin with bactericidal activity.	107
8.9 <i>Trichomonas vaginalis</i> : Identification of a triacylglycerol acylhydrolase	111
<b>9. CAPÍTULOS DE LIVROS</b>	<b>114</b>
9.1 Biologia computacional	115
9.2 Novel findings over defensins and their utilization on construction of transgenic plants	116
<b>10. APÊNDICE</b>	<b>117</b>
10.1 Massas dos peptídeos fragmentados dos spots identificados por PMF de <i>M. anisopliae</i> .	118
10.2 Espectros de sequenciamento de novo para amostras de <i>M. anisopliae</i> .	122

## Lista de Figuras

- Figura 1: O bruquídeo *C. maculatus* em sementes de *Vigna unguiculata*. Imagens cedidas por Dr. Raúl A. Laumann – Embrapa/Cenargen \_\_\_\_\_ 3
- Figura 2: O bruquídeo *Z. Subfaciatus*. Fonte: <http://www.padil.gov.au/img.aspx?id=1283&s=l> \_\_\_\_\_ 3
- Figura 3: O polímero de N-acetil-D-glicosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. Fonte: [http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/19500/Chitinase\\_chitin.gif](http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/19500/Chitinase_chitin.gif) \_\_\_\_\_ 7
- Figura 4: O polímero de D-glicosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. Fonte: [http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/19500/chitosanase\\_chitosan.gif](http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/19500/chitosanase_chitosan.gif). \_\_\_\_\_ 7
- Figura 5: Estruturas terciárias da quitinase. Em verde a quitinase de *Coccidioides immitis* (CiX1) (PDB 1LL4) (BORTONE et al., 2002), em azul a quitinase de *Aspergillus fumigatus* (ChiA1) (PDB 1I2D) (RAO et al., 2005). A) Visão posterior do sítio catalítico. B) Visão lateral do sítio catalítico. Para ambos, hélices representam as  $\alpha$ -hélices e setas representam folhas  $\beta$ . Em amarelo são representados os resíduos de ancoragem e acomodação do substrato na enzima. Em vermelho o resíduo importante para catálise C) Visão da superfície molecular do sítio catalítico. Em vermelho cargas negativas, em azul cargas positivas e em branco as não polares. \_\_\_\_\_ 13
- Figura 6: Polímero de glicose em ligação glicosídica do tipo  $\beta$ (1,3) (em azul) e  $\beta$ (1,6) (em vermelho). Fonte: [http://4e.plantphys.net/images/ch15/wt1501c\\_s.png](http://4e.plantphys.net/images/ch15/wt1501c_s.png) \_\_\_\_\_ 14
- Figura 7: Estrutura terciária de  $\beta$  1,3 glucanase de *Cândida albicans* (PDB 1EQC) (CUTFIELD et al., 1999). Setas representam folhas  $\beta$  e hélices representam  $\alpha$ -hélices. Em vermelho o sítio catalítico. \_\_\_\_ 16
- Figura 8: Estrutura tridimensional de proteases. A) proteinase cisteínica de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 1EUV) (MOSESSEVA e LIMA, 2000). B) proteinase glutâmica de *Scytalidium lignicolum* (PDB 2IFW) (FUJINAGA et al., 2004). C) proteinase-serínica de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 1YSC) (JUNG et al., 1998). Hélices indicam  $\alpha$ -hélices e setas representam as folhas  $\beta$ . Em vermelho os resíduos do sítio catalítico. \_\_\_\_\_ 22
- Figura 9: Estrutura terciária da tripsina de *Fusarium oxysporum*. A) Setas representam folhas  $\beta$  e hélices representam  $\alpha$ -hélices. Em vermelhos são representados os resíduos do sítio catalítico. B) Mecanismo de catálise proposta por Schmidt et al., (2003) da tripsina de *Fusarium oxysporum*. \_\_\_\_\_ 23
- Figura 10: O fungo *Beauveria bassiana* em placa de petri em BDA. \_\_\_\_\_ 27
- Figura 11: O fungo *Metarhizium anisopliae* em placa de petri em BDA. \_\_\_\_\_ 27
- Figura 12: Ensaio enzimáticos. Atividades A- quitinolítica, B- proteolítica e C-  $\alpha$ -amilolítica da secreção de *M. anisopliae* em meio indutivo (MMC) e não indutivo (MM). \_\_\_\_\_ 48
- Figura 13 SDS-PAGE a 12,5%, das proteínas secretadas por *M. anisopliae*. I - Marcador de massa molecular, II- Proteínas encontradas no meio não indutivo (MM), III- proteínas encontradas no meio indutivo contendo 0,5% de exoesqueleto de *C. maculatus*. (p:v) (MMC). \_\_\_\_\_ 49
- Figura 14: Amostras de *M. anisopliae* analisadas por géis bidimensionais (18x24x0,15cm). MM (A) e MMC (B). Spots marcados em círculos identificam similaridades entre os géis A e B. Quadrados identificam as principais diferenças devido a presença de carapaças de *C. maculatus*. \_\_\_\_\_ 50

- Figura 15: Gel bidimensional (18x16x0,1cm) de MMC. Números indicam spots identificados por PMF ou sequenciamento de novo. \_\_\_\_\_ 52
- Figura 16: A via metabólica de degradação de quitina. Em vermelho destacam-se as enzimas identificadas e, entre colchetes, os spots equivalentes marcados no gel (Figura 15). \_\_\_\_\_ 58
- Figura 17: Metabolização de proteínas. Em vermelho proteínas identificadas. Em vermelho destacam-se as enzimas identificadas e, entre colchetes, os spots equivalentes marcados no gel (Figura 15). \_\_\_\_\_ 61
- Figura 18: Ensaio enzimático com secretoma de *B. bassiana*. Atividades A- quitinolítica, B- proteolítica e C-  $\alpha$ -amilolítica da secreção de *B. bassiana* em meio indutivo (MMC) e não indutivo (MM). \_\_\_\_\_ 66
- Figura 19: SDS-PAGE a 12,5%, das proteínas secretadas por *B. bassiana*. I - Marcador de massa molecular, II- Proteínas encontradas no meio não indutivo (MM), III- proteínas encontradas no meio indutivo contendo 0,5% exoesqueleto de *C. maculatus* (MMC). \_\_\_\_\_ 67
- Figura 20: Amostras de *B. bassiana* analisadas por géis bidimensionais (18x24x0,15cm). MM (A) e MMC (B). Spots marcados em círculos identificam similaridades entre os géis A e B. posições 1 e 2 (marcado com quadrados), 3, 4 e 5 (marcados com losangos) são possíveis 26 kDa e 21 kDa endoproteases, 45 kDa e 33 kDa quitinases e 28 kDa chitosanase-like protein respectivamente. \_\_\_\_\_ 68
- Figura 21: Estrutura tridimensional da  $\alpha$ -amilase de *Zabrotes subfaciatus*. A, B e C indicam os três motivos da enzima. Em hélices as  $\alpha$ -hélices e setas para as folhas  $\beta$ . Em verde os resíduos da tríade catalítica. \_\_\_\_\_ 101
- Figura 22: Superfície molecular da  $\alpha$ -amilase de *Z. subfaciatus*. em vermelho as cargas negativas, em azul as positivas e em branco as não carregadas. \_\_\_\_\_ 102
- Figura 23: Estrutura terciária da Zeína. A) representação em cartoon da estrutura sendo hélices para  $\alpha$ -hélices B) superfície molecular da zeína. Vermelho para regiões negativas, azul para positivas e branco para não carregadas. \_\_\_\_\_ 106
- Figura 24: Estrutura terciária da CPthionin II de *Vigna unguiculata*. A) representação em cartoon da estrutura sendo hélices para  $\alpha$ -hélices e setas para folhas  $\beta$ . Resíduos de arginina são representados em bastões azuis B) superfície molecular da defensina. Vermelho para regiões negativas, azul para positivas e branco para não carregadas. \_\_\_\_\_ 110
- Figura 25: Estrutura terciária da Triacil glicerol hidrolase de *Tricomonas vaginalis*. A) representação em cartoon da estrutura sendo hélices para  $\alpha$ -hélices e setas para folhas  $\beta$ . B) superfície molecular da enzima. Vermelho para regiões negativas, azul para positivas e branco para não carregadas. \_\_\_\_\_ 113

## Lista de Tabelas

<i>Tabela 1: Isolados de M. anisopliae com seus respectivos hospedeiros e origem</i> .....	45
<i>Tabela 2: Testes CL50 (<math>p &lt; 0,05</math>) e parâmetros de regressão a (y- interseção) e b (inclinação) (estimado pelo método Probit) para os dois isolados testados contra insetos adultos de Callosobruchus maculatus. <math>\chi^2</math> indica os ajustes de dados para o modelo Probit. Valores de b indicam a diferença estatística (ANOVA <math>F_{3,16} = 34.37</math>, <math>p &lt; 0.001</math> e teste Student-Newman-Keuls <math>p &lt; 0.05</math>)</i> .....	46
<i>Tabela 3: Identificação dos spots de MMC de M. anisopliae</i> .....	54
<i>Tabela 4: Isolados de B. bassiana utilizados nos testes de patogenicidade, hospedeiros naturais e origens</i> .....	63
<i>Tabela 5: Mortalidade de insetos adultos de C. maculatus pelos isolados de B. bassiana (valores médios <math>\pm</math> SE). (ANOVA <math>F_{9,20} = 3,25</math> <math>P = 0.013</math>, teste SNK <math>P &gt; 0.05</math>)</i> .....	64
<i>Tabela 6: Testes CL50 (<math>p &lt; 0,05</math>) e parâmetros de regressão a (y- interseção) e b (inclinação) (estimado pelo método Probit) para os dois isolados testados contra insetos adultos de Callosobruchus maculatus. <math>\chi^2</math> indica os ajustes de dados para o modelo Probit. Valores de b seguida indicam a diferença estatística (ANOVA <math>F_{8} = 0,0658</math>, <math>p &lt; 0,001</math> e teste Student-Newman-Keuls <math>p &lt; 0.05</math>)</i> .....	64

## Abreviaturas e Definições

MM – Meio mínimo  
MMC – Meio mínimo contendo 0,5% de exoesqueleto de *C maculatus*  
DTT – *Dithiothreitol*  
PMF – *Peptide Mass Fingerprinting*  
CBD – Sítios de ligação à carboidrato  
EC – Enzyme Commission  
GlcNAc – N-acetil-D-glicosamina  
GlcNAcase – N-acetil-glicosaminases  
BjCHI1 – Quitinase de *Brassicae juncea*  
GUS –  $\beta$  glucuronidase  
PMSF – *phenylmethylsulfonyl fluoride*  
2-DE – Gel bidimensional  
RIP – Proteínas inativadoras de ribossomos  
CAZy – Carbohydrate active enzymes data base  
ChiA1 – quitinase 1 de *Aspergillus fumigatus*  
CiX1 – quitinase 1 de *Coccidioides immitis*  
GH – Glicosil hidrolase  
TCA – Ácido tricloroacético  
DNS – Ácido dinitrosalicílico  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE – *Sodium Dodecil Sulfate Poli-Acrilamide Gel Electrophoresis*  
TEMED – *N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine*  
CHAPS – *3-[ (3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-1-Propane Sulfonate*  
IPG – *Immobilized pH Gradient*  
EBI – *European Bioinformatics Institute*  
CG34 – isolado de *Metarhizium anisopliase*  
CG05 – isolado de *Beauveria bassiana*  
kDa – Quilo Dalton  
CL50 – Concentração letal à 50%  
SNK – Teste t de *Student*  
ANOVA – Análise de variância

## Resumo

Os avanços da agricultura permitiram o aumento da qualidade e da quantidade dos nutrientes presentes nas sementes, bem como a redução dos componentes tóxicos e antinutricionais, tornando-as parcialmente indefesas ao ataque de pragas. Assim, as perdas na produção da agricultura mundial, devido ao ataque de pragas, podem ser extremamente severas. No caso do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), os pequenos agricultores são os mais prejudicados, devido a uma alta taxa de reprodução dos insetos dentro das sementes armazenadas. Certos compostos produzidos pelas plantas são utilizados para sua defesa, como lectinas, arcelinas, tioninas, defensinas, inibidores de enzimas digestivas, bem como enzimas hidrolíticas tais como proteases, quitinases e as  $\beta$  1,3 glucanases. Uma alternativa aos pesticidas convencionais é a utilização de inibidores de enzimas digestivas bem como o uso de microrganismos entomopatogênicos, capazes de produzir hidrolases que degradam o exoesqueleto dos insetos, como quitinases e proteinases. Neste trabalho, identificou-se e caracterizou-se proteínas com potencial inseticida contra o gorgulho do feijão-de-corda (*Callosobruchus maculatus*) obtidas a partir de fungos entomopatogênicos. A detecção destas proteínas foi realizada por meio de análises de secreção de fungos entomopatogênicos, como o *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*, já descritos como seletos produtores de enzimas hidrolíticas com atividade inseticida. Esta detecção demonstrou o potencial dos fungos na produção de compostos bioativos inócuos ao ser humano, justificando cada vez mais a produção de bancos de germoplasma. Em suma, este trabalho visa tornar possível o desenvolvimento de plantas transgênicas de feijão-de-corda resistentes a bruquídeos, assim como o desenho racional de bioinseticidas, não tóxicos a organismos não alvo e com propriedades biodegradáveis.

**Palavras Chaves:** Fungos entomopatogênicos, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, Bioinseticidas, Proteômica, *Callosobruchus maculatus*.

## Abstract

Crop advances had allowed the increase of seed quality and also the amount of nutritional compounds. Otherwise it was also observed a reduction of toxic and antifeedant components, becoming them partially defenceless against pest predation. Thus, the worldwide economical crop losses are extremely severe due to insect-pest predation. In specific case of cowpea (*Vigna unguiculata*), the small farmers are most affected, due to enhanced insect reproduction rate, inside the stored seeds. Certain compounds are produced by plants and used for its own defense, as lectins, arcelins, thionins, defensins, enzyme inhibitors, as well hydrolytic enzymes such as proteinases, chitinases and  $\beta$  1,3 glucanases. Moreover, an alternative to conventional pesticides consists in the use of entomopathogenic organisms, capable to produce hydrolases, which are able to degradate insect exoskeleton. With this aim, this study reports the identification and characterization of proteins with bioinsecticide activity. The detection was carried out by analyzing the secretion of entomopathogenic fungi, as *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*, already described as select hydrolytic enzyme producers with biocide activity. This detection demonstrated the fungi potential in the development of novel bioactive compounds, justifying the production of germoplasm banks. Furthermore, our data also indicate the possibility of new rational biodegradable bioinsecticides development, as well the construction of transgenic plants with bruchids resistance.

**Key words:** entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana*, Bioinsecticide, Proteomics, *Callosobruchus maculatus* .

## **1. INTRODUÇÃO**

---

### 1. INTRODUÇÃO

#### *1.1 O problema*

Desde os tempos antigos, o ser humano aprendeu a utilizar sementes como base de sua alimentação. Com o passar dos anos, a produção de grãos tornou-se de grande valor econômico para todas as populações. Os avanços da agricultura permitiram aumentar o teor e a qualidade dos nutrientes presentes nas sementes mas, em contrapartida, deixou as sementes mais palatáveis e nutricionalmente mais adequadas para o desenvolvimento de pragas. Assim, a perda na produção da agricultura mundial, devido ao ataque de pestes, pode chegar a até 37% (GATEHOUSE *et al.*, 1992), sendo no caso do feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) e do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*), os pequenos agricultores os maiores prejudicados. No feijão-de-corda, os ataques pré- e pós-colheita, causados por larvas de bruquídeos (Coleoptera, Bruchidae), como *Callosobruchus maculatus* (Figura 1), podem ser extremamente severos, especialmente se as sementes forem armazenadas por longos períodos de tempo. O mesmo pode ser dito para o feijão comum, considerado uma das leguminosas mais importantes na dieta humana (MBITHI-MWIKYA *et al.*, 2002), atacado pelos bruquídeos *Zabrotes subfaciatus* (Figura 2) e *Acanthoscelides obtectus*.

## 1. INTRODUÇÃO

---



Figura 1: O bruquídeo *C. maculatus* em sementes de *Vigna unguiculata*. Imagens cedidas por Dr. Raúl A. Laumann – Embrapa/Cenargen



Figura 2: O bruquídeo *Z. Subfaciatus*. Fonte: <http://www.padil.gov.au/img.aspx?id=1283&s=1>

Por outro lado, plantas possuem um variado grau de resistência a insetos e apenas um número limitado destes são hábeis a alimentarem-se de cada espécie vegetal individualmente. Essa resistência inerente, baseada nos vários mecanismos de defesa, foi desenvolvida pelas plantas durante o processo de evolução e co-evolução (SCHULER *et al.*, 1998). Atualmente, sabe-se que esses defensivos podem ser encontrados tanto nos diferentes tecidos vegetais quanto em outros organismos como bactérias, fungos e protozoários (PELEGRINI e FRANCO, 2005). Nestes últimos, estes compostos não são utilizados somente para defesa mas também para predação atuando como enzimas digestivas, quitinases e proteinases (FRANCO *et al.*, 2002). Entre esses compostos, estão incluídas várias proteínas de defesa como as proteínas inativadoras de ribossomos – RIP's (BRUIX *et al.*, 1993; DEMPSEY *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 2006), as lectinas, as arcelinas (SALES *et al.*, 2000), as defensinas (MELO *et al.*, 2002; FRANCO *et al.*, 2006), os inibidores de enzimas digestivas, como os inibidores de proteinases e  $\alpha$ -amilases (DUTHIE E LORENZ, 1949; RYAN, 1991; FRANCO *et al.*, 2002) e as enzimas hidrolíticas, como as quitinases e as  $\beta$ -1,3 glucanases (MAUCH e STAEHELIN, 1989; PIRTTILA *et al.*, 2002). Assim, as plantas constroem um arsenal próprio para combater predadores como os bruquídeos *C. maculatus* e *Z. subfasciatus*.

### ***1.2 As pragas C. maculatus e Z. subfasciatus***

Na família Bruchidae, o caruncho adulto comumente deposita e adere os seus ovos, individualmente, na superfície do feijão de uma maneira aparentemente ao acaso. No entanto, as fêmeas de *Z. subfasciatus* (Figura 2) depositam alguns dos seus ovos na superfície do grão de *P. vulgaris* em grupos de ovos (UTIDA, 1967). Este hábito de oviposição em grupo é raramente encontrado em insetos de produtos armazenados e mesmo assim, na presente espécie, este hábito não é tão extremo como

## 1. INTRODUÇÃO

---

o observado em lepidópteros e outros insetos (UTIDA, 1967). Os ovos são protegidos por uma substância excretada na hora da postura, que os fixam firmemente ao feijão. O ovo parece ser vulnerável a danos físicos, mas isto pode ser insignificante, uma vez que as larvas eclodem muito rapidamente (SOUTHGATE, 1979). Após a eclosão, as larvas penetram diretamente no grão, sem sair para o exterior (CARVALHO e ROSSETTO, 1968), onde se desenvolvem passando ao estágio de pupa e, após o desenvolvimento completo, há a formação de um orifício na superfície do grão por onde o inseto adulto sai (SOUTHGATE, 1979). Os adultos não se alimentam, e a fêmea adulta determina a quantidade de recursos disponíveis para cada um de seus descendentes em potencial (DENDY e CREDLAND, 1991).

O bruquídeo *C. maculatus* (Figura 1) é o predador mais comum do feijão-de-corda (*V. unguiculata*). Os ovos são postos em um líquido claro e pegajoso, expelido pela fêmea, servindo de apoio para a penetração da larva no interior do grão. As larvas são do tipo curculioniforme, passando diretamente do ovo para o interior da semente. As pupas apresentam coloração branca leitosa e medem cerca de três milímetros de comprimento. Os adultos são besouros pequenos, com 1,8 a 2,5 mm de comprimento e coloração castanho escura. As fêmeas são maiores que os machos e apresentam quatro manchas claras bem nítidas no pronoto, contrastando com a cor escura brilhante do corpo. Eles destroem os cotilédones e comprometem a qualidade do produto mudando sabor e consistência devido a presença de dejetos e insetos mortos. A duração completa do ciclo de vida é de 26 dias a 30°C (SPERANDIO, 2001).

### ***1.3 O exoesqueleto dos bruquídeos***

Uma característica distintiva de todos os artrópodes é a presença de um

## 1. INTRODUÇÃO

---

exoesqueleto glicoprotéico acelular, secretado pela epiderme subjacente. Esta cutícula está organizada em duas camadas, sendo uma endocutícula e uma exocutícula. Uma fina epicutícula de proteínas, comumente impregnada de compostos serosos forma uma camada externa à exocutícula (DORIT *et al.*, 1991). A exocutícula difere da endocutícula por possuir cadeias de glicoproteínas pluriestratificadas, formando um arranjo molecular mais rígido. Certas partes do exoesqueleto são especialmente rígidas e ditas altamente esclerotinizadas, devido à presença de esclerotina, uma proteína insolúvel que permeia a quitina (DORIT *et al.*, 1991).

A fim de permitir o movimento, a cutícula é fina e flexível entre os artícu­los das extremidades e entre as partes do corpo, como entre segmentos adjacentes. O exoesqueleto apresenta, ainda, poros que se comunicam com células glandulares subjacentes para permitir a passagem dos produtos de secreção para o exterior (SOUTHGATE, 1979). Além disso, a membrana peritrófica que reveste o intestino médio, extremamente rica em quitina, se torna um provável alvo para ação de enzimas hidrolíticas (BISHOP *et al.*, 2000).

A quitina, presente tanto no exoesqueleto como na membrana peritrófica desses insetos, é formada por um polímero de N-acetil-D-glicosamina ligado em conformação  $\beta$ -1,4 (Figura 3), semelhante à celulose, extremamente forte e insolúvel na maioria dos solventes (FILHO e SIGNINI, 2001). Acredita-se ser um dos polímeros mais abundantes na Terra; o grupo acetil aumenta a quantidade de pontes de hidrogênio entre os polímeros, tornando-o mais rígido (DUO-CHUAN, 2006). Por outro lado sua forma deacetilada, chamada de quitosana (Figura 4), é solúvel em água e também pode ser encontrada em vários insetos e fungos (FILHO e SIGNINI, 2001). Quitina e quitosana recentemente tem sido estudadas para o desenvolvimento de novos compostos, como a formulação de drogas em forma gelatinosa, permitindo uma

## 1. INTRODUÇÃO

maior estabilidade/disponibilidade no organismo (QIAN *et al.*, 2006; ZHENG *et al.*, 2006), bem como a produção de biopolímeros que possam substituir materiais sintéticos como o plástico, sendo estes mais resistentes e biodegradáveis (MISEREZ *et al.*, 2007).

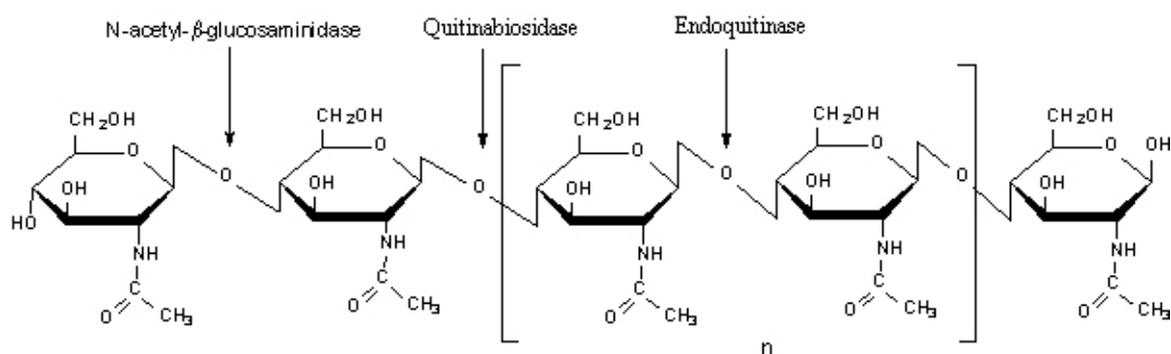


Figura 3: O polímero de N-acetil-D-glicosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. Fonte: [http://www.sigmaldrich.com/img/assets/19500/Chitinase\\_chitin.gif](http://www.sigmaldrich.com/img/assets/19500/Chitinase_chitin.gif)

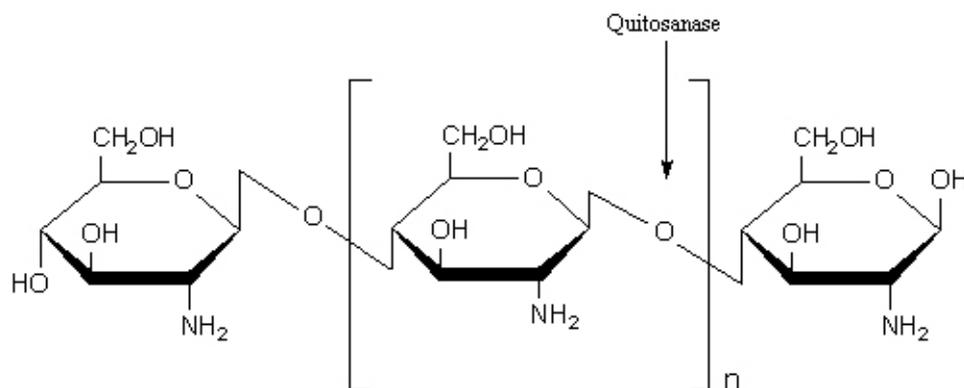


Figura 4: O polímero de D-glicosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4. Fonte: [http://www.sigmaldrich.com/img/assets/19500/chitosanase\\_chitosan.gif](http://www.sigmaldrich.com/img/assets/19500/chitosanase_chitosan.gif)

### 1.4 Quitinases

## 1. INTRODUÇÃO

---

As enzimas produzidas por fungos são importantes no processo de infecção do hospedeiro e quebra da matéria orgânica (ARCHER e WOOD, 1995), sendo geralmente determinadas pelo crescimento do micélio sobre um meio e observando-se a formação de halos de atividade enzimática. As exoenzimas são estudadas há décadas, devido não somente a sua importância em processos industriais mas também em interações patogênicas. Dentre as principais hidrolases secretadas, são descritos os grupos formados pelas  $\alpha$ - e  $\beta$ -amilases, celulases, lipases, pectinases e proteinases (ARCHER e WOOD, 1995).

A nomenclatura de enzimas quitinolíticas é um pouco confusa. Segundo o *Enzyme Commission* (EC) existem dois grupos: as quitinases (EC 3.2.1.14) e as N-acetil-glicosaminases (EC 3.2.1.30) (BARRETT, 1997). Mas estas terminologias são pobres e indicam somente as endoquitinases, que clivam quitina em posições aleatórias gerando múltiplos de N-acetil-D-glicosamina (GlcNAc), e não englobam outras enzimas que possuem a mesma função. Por essa razão, passou-se a chamar enzimas quitinolíticas, ou quitinases, quaisquer enzimas capazes de degradar a quitina, e passou-se a dividi-las em três grupos: as endoquitinases, as exoquitinases e as N-acetil-glicosaminases (HARMAN *et al.*, 1993). As exoquitinases podem ser divididas em dois grupos: as quitinabiosidase e as  $\beta(1,4)$  N-acetil-glicosaminases. A quitinabiosidase (EC 3.2.1.29) quebra as extremidades não reduzidas da cadeia de quitina-1,4- $\beta$ -quitobiosidases liberando diacetilquitobiose. Neste processo, nenhum mono/oligossacarídeo é formado. Além disso, as N-acetil-glicosaminases (GlcNAcase, EC3.2.1.30) utilizam como substrato as diacetilquitobioses liberando como produto monômeros de GlcNAc. Esta classe de enzimas cliva também outros substratos como p-nitrofenil-N acetil-  $\beta$ -D-galactosamina além de outros polímeros

## 1. INTRODUÇÃO

---

maiores de quitina, por isso ela também pode ser chamada de  $\beta(1,4)$  N-acetilhexosaminidases (EC 3.2.1.52) (CANNON *et al.*, 1994).

Adicionalmente, o CAZy (Carbohydrate Active enZymes data base-<http://afmb.cnrs-mrs.fr/pedro/CAZY/db.html>) classifica as quitinases da família Glicosil hidrolases em três famílias: 18, 19 e 20 (HENRISSAT e BAIROCH, 1993). A família 18 representa quitinases presentes em fungos, bactérias, leveduras, vírus, plantas e animais. A família 19 é composta quase que exclusivamente por quitinases de plantas. A família 20 consiste nas  $\beta(1,4)$  N-acetilhexosaminidases presentes em bactérias e fungos. Todas as famílias supracitadas apresentam seqüências primárias e terciárias distintas, bem como o mecanismo de catálise diferenciado entre elas (HAMEL *et al.*, 1997). Analisando as quitinases de fungo na família 18, é possível verificar a presença característica de cinco domínios: 1) Uma região para o peptídeo sinal no N-terminal que posteriormente é clivado e inexistente na proteína madura, 2) o sítio catalítico, 3) uma região rica em serina e treonina, 4) uma região de ligação a carboidrato (CBD) e 5) uma região estendida no C terminal. O peptídeo sinal indica que a quitinase deve ser transportada para o meio extracelular. Seqüências que não possuem esse peptídeo atuam no funcionamento intracelular, provavelmente na morfogênese (TAKAYA *et al.*, 1998b). O sítio catalítico das quitinases é bem conservado possuindo dois motivos distintos: um para ligação do substrato (SxGG) e outro para a hidrólise (DxxDxDxE) (HENRISSAT, 1991). A região rica em serina/treonina normalmente é glicosilada, com cadeias de açúcar em mudanças pós traducionais na proteína madura. Estas glicosilações devem ser necessárias para a secreção da proteína, bem como para manter sua estabilidade (TAKAYA *et al.*, 1998b). A região de ligação a carboidrato (CBD) é diferente do sítio de reconhecimento de substrato presente no sítio catalítico e não interfere no

## 1. INTRODUÇÃO

---

reconhecimento de substrato ou aumento de hidrólise pela enzima, mas aumenta sua especificidade ao substrato como no caso da quitinase Chit42 de *Trichoderma harzianum* (LIMON *et al.*, 2001). Ainda não foi definida a função da região C-terminal das quitinases. Foi detectado, ao analisar a seqüência primária de quitinase de *Candida albicans*, CHIT2, e duas de *Aspergillus fumigatus*, ChiA1 e ChiA2, que a região C-terminal possivelmente possui um sítio de ancoragem e clivagem de glicosilfosfatodilinositol (GPI), que permitem a essas quitinases se ligar à membrana celular e/ou à parede celular, apresentando alguma atividade durante o crescimento e morfogênese (TAKAYA *et al.*, 1998a; IRANZO *et al.*, 2002; JAQUES *et al.*, 2003). As quitinases I e II de *Rhizopus oligosporus* possuem as cinco regiões (YANAI *et al.*, 1992), a quitinase de *Saccharomyces cerevisiae* CTS1 possui as quatro primeiras regiões (KURANDA e ROBBINS, 1991) e, finalmente, a quitinase de 33 kDa de *T. harzianum* possui apenas as duas primeiras regiões (LIMON *et al.*, 1995). Entretanto, a maioria das quitinases de fungos possuem apenas os dois primeiros domínios.

Algumas quitinases já tiveram suas estruturas tridimensionais elucidadas. Uma delas, a quitinase do fungo *Coccidioides immitis* CiX1 (Figura 5A e B, em verde), apresentou sua estrutura descoberta em complexo com o inibidor alosamidina, um inibidor não protéico conhecido por ser ativo contra enzimas da classe 18 (BORTONE *et al.*, 2002). A segunda quitinase é a ChiA1 de *A. fumigatus* (RAO *et al.*, 2005), também cristalizada em complexo com o mesmo inibidor (Figura 5A e B, em azul). O sítio ativo de CiX1 é composto por uma série de resíduos conservados (Trp<sub>47</sub>, Trp<sub>131</sub>, Trp<sub>315</sub>, Trp<sub>378</sub>, Tyr<sub>239</sub>, Tyr<sub>293</sub>, Arg<sub>52</sub>, Arg<sub>295</sub>) (Figura 5A). No caso o resíduo Glu<sub>171</sub> é um dos resíduos do sítio catalítico, uma vez que uma mutação sítio dirigida nesse resíduo elimina toda a atividade quitinolítica (BORTONE *et al.*, 2002). A refração por raios X do cristal revelou uma estrutura formada por um barril de

## 1. INTRODUÇÃO

---

folhas  $\beta$  e  $\alpha$  hélices. Oito folhas  $\beta$  em paralelo formam o núcleo do barril e, a sua volta, oito  $\alpha$  hélices se conectam ao barril estabilizando-o (Figura 5 ABC). Sugere-se que é formada uma abertura no barril, onde 6 moléculas de açúcar são acomodadas havendo, em seguida, a hidrólise da cadeia. O mecanismo de ação da quitinase é dependente de uma tríade catalítica formada por três resíduos de aminoácidos acídicos. Neste caso, este mecanismo depende da protonação do substrato pelo resíduo Glu<sub>171</sub>, onde o açúcar acetamido *moiety* forma um intermediário do tipo oxazolina. Além disso, o resíduo Asp<sub>169</sub> estabiliza a reação eletrostaticamente (BORTONE *et al.*, 2002). O mesmo mecanismo pode ser encontrado na ChiA1 de *A. fumigatus*, comprovando a conservação do sítio catalítico (RAO *et al.*, 2005).

As quitinases podem ser encontradas em vários vegetais e fungos. Em plantas, muitas evidências indicam que estas enzimas participam diretamente do processo de defesa contra pragas e patógenos através da hidrólise da quitina, um polímero com ligações  $\beta$ -1,4 de N-acetil-D-glucosamina. Em contrapartida, as quitinases em fungos parecem ser um fator decisivo na colonização e predação para obtenção de alimentos. Como a quitina compõe a parede celular de fungos e também pode ser encontrada na carapaça e na membrana peritrófica intestinal de insetos, sua degradação pode ocasionar a ruptura no tecido intestinal, o vazamento do fluido celular e o desbalanceamento osmótico, matando o inseto por desidratação (BISHOP *et al.*, 2000). As propriedades anti-fúngicas e inseticidas das quitinases podem aumentar sinergisticamente com a presença da  $\beta$ -1,3-glucanase, uma enzima capaz de degradar a matriz de glucanos que envolve as moléculas de quitina (MAUCH e STAEHELIN, 1989). A atividade quitinolítica extracelular é de fundamental importância para patogênese de infestação de vários fungos como, por exemplo, *M. anisopliae* sf. *acidum* (SCREEN *et al.*, 2001). Através da indução com quitina, este

## 1. INTRODUÇÃO

---

microorganismo foi capaz de secretar isoformas básicas e ácidas de endoquitinases de 33 kDa, 44 kDa, 45 kDa e 60 kDa (KANG *et al.*, 1999). Estas enzimas são largamente utilizadas por *M. anisopliae* na colonização de lagartas de *Manduca sexta*, digerindo a cutícula e a membrana peritrófica (SCREEN *et al.*, 2001).

A expressão das quitinases vegetais já foi investigada em resposta a certos eventos como a presença de patógenos. Vários gêneros de *Pinus* apresentam, como resposta ao ataque de microorganismos, a síntese de quitinases (PIRTTILA *et al.*, 2002). Esta resposta induzida foi alvo de vários estudos de biologia molecular. Plantas de tabaco geneticamente modificadas carregando o gene de quitinase 5B fusionado com GUS ( $\beta$  glucuronidase) mostraram que, durante o ataque de fungos como *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolfsii*, estes genes são superexpressos (ROBY *et al.*, 1990). Algumas quitinases já foram utilizadas no controle de pestes e patógenos. A quitinase BjCHI1 de *Brassicae juncea*, uma enzima com dois domínios de ligação à quitina, foi clonada e expressada em células de fumo, onde mostrou tanto atividade antifúngica contra *Aspergillus niger* e *Trichoderma viridae* quanto atividade inseticida contra a lagarta *Pieris rapae* (FUNG *et al.*, 2002). Genes codificando endo- e exoquitinases clonados à partir do fungo micoparásita *Trichoderma atroviride* foram inseridos, sozinhos ou combinados, em maçãs (BOLAR *et al.*, 2001). As plantas resultantes apresentaram resistência ao fungo *Venturia inaequalis*, sendo a resistência diretamente proporcional ao nível de expressão. As plantas expressando as duas enzimas apresentaram uma resistência superior quando comparadas com aquelas que sintetizavam apenas uma enzima de cada vez. Adicionalmente, as quitinases apresentam modo de ação conjunto sendo sua atividade fortalecida pela presença de outras enzimas como proteinases e  $\beta$  1,3-glucanases (MAUCH e STAEHELIN, 1989).

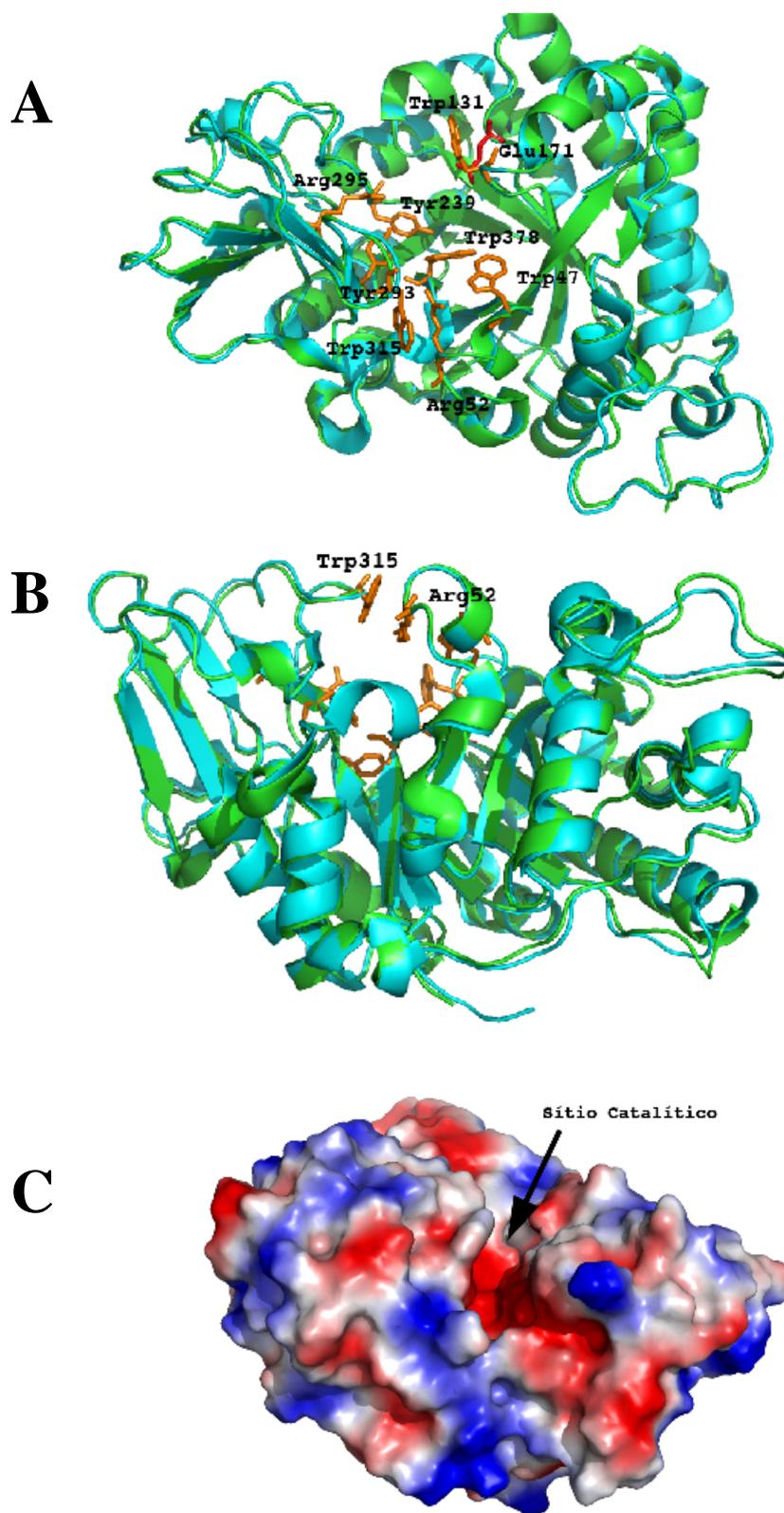


Figura 5: Estruturas terciárias da quitinase. Em verde a quitinase de *Coccidioides immitis* (CiX1) (PDB 1LL4) (BORTONE *et al.*, 2002), em azul a quitinase de *Aspergillus fumigatus* (ChiA1) (PDB 1I2D) (RAO *et al.*, 2005). A) Visão posterior do sítio catalítico. B) Visão lateral do sítio catalítico. Para ambos, hélices representam as  $\alpha$ -hélices e setas representam folhas  $\beta$ . Em amarelo são representados os resíduos de ancoragem e acomodação do substrato na enzima. Em vermelho o resíduo importante para catálise C) Visão da superfície molecular do sítio catalítico. Em vermelho cargas negativas, em azul cargas positivas e em branco as não polares.

### 1.5 $\beta$ -1,3 glucanases

$\beta$ -Glucanos, assim como a quitina e a celulose, são polímeros largamente distribuídos na natureza. São encontrados em plantas, microorganismos e em alguns invertebrados (STONE e CLARKE, 1992). Esta molécula é formada por polímero de glicose ligados por pontes glicosídicas em conformação  $\beta$  (1,3) ou  $\beta$  (1,6) (Figura 6). Acredita-se que glucanos possuem múltiplas funções como, por exemplo, armazenagem (PITSON *et al.*, 1993), proteção e parasitismo como no caso de  $\beta$ -glucanos produzidos extracelularmente por *Botrytis cinérea* que facilitam sua penetração no hospedeiro (GIL-AD *et al.*, 2001).

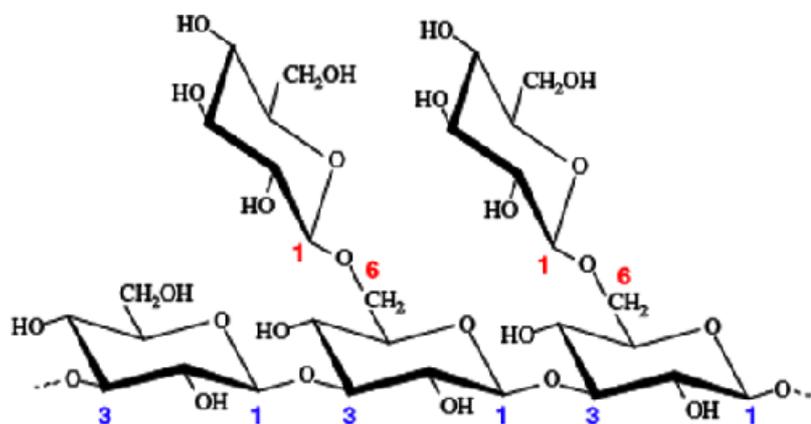


Figura 6: Polímero de glicose em ligação glicosídica do tipo  $\beta(1,3)$  (em azul) e  $\beta(1,6)$  (em vermelho). Fonte: [http://4e.plantphys.net/images/ch15/wt1501c\\_s.png](http://4e.plantphys.net/images/ch15/wt1501c_s.png)

Por sua vez, as  $\beta$ -glucanases catalisam a hidrólise das ligações glicosídicas utilizando um mecanismo clássico de catálise ácido, onde é necessário um doador de prótons e um receptor nucleofílico (STONE e CLARKE, 1992). O *Enzyme Commission* classifica as  $\beta$  glucanases como O-glicosil hidrolases (EC 3.2.1.--) . Já o CAZy as classifica como pertencendo as famílias 1, 3, 9, 16, 17, 55, 64 e 81 das glicosil hidrolases (GH). De acordo com o sítio de hidrólise, as glucanases podem ser

## 1. INTRODUÇÃO

---

divididas como  $\beta(1,3)$  ou  $\beta(1,6)$  endo/exoglucanase. As endo glucanases clivam a matriz de glucanos aleatoriamente enquanto que as exo glucanases clivam as pontas não reduzidas dos glucanos. Essas enzimas já foram encontradas em diversos organismos incluindo plantas, fungos e bactérias (NORONHA e ULHOA, 2000; GIL-AD *et al.*, 2001). No caso dos fungos, essas enzimas são essenciais para a colonização do hospedeiro e obtenção de energia, e podem atuar sinergisticamente com outras hidrolases como as quitinases (MAUCH e STAEHELIN, 1989). Algumas glucanases já tiveram sua estrutura terciária elucidada. Dentre elas, podemos citar a exo- $\beta(1,3)$  glucanase de *Candida albicans* (Exg) (CUTFIELD *et al.*, 1999). Essa enzima é secretada em abundância por *C. albicans*, possuindo tanto atividade hidrolítica quanto atividade de transferase (CUTFIELD *et al.*, 1999). Ela possui uma estrutura em forma de barril  $(\alpha/\beta)_8$  que acomoda o sítio catalítico, o Glu<sub>192</sub> (doador de próton) e o Glu<sub>292</sub> (nucleofílico), atuando com um mecanismo de duplo deslocamento como pode ser observada na Figura 7 (CUTFIELD *et al.*, 1999).

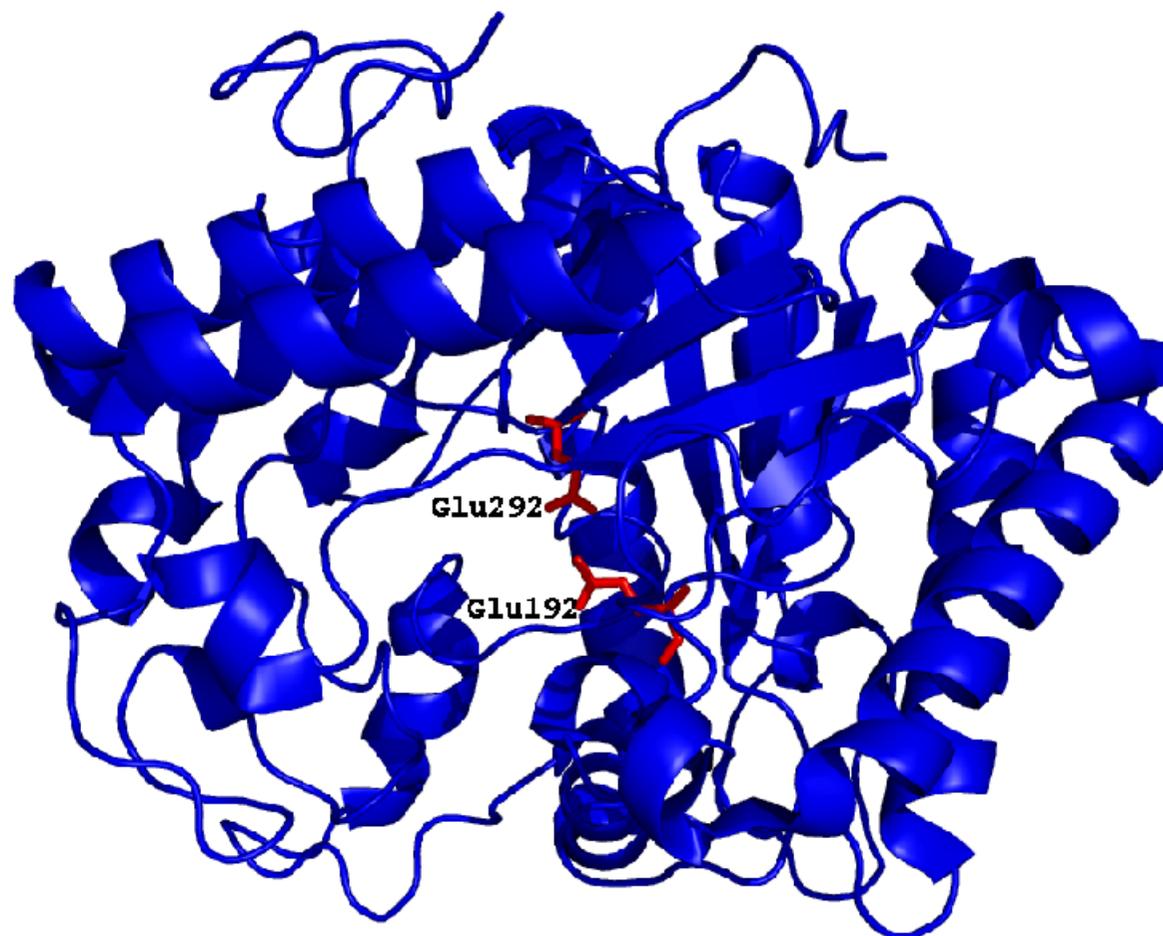


Figura 7: Estrutura terciária de  $\beta$  1,3 glucanase de *Cândida albicans* (PDB 1EQC) (CUTFIELD *et al.*, 1999). Setas representam folhas  $\beta$  e hélices representam  $\alpha$ -hélices. Em vermelho o sítio catalítico.

### *1.6 Proteinases*

Proteinases ou endopeptidases são enzimas que hidrolisam ligações peptídicas e podem ser divididas em dois grandes grupos tomando-se como base a forma de ataque da cadeia polipeptídica. As proteinases apresentam a propriedade de reconhecer o sítio de clivagem na região interna da proteína alvo gerando, dessa forma, dois grandes peptídeos (BERG *et al.*, 2002). O outro grupo é representado pelas carboxipeptidases ou exopeptidases que iniciam o processo de degradação a partir das extremidades (amino ou carboxi-terminal) das proteínas produzindo pequenos peptídeos ou mesmo resíduos de aminoácidos. Adicionalmente, as proteinases também se subdividem em sete clãs, tomando-se como base o grupo reativo presente no sítio ativo envolvido na catálise, que são as proteinases serínicas (clã Sx), cisteínicas (clã Cx), aspárticas (clã Ax), metálicas (clã Mx), glutâmicas (clã Gx), treônicas (clã Tx), múltiplos grupos reativos (clã Px) e as desconhecidas (clã Ux) (RYAN, 1991; RAWLINGS *et al.*, 2006). Segundo o banco de dados de peptidases MEROPS (RAWLINGS *et al.*, 2006), existem cerca de 66500 seqüências de proteinases cadastradas que estão distribuídas pelos sete clãs. Cada clã possui um número 'x' de famílias. O clã "Ax" possui seqüências de proteinases de praticamente todos os reinos, assim como o clã "Cx", "Sx" e "Mx". As famílias "C-" e "PA" são praticamente exclusivas de proteinases de vírus. O *Enzyme Commission* (EC) divide as proteinases em 4 grupos (EC 3.4.21.--, EC 3.4.22.--, EC 3.4.23.-- e EC 3.4.24.-- ) (BARRETT, 1997), mas a classificação é confusa para a maioria dos grupos, problema que não é encontrado no banco de dados MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>).

Cada família de proteinase descrita no MEROPS possui um mecanismo de

## 1. INTRODUÇÃO

---

catálise distinto, bem como uma estrutura tridimensional. Para exemplificar, o mecanismo de catálise do clã Ax, das proteases aspárticas, se baseia em dois aminoácidos aspárticos e uma molécula de água para causar um ataque nucleofílico na ligação peptídica da proteína-substrato (JAMES, 2004). A estrutura terciária foi elucidada em apenas algumas famílias, como na AA1 representada pela pepsina humana (FUJINAGA *et al.*, 1995). No clã Cx, das cisteíno protease, a estrutura tridimensional é descrita como possuindo dois subdomínios estruturais onde no meio se forma o sítio catalítico (REVERTER *et al.*, 2005). O primeiro domínio é formado por um barril  $\beta$  contendo dois resíduos do sítio catalítico, uma histidina e um resíduo ácido (Asp/Glu) responsável pela orientação do imidazol na His. O segundo domínio é formado por um conjunto de  $\alpha$ -hélices contendo o resíduo de cisteína do sítio catalítico (Figura 8A) (REVERTER *et al.*, 2005). Uma glutamina também é essencial na formação do sítio oxifônico. Na família CE48, temos uma cisteíno protease de *Saccharomyces cerevisiae*, cuja estrutura tridimensional foi elucidada (MOSESSEVA e LIMA, 2000). Nesta protease, o sítio catalítico é composto por quatro resíduos sendo estes a His<sub>514</sub>, o Asp<sub>531</sub>, a Gln<sub>574</sub> e a Cys<sub>580</sub> (Figura 8A) e apresenta o mesmo mecanismo de catalise descrito anteriormente por Reverter *et al.* (2005). No clã Gx, das proteinases glutâmicas possui, por enquanto, uma única protease de *Scytalidium lignicolum*, cuja estrutura tridimensional também foi elucidada (FUJINAGA *et al.*, 2004). A estrutura dessa família é caracterizada por folhas  $\beta$  arranjadas de modo formando um sanduíche (Figura 8B). O sítio catalítico é formado por uma glutamina (Gln<sub>53</sub>) e um glutamato (Glu<sub>136</sub>), e a catálise se dá por um ataque nucleofílico de uma molécula de água ativada pelo Glu<sub>136</sub> no carbono da ligação peptídica (Figura 8B). A Gln<sub>53</sub> provê assistência eletrofílica e estabilização oxifônica (FUJINAGA *et al.*, 2004). Nas serino proteases, Clã Sx, temos uma estrutura

## 1. INTRODUÇÃO

---

elucidada de uma carboxipeptidase de *S. Cerevisiae*, cujo sítio catalítico se baseia nos resíduos Ser<sub>146</sub>, Asp<sub>338</sub> e His<sub>397</sub> (Figura 8C), onde a molécula de água também ataca a ligação peptídica da proteína e o aspartato confere o pH ideal para que a catálise possa ser feita (JUNG *et al.*, 1998). A estrutura terciária é caracterizada por possuir um dobramento do tipo alfa/beta hidrolase (OLLIS *et al.*, 1992) comum neste grupo (Figura 8C). Uma enzima desse grupo muito estudada e utilizada em procedimentos laboratoriais é a tripsina (SCHMIDT *et al.*, 2003). Sua estrutura tridimensional é diferente das outras serino-proteases, sendo constituída praticamente de folhas  $\beta$  envolvidas por duas  $\alpha$ -hélices. Na Figura 9A esta representada a estrutura terciária da tripsina de *Fusarium oxysporum*. Seu sítio catalítico é representado pelos resíduos Ser<sub>195</sub>, Asp<sub>99</sub> e His<sub>56</sub> (Figura 9). Seu mecanismo de catálise foi altamente estudado e elucidado (Figura 9B) (SCHMIDT *et al.*, 2003). Estudos utilizando inibidores de protease, como o PMSF, revelaram que, inicialmente, a tríade catalítica fica estabilizada intermolecularmente por pontes de hidrogênio (Figura 9B -1). Em seguida, o oxigênio da Ser<sub>195</sub> compete pelas ligações do nitrogênio presente no N-terminal da proteína se ligando covalentemente ao carbono e liberando o N-terminal clivado (Figura 9B - 2 e 3 ). Em seguida um molécula de água causa um ataque nucleofílico ao carbono ligado ao oxigênio da Ser<sub>195</sub> sendo estabilizado pela His<sub>56</sub> (Figura 9B -4). A hidroxila é liberada em conjunto com o resto da cadeia polipeptídica, e a tríade catalítica volta ao seu estado inicial (Figura 9B -5). Em todos os passos, o aspartato mantém a histidina estabilizada eletricamente (Figura 9B) (SCHMIDT *et al.*, 2003). O clã das treoninas peptidases atualmente possui apenas uma seqüência de *S. Cerevisiae*, e sabe-se apenas de um resíduo importante na catálise, a Thr<sub>215</sub>, que por mutação sítio dirigida leva esta enzima à perda de atividade (ABADJIEVA *et al.*, 2000). No clã Px, as enzimas geralmente possuem os seguintes

## 1. INTRODUÇÃO

---

resíduos no sítio catalítico His, Asp, Ser/Cys e por isso são ditas por conter múltiplos grupos reativos. Não se tem certeza se é uma tríade (His, Ser/Cys, Asp) ou por uma dupla (His Ser/Cys) e não há um mecanismo de catálise proposto para esse clã, supõe-se apenas que devem ser semelhantes a serino ou das cisteíno protease (POLGAR, 2004a; POLGAR, 2004b). Por sua vez, as proteinases podem ser divididas de acordo com o sítio de clivagem. Dentre elas temos as Tripsinas, que cortam o C-terminal de argininas e lisinas, as Clostripainas, que cortam o C-terminal de argininas, as *Stafilococal* protease (ou Glu-c), que clivam o C-terminal de aspartatos e de glutamatos, As Quimotripsinas, cortando o C-terminal de tirosinas, triptofanos, fenilalaninas, leucina e metionina, as Subtilisinas, que clivam qualquer ligação peptídica independente da cadeia lateral dos resíduos e, por último, as carboxipeptidases A que clivam o N-terminal de todos os resíduos exceto argininas, lisinas e prolinas (BERG *et al.*, 2002).

As proteases vem sendo extensivamente estudadas ao longo dos anos. Atividade proteolítica foi detectada *in situ* por Goettel *et al.* (1989) durante a penetração da cutícula de insetos pelo fungo *M. anisopliae*. Uma endoprotease serínica secretada por *B. bassiana* foi expressa e clonada por Joshi *et al.* (1995b), apresentando uma massa molecular de 26 kDa. St-Leger *et al.* (1996a) já havia descrito tripsinas encontradas em diversos ascomicetos. Espécies de *Fusarium* secretam proteases alcalinas ao infestar sementes de cevada (PEKKARINEN *et al.*, 2003). Esses trabalhos demonstram a importância da atividade proteolítica para os fungos no processo de colonização dos hospedeiros. Já em plantas, duas proteases aspárticas, cardosina A e B, de flores de *Cynara cardunculus* foram clonadas, expressadas e bioquimicamente caracterizadas por Pimentel (PIMENTEL *et al.*, 2007), possuindo características de defesa contra fungos. Uma protease cisteínica

## 1. INTRODUÇÃO

---

encontrada em tomate (*Solanum lycopersicon*) possui dupla função, atuando como peptidase e regulando a expressão de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (MATARASSO *et al.*, 2005). A protease atua no citoplasma até que, por sinalização, uma modificação por ubiquitina ocorre, permitindo que a protease entre no núcleo onde atua como um fator de transcrição (MATARASSO *et al.*, 2005). Esses trabalhos comprovam a importância das proteases na proteção, regulação de expressão e também na degradação de proteínas em fungos e plantas.

## 1. INTRODUÇÃO

---

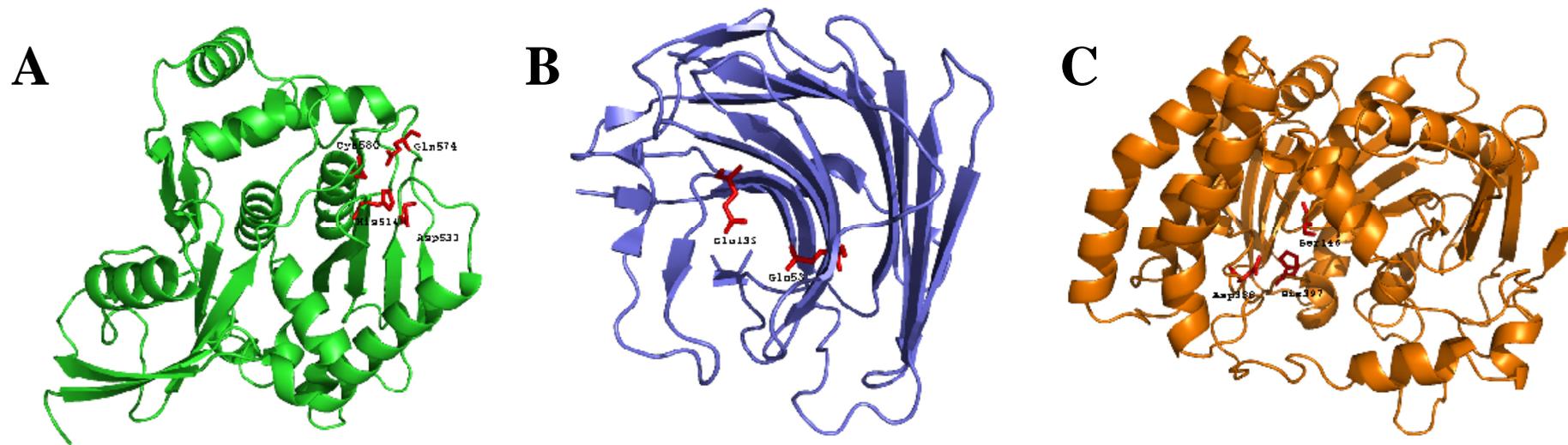


Figura 8: Estrutura tridimensional de proteases. A) proteinase cisteínica de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 1EUV) (MOSESSESOVA e LIMA, 2000). B) proteinase glutâmica de *Scytalidium lignicolum* (PDB 2IFW) (FUJINAGA *et al.*, 2004). C) proteinase-serínica de *Saccharomyces cerevisiae* (PDB 1YSC) (JUNG *et al.*, 1998). Hélices indicam  $\alpha$ -hélices e setas representam as folhas  $\beta$ . Em vermelho os resíduos do sítio catalítico.

## 1. INTRODUÇÃO

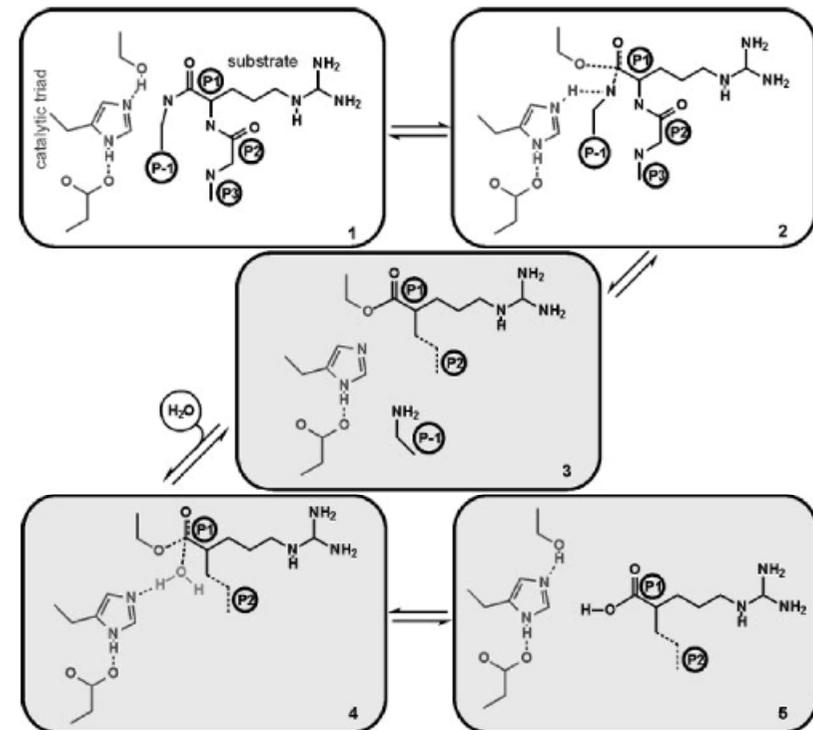
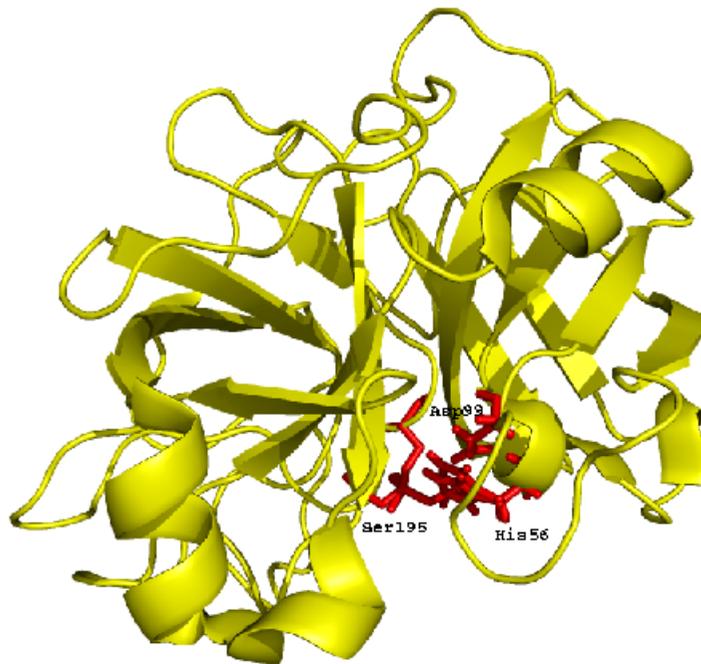


Figura 9: Estrutura terciária da tripsina de *Fusarium oxysporum*. A) Setas representam folhas  $\beta$  e hélices representam  $\alpha$ -hélices. Em vermelhos são representados os resíduos do sítio catalítico. B) Mecanismo de catálise proposta por Schmidt *et al.*, (2003) da tripsina de *Fusarium oxysporum*.

### ***1.7 Estratégia: O uso dos fungos *M. anisopliae* e *B. Bassiana* no controle de *C. maculatus****

Segundo Fuxa e Tannada (1987) fungos entomopatogênicos são caracterizados por causarem epizootias, possuírem alta taxa de crescimento, produção elevada de unidades infectantes, capacidade de sobrevivência no ambiente do seu hospedeiro, capacidade de resistir à barreiras físico-químicas do tegumento e da hemolinfa do hospedeiro e capacidade de provocar sua morte rapidamente.

Estudos experimentais em patologia de insetos começaram com a infestação manual de insetos domesticados, como abelhas e o bicho-da-seda, através dos trabalhos de Agostinho Bassi e Louis Paster, como revisado por Lord (2005). A idéia era usar doenças para combater pestes; uma vez sabendo que era contagioso, um indivíduo doente transmitiria naturalmente sua chaga para um indivíduo saudável. Inclusive, Bassi transmitiu artificialmente *Beauveria bassiana* em larvas do bicho-da-seda, verificando a viabilidade de uso em larga escala posteriormente (LORD, 2005).

No final do século 19, os EUA começaram programas para controle microbiológico do percevejo *Blissus leucopterus* utilizando *B. bassiana* (Figura 10). Luger (1888) espalhou insetos doentes nos campos de Minnesota resultando, aparentemente, em uma boa taxa de mortalidade. Mais tarde, o governo de Kansas estabeleceu uma base de experimentos na Universidade do estado onde distribuiu gratuitamente mais de 50.000 pacotes contendo esporos de *B. bassiana* para os fazendeiros. Rapidamente, os estados vizinhos também começaram seus próprios programas de distribuição (LORD, 2005).

Do outro lado do mundo, na Rússia, Metchnikoff buscando controle do caruncho de cereais *Anisoplia austriaca*, que havia causado grandes perdas econômicas, encontrou vários organismos entomopatogênicos como bactérias,

## 1. INTRODUÇÃO

---

nematóides e um fungo que conhecemos por *Metarhizium anisopliae* (Figura 11). Mais tarde, testou o uso desse fungo no combate ao gorgulho da beterraba (*Cleonus punctiventris*), estimando sua mortalidade em 40% (METCHNIKOFF, 1880) e, em seguida, insinuou o uso e a produção de *M. anisopliae* em larga escala. Krassiltschik (1888) elaborou um procedimento de cultivo de *M. anisopliae* em larga escala usando como substrato beterraba, resultando em 55kg de esporos em menos de 4 meses. Em seguida misturou esporos com areia e dispersou em terras em volta de Kiev. O estudo foi descontinuado, mas toda a Europa passou a testar e usar fungos como controle para vários insetos (LORD, 2005).

Desde então, *M. anisopliae* e *B. bassiana* vem sendo usados mundialmente como os maiores agentes de controle de pragas (REIS *et al.*, 2004). No Brasil seu uso em larga escala está vinculado a pecuaristas no controle do carrapato bovino *Boophilus microplus* (MELO *et al.*, 2006). Tanques contendo esporos comercialmente vendidos de ambos os fungos são feitas para que os animais passem pela água onde a disseminação dos esporos é feita. Após 16 dias, os carrapatos começam a cair mortos da pele dos animais. Essa solução se mostra eficaz na maioria dos casos, evitando o uso de inseticidas que podem comprometer a qualidade da carne, uma vez que esses compostos são absorvidos pela pele do animal, entrando em sua corrente sanguínea onde permanecem ativos por um período de tempo. Adicionalmente, estudos foram feitos para utilização de fungos entomopatogênicos no controle de *Tetranychus urticae*, um ácaro que se alimenta da seiva de plantas; este organismo é altamente resistente a acaricidas, e representa uma das pragas mundiais de hortifrutis (TAMAI, 2002). Testes de campo conduzidos com *Tetranychus urticae*, em feijão comum (*P. vulgaris*), mostraram um aumento significativo de mortalidade dos ácaros causado pelo polvilhamento de uma preparação de conídios a 0,5% de *B. bassiana*. Observou-

## 1. INTRODUÇÃO

---

se ainda que ninfas e adultos se mostraram suscetíveis ao ataque do patógeno (DRESNER, 1949). O autor observou que ácaros mortos que se encontravam sobre as plantas desprendiam-se facilmente da folha, enquanto que alguns cadáveres apresentavam sintomas de liquefação e crescimento micelial. Os resultados da avaliação, cinco dias após a aplicação do patógeno, revelaram 63,6% de mortalidade contra 18% no controle. Além disso, *B. bassiana* pode ser usado para controlar espécies de Coleoptera, Hemiptera e Homoptera (ONOFRE *et al.*, 2002).

Baseando-se na morfologia e na produção de conídios, três espécies de *Metarhizium* foram identificadas: *M. anisopliae* (Figura 11) (Metsch.) Sorokin, *M. flavoviride* (Gams; Rozsypal) e *M. album* (Petch), sendo todas elas potenciais agentes de controle microbiano de pragas de interesse agrícola e em saúde pública (ONOFRE *et al.*, 2002). *M. anisopliae* apresenta geralmente conídios uninucleados (TINLINE e NOVIELLO, 1971), com pequena proporção de binucleados (LUNA, 1985; BAGAGLI *et al.*, 1991). Luna e Azevedo (1985) estudando várias linhagens de *M. anisopliae*, obtiveram indicações de que a grande variação na forma e tamanho de conídios parece ser característica do gênero, não se relacionando tão estritamente às condições de cultura. Este fungo apresenta processo de heterocariose, o qual foi descrito por Tinline e Noviello (1971), sendo que o processo parassexual completo, com obtenção de diplóides e segregantes, foi descrito por Messias (1979), Messias e Azevedo (1980) e Al-Aidroos (1980). Veen (1968) apontou *M. anisopliae* como um agente de controle biológico com grandes potencialidades, tendo como hospedeiros mais de 200 espécies de insetos, dentre eles *Anopheles gambiae*, o transmissor da malária (SCHOLTE *et al.*, 2003). Desde então, a utilização e ação deste patógeno vêm sendo estudadas sobre muitas espécies de insetos, como o carrapato bovino *Boophilus microplus* (MELO *et al.*, 2006) e o *Alphitobius diaperinus*, um

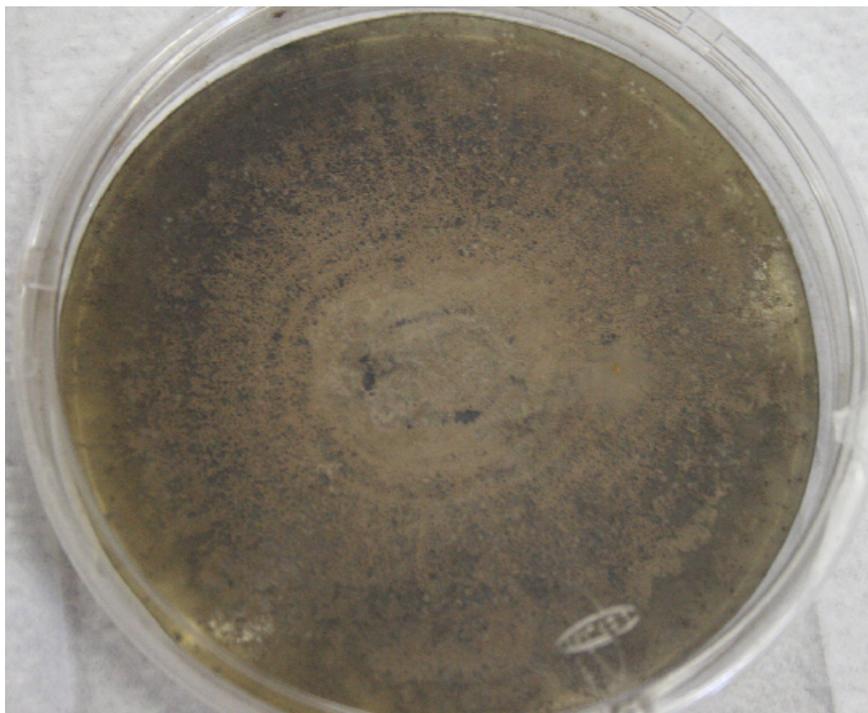
## 1. INTRODUÇÃO

---

Tenebrionidae que ataca vários tipos de sementes armazenadas (ALEXANDRE *et al.*, 2006).



**Figura 10:** O fungo *Beauveria bassiana* em placa de petri em BDA.



**Figura 11:** O fungo *Metarhizium anisopliae* em placa de petri em BDA.

### *1.8 A proteômica*

O termo proteômica apareceu no início de 1995 e é definida pela caracterização em larga escala de todas as proteínas expressadas em uma célula, tecido celular ou organismo (WILKINS *et al.*, 1995). Mas os estudos começaram bem antes, em 1975, com o aparecimento dos géis bidimensionais desenvolvidos por O'Farrell (1975) e a combinação de focalização isoeletrica de Klose (1975) para estudar mutações pontuais em proteínas expressas em tecidos celulares de camundongos. Mas, mesmo com novos métodos de separação molecular de proteínas, ainda não era possível identificar os *spots* visualizados nos géis, que só foi possível com a fusão do sequenciamento de proteínas pelo método de degradação de Edman desenvolvido anteriormente em 1949 (EDMAN, 1949), associado à digestão enzimática das proteínas em membranas de nitrocelulose em 1987 por Aebersold *et al.* (1987). A identificação de proteínas somente tornou-se eficiente com o advento da espectrometria de massa (ANDERSEN e MANN, 2000) e o aumento dos bancos de dados genômicos por sequenciamento do DNA de vários organismos (BRODER e VENTER, 2000). Mas sem a técnica de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) (HENZEL *et al.*, 1993), onde comparam-se massas geradas a partir de digestão enzimática dos *spots* de interesse com as massas da digestão teórica desses bancos de dados genômicos, nenhuma técnica pôde gerar identificações em larga escala até então.

Desde então, a proteômica vem sendo usada para determinar níveis de expressão em tecidos celulares (proteômica de expressão proteica) (ANDERSON e SEILHAMER, 1997), identificação de todas as proteínas expressas em uma célula ou tecido (proteômica estrutural) (BLACKSTOCK e WEIR, 1999) e o entendimento e elucidação da função de proteínas específicas (proteômica funcional) (KLOSE, 1975),

## 1. INTRODUÇÃO

---

além de servir como ferramenta para análise de interações proteína-proteína (ARENKOV *et al.*, 2000) e modificações pós-traducionais (KRISHNA e WOLD, 1993). De alguns anos para cá, a avaliação proteômica de fungos foi realizada por diversos autores, auxiliando na elucidação de certos processos fisiológicos. Shimizu e Wariichi (2005) utilizaram-se de mapas proteômicos preparados a partir de micélios e protoplastídeos, indicando uma variedade de proteínas com massas moleculares e pontos isoelétricos distintos. Neste ponto, a produção de mapas protéicos utilizando géis bidimensionais foi recentemente utilizada para o identificar importantes proteínas com propriedades antifúngicas de *Trichoderma harzianum* (GRINYER *et al.*, 2004). Este pode prevenir o crescimento de fungos fitopatogênicos em diversos tipos de plantações, se tornando uma alternativa ao uso de fungicidas químicos. Mais tarde, Suarez *et al.* (2005) detectou uma nova protease aspártica do mesmo fungo em situação de indução a diversas paredes celulares de fungos. Bidochka e Khachatourians (1994) também se baseou em experimentos utilizando géis bidimensionais para analisar a degradação de exoesqueleto do gafanhoto *Melanoplus sanguinipes* por proteinases produzidas por fungos entomopatogênicos. Este estudo mostrou que 200 diferentes proteínas, entre 30 kDa e 90 kDa, podem ser visualizadas em cutícula de gafanhoto não tratada, enquanto apenas 30 podem ser contabilizadas nos géis resultantes do tratamento com proteases. Outros proteomas de fungos mostram mapas protéicos distintos em situações diferentes como, por exemplo, os estudos de Carberry *et al.* (2006) que mostraram uma análise das proteínas intracelulares do patógeno humano *Aspergillus fumigatus*, onde se encontraram cerca de 250 proteínas das quais 44% são enzimas envolvidas no metabolismo de energia. Por último, enzimas hidrolíticas foram detectadas em micélios e na secreção de *Trichoderma atroviride* nos trabalhos de Grinyer *et al.* (2005).



## **2. OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

Com a hipótese de que os fungos entomopatogênicos produzem enzimas hidrolíticas e outras moléculas que são utilizadas por eles para predação de insetos, pretende-se isolar e caracterizar enzimas hidrolíticas com capacidade inseticida ativa e específica contra o gorgulho do feijão de corda (*C. maculatus*) utilizando-se de técnicas proteômicas como espectrometria de massa, modelagem molecular e géis bidimensionais.

### 2.1 Objetivos específicos

- Identificação de isolados de *M. anisopliae* e *B. bassiana* virulentos ao caruncho de feijão de corda (*C. maculatus*).
- Detecção de atividade de enzimas hidrolíticas em *M. anisopliae* e *B. bassiana*,
- Análises por SDS-PAGE e gel bidimensional de secreções de *M. anisopliae* e *B. bassiana* obtidas após indução pela presença de exoesqueleto de *C. maculatus*.
- Identificação das proteínas diferenciais produzidas por *M. anisopliae* e *B. bassiana*.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

---

## 3. Material e Métodos

### 3.1 Insetos

As colônias de *C. maculatus* foram mantidas e criadas em frascos estéreis contendo sementes de feijão de corda (*V. unguiculata*), incubadas em uma estufa à 28°C com umidade controlada de 60-70%. Após 24 horas da oviposição, os adultos foram removidos e desidratados em estufa à 49°C por 48 horas e macerados com o auxílio de almofariz e pistilo.

### 3.2 Avaliação da patogenicidade de isolados de *B. bassiana* e *M. anisopliae*

Esporos de dez isolados de cada fungo (Tabela 1 e Tabela 4) foram germinados em placas de petri contendo meio BDA (10% batata, 0,1% glicose e 2,5% de ágar) por um período de 15 dias, em incubadora a 28°C. Os esporos produzidos foram ressuspensos em uma solução contendo 0,1% de Tween80 obtendo-se uma concentração final de  $1 \text{ à } 4 \times 10^8$  esporos.mL<sup>-1</sup>. 2 mL foram então pulverizados com um *Potter Spray Tower* (Burkard Manufacturing, Hertfordshire, Inglaterra), um equipamento que pulveriza uniformemente uma solução em uma região de 9 cm de diâmetro. O controle negativo foi efetuado utilizando 2 mL de solução contendo 0,1% de Tween80. Antes da pulverização, os insetos foram imobilizados utilizando um fluxo de CO<sub>2</sub>. O ensaio foi feito em triplicata com 10 insetos para cada isolado. Após a pulverização da solução, os insetos foram colocados em uma incubadora a 28°C e observados diariamente para o controle de possíveis mortes. Os insetos mortos foram mantidos em uma estufa umidificada, para confirmar se as mortes foram causadas pelo fungo. Cinco concentrações diferentes foram usadas para cada isolado (10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>,

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

$10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  esporos.mL<sup>-1</sup>), e o número de esporos por unidade de área foi calculado e usado para calibração do equipamento (*Potter Spray Tower*) de acordo com Vicentini *et al.* (2001). Concentração letal a 50% (CL50), parâmetros de regressão e significância para cada isolado foram calculados usando o método Probit com o software Micro Probit 3.0 (THOMAS e SPARKS, 2001). Intervalos de confiança de 95% foi usado para testar estatisticamente as diferenças encontradas nos isolados por CL50.

#### **3.3 Obtenção e cultivo de esporos dos fungos entomopatogênicos *B. bassiana* e *M. anisopliae***

Esporos liofilizados dos fungos *B. bassiana* e *M. anisopliae*, isolados CG05 e CG34 respectivamente, foram obtidas da coleção de fungos entomopatogênicos do Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) e germinados em placas de petri de 10cm de diâmetro, contendo BDA por um período de 7 dias em incubadora a 29°C. Os esporos produzidos, em seguida, foram germinados em *erlemeyers* contendo meio TM autoclavado (0,1% bactopectona, 0,03% Uréia, 0,2% de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,4% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,03% MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>3</sub> como elemento traço e 0,3% de Glicose) por 3 dias sob agitação a 130 rpm, a 29°C. Após o período de incubação em meio TM, os micélios foram lavados e transferidos para novos *erlemeyers*, contendo meio mínimo (MM) autoclavado (0,2% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,03% MgSO<sub>4</sub>, 1,4% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e FeCl<sub>3</sub> como elemento traço) ou contendo meio mínimo adicionado de 0,5% de macerado de exoesqueletos desidratados de *C. maculatus* (MMC), também previamente autoclavado. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado em filtros milipore com poros de 0,60µm de diâmetro, dialisado em membranas com corte de 1000 kDa ou 3000 kDa, liofilizado e armazenado a -20°C.

#### ***3.4 Quantificação de proteínas***

Utilizando a metodologia descrita por Bradford (1976), 1mL de reagente de Bradford (100mg de comassie brilliant blue, 50 ml de etanol 95% e 100ml de ácido fosfórico 85%) foi pipetado em 100µl de amostra, utilizando 100µl de água destilada como controle negativo. A solução foi agitada e deixada em repouso por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram avaliadas por espectrofotometria a 595nm. A absorbância obtida foi convertida em µg de proteína por meio de uma curva padrão previamente definida, utilizando albumina sérica bovina em diferentes concentrações.

#### ***3.5 Ensaios de proteinases alcalinas***

Aproximadamente 100µg de amostra foram pipetados em tubos de ensaio contendo 500µl de caseína a 5%, pH 8.0, e incubados por 30 minutos a 40 °C. Foram adicionados 1500µl de ácido tricloroacético a 75% (TCA) para parar a reação. Como controle negativo, foi utilizado o mesmo procedimento, porém a adição do TCA se deu antes da incubação. Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 10.000rpm e 4 °C. O sobrenadante foi monitorado por espectrofotometria a 280nm. Os resultados foram convertidos em unidades internacionais, onde uma unidade corresponde à quantidade de enzima necessária para aumentar em 0,1 a absorbância (ST-LEGER *et al.*, 1987).

#### ***3.6 Ensaio de quitinase***

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

Ensaio de atividade quitinolítica foram executados segundo Aroson *et al.*, (1967), onde aproximadamente 300 $\mu$ g de amostra foram fervidas por 10 minutos para inativação das enzimas que, posteriormente, serão utilizadas como controle negativo. As amostras fervidas, bem como outros 500 $\mu$ l de amostra não fervidos, foram pipetados juntamente com 500 $\mu$ l de quitina coloidal a 1% e incubadas por 6 horas a 37°C. De cada solução, 250 $\mu$ l foram pipetados em tubos de ensaio e foi adicionado 1ml de reagente de Dinitrossalicilato-DNS (dissolver 1% de ácido dinitrosalicílico em 200ml de NaOH 2M aquecido a 70 °C. Dissolver separadamente 30% de tartarato de sódio e 30% de potássio tetrahidratado em 500ml de água destilada. Adicionar lentamente a primeira solução a segunda e completar o volume para 1000ml) e fervidos por 5 minutos como descrito por Miller (1959). Em seguida as soluções foram monitoradas a 550nm. Após a retirada do valor do branco, a absorbância encontrada foi convertida em microgramas de N-acetil-D-glicosamida produzido através de uma curva padrão usando o mesmo substrato. O resultado final foi convertido em unidades internacionais, onde uma unidade enzimática corresponde a quantidade de enzima necessária para transformar 1 $\mu$ mol de produto por minuto. Quitina coloidal foi preparada usando 20 g de quitina de carapaças de carangueijo (Sigma). Em seguida, foi adicionado 500 mL de 12M HCL sob agitação, por 4 horas a 4 °C. A solução foi filtrada e lavada com etanol 50% até que um pó branco começasse a precipitar, então 200 ml de água destilada foi adicionada e precipitado por 15h à 4 °C. O precipitado foi lavado várias vezes com água MiliQ até que o pH chegasse a 7,0. A solução final foi liofilizada e armazenada à temperatura ambiente.

#### ***3.7 Ensaio de atividade amilolítica.***

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

Ensaio enzimático utilizando  $\alpha$ -amilases extraídas de pâncreas de porco, adquiridas comercialmente, e de intestinos médios de larvas de *C. maculatus* foram realizados utilizando tampão acetato 50mM, contendo CaCl 25 mM em pH 6.5 e amido a 1% como substrato, obtendo-se um volume final de 250 $\mu$ l. Foram utilizados aproximadamente 100 $\mu$ g de cada amostra, sendo a reação monitorada a 530nm utilizando ácido DNS, de acordo com o método de Bernfeld (1955). As absorbâncias foram convertidas para  $\mu$ g. $\mu$ l<sup>-1</sup> de glicose utilizando uma curva padrão. O resultado final foi convertido em unidades internacionais, onde uma unidade enzimática corresponde à quantidade de enzima necessária para gerar 1 $\mu$ mol de produto por minuto.

#### 3.8 Análise de massa molecular por SDS-PAGE

Análises de massa molecular foram feitas em *SDS-PAGE* (*Sodium Dodecyl Sulphate PolyAcrylamide Gel Eletrophoresis*) a 12.5% de acordo com o método de Laemmli (1970). Mini-géis foram feitos utilizando o *Mini-Proteome* SDS-PAGE da Biorad. O gel separador foi feito com 2mL de solução de 30% acrilamida|bisacrilamida (29:1), 1,25mL de tampão Tris pH8,8 (1,5M tris-hidroximetil-aminometano, 0,4% Dodecil Sulfato de Sódio (SDS), pH 8,8 ajustado com HCl 1M), 1,70mL de dH<sub>2</sub>O, 50 $\mu$ l de 10% de persulfato de amônio e 3 $\mu$ l de TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina). O gel de empilhamento foi feito utilizando 0,42mL de solução a 30% de acrilamida|bisacrilamida (29:1), 0,34mL de tampão Tris pH6,8 (1M tris-hidroximetil-aminometano, 0,4% de SDS, pH 6,8 ajustado com HCl 1M), 1,75mL de dH<sub>2</sub>O, 25 $\mu$ l de 10% de persulfato de amônio e 3 $\mu$ l de TEMED. A corrida foi realizada a 200 volts e 20mA por 45 minutos. Para os géis 2DE, foi utilizado o equipamento Hoefer da GEhealthcare e 20mL de solução de 30% acrilamida|bisacrilamida (29:1), 12,5mL de tampão Tris pH8,8 (1,5M tris-

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

hidroximetil-aminometano, 0,4% SDS, pH 8,8 ajustado com HCl 1M), 14,5mL de dH<sub>2</sub>O, 500µl de 10% de persulfato de amônio e 25µl de TEMED. A corrida foi realizada a 200 volts e 40mA durante 5 horas.

#### **3.9 Análise proteômica da secreção de *M. anisopliae* e *B. bassiana***

Os secretomas produzidos foram analisado por géis bidimensionais segundo protocolo adaptado de Kniemeyer *et al.* (2005). 500µg de proteínas foram precipitados com TCA a 75% a 4°C, centrifugado a 13.000 rpm, 4 °C por 20 minutos, lavado com acetona 100% e novamente centrifugado a 13.000 rpm , 4 °C por 20 minutos. Os precipitados foram ressuspendidos em 330µl de solução de re-hidratação, contendo uréia 8M, 7mg de DTT, CHAPS 2%, azul de bromofenol (traço) e 2% de IPG Buffer (pH-3-11 GE HealthCare), e aplicados em *strips* de 13cm ou de 18cm de com variação não linear de pH de 3-10 (para as *strips* de 18cm) e 3-11 (para as *strips* de 13cm) e deixado em repouso por 10 horas. O tamanho das *strips* foi escolhido de acordo com o tamanho das placas. A focalização isoeétrica foi executada em gradiente à 2 mA e 5 Watts em 500 volts por 30 min, 1000 volts por 30 min, 3500 volts por 90 min e 3500 volts constantes por 330 min. Em seguida, as *strips* foram imersas em uma solução de equilíbrio, contendo uréia 6M, DTT 1%, SDS 2% e azul de bromofenol (traço), por 15 minutos e, então, aplicadas em SDS-PAGE a 12,5% de acordo com o método de Laemmli (1970) em placas de 18x24x0,15cm e de 18x16x0,1cm. Estas corridas foram conduzidas a 250volts, 50mA e 10watts por 5 a 7 horas utilizando um banho de refrigeração a 20 °C. O gel foi corado utilizando nitrato de prata ou commasie coloidal como corantes, e as bandas identificados.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 3.10 Coloração de géis

Os géis foram visualizados fixando-os em solução contendo metanol e ácido acético (4:1:1) por 20min, seguida por três lavagens com etanol 50%. O coramento com nitrato de prata seguiu os procedimentos descritos por Shevchenko *et al.* (1996) onde o gel é sensibilizado por 1 min em 0,01% de tiosulfato de sódio, seguida por 3 lavagens com água destilada, 20 min de repouso em 0,1% de nitrato de sódio e 0,07% de formaldeído 38%, seguida de 3 lavagens com água destilado e revelação em solução de 1% de carbonato de sódio e 0,07% de folmaldeído 38%. Ao atingir a coloração desejada, a reação foi interrompida utilizando a solução inicial de fixação. O coramento com comassie coloidal foi feito segundo Neuhoff *et al.* (1988), onde os géis são imersos em 250ml de solução contendo 10% de sulfato de amônio, 2% de ácido fosfórico, 0,1% de comassie G250 e 20% de metanol nessa ordem e deixados sob agitação de um dia para outro. Neste procedimento as bandas (*spots*) devem aparecer sem a necessidade de descorante.

#### 3.11 Remoção da Coloração

Para a remoção da coloração, os *spots* foram lavados 3 vezes em água destilada por 5 minutos. Para remoção da prata, seguindo o método descrito por Shevchenko *et al.* (1996), foi adicionado 500µl de 100mM de tiosulfato de sódio e 500µl de ferrocianeto de potássio e os *spots* foram incubados em temperatura ambiente por 40 minutos. Os *spots* foram novamente lavados com água destilada 3 vezes por 5 minutos e em seguida lavados com 500µl de 25mM de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (bicarbonato de amônio) em acetonitrila 50% 3 vezes por 15 minutos. Para remoção da comassie coloidal, os géis foram lavados com solução contendo metanol e ácido

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

acético (4:1:1) até a remoção da cor, de acordo com Neuhoff *et al.* (1988).

#### 3.12 Digestão de Proteínas em Gel

A digestão dos *spots* foi feita de acordo com Shevchenko *et al.* (1996). Os *spots* foram cortados com o auxílio de uma lâmina de bisturi e colocados em microtubos. Adicionou-se 300 µl de 100% de acetonitrila por 5mm, retirou-se o sobrenadante e secou-se em um concentrador a vácuo *Speed Vac*. As amostras foram incubadas a 56 °C durante 1 hora em 50 µl de 10 mM de DTT em 100 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. A solução de DTT foi substituída por 50 µl de iodoacetamida 55 mM em 100 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> seguido de incubação por 45 minutos no escuro em temperatura ambiente. Após duas lavagens com 100 µl de 100 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> por 10 minutos, adição de 100 µl de acetonitrila e remoção do excesso, as amostras foram liofilizadas em *Speed Vac*. A rehidratação foi feita com 50 µl de 50 mM de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, 5 mM de CaCl<sub>2</sub> e 650 ng de tripsina *Gold Sequencing Grade* (Promega) em gelo durante 45 min. Em seguida, o sobrenadante foi substituído pela mesma solução, sem tripsina, e os géis incubados durante 24 horas a 37 °C. O sobrenadante resultante foi usado para espectrometria de massa.

#### 3.13 Análise por Espectrometria de Massa

O secretoma produzido por ambos os fungos foi analisado utilizando a técnica de espectrometria de massa, de acordo com Henzel *et al.* (1993). As amostras produzidas foram preparadas para análise de MALDI-TOF/TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption ionized Time of Flight-Time of Flight*) em um aparelho UltraFlex II MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Billerica, MA). 2µl de amostra diluída em

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

TFA 1.0% adicionado de 6µl de uma matriz composta por ácido  $\alpha$ -cyano-4-hidroxicinâmico (em uma solução dissolvida de acetronitrila/ácido trifluoracético 0.1% 1:1, v/v). Em seguida, a solução foi homogeneizada em vortex e 0,5µl foi aplicado no UltraFlex II. As amostras foram secadas à temperatura ambiente e o espectrômetro foi operado em modo refletido para obtenção das massas dos fragmentos gerados pela tripsina, e em modo *Lift* para refragmentação de íons para sequenciamento *de novo*. Os íons das amostras foram submetidos à irradiação automatizada, onde o laser foi operado com potência modulada (de baixa para alta), com 200 tiros aleatórios utilizando um método de procura hexagonal. Os espectros resultantes foram armazenados para posterior análise.

#### 3.14 Identificação de Proteínas

Os *spots* de interesse foram identificados por PMF e por sequenciamento *de novo*. Após a digestão com tripsina, os peptídeos foram analisados por espectrometria de massa. As massas encontradas foram comparadas ao banco de dados não redundante do NCBI utilizando o software MASCOT (MASCOT versão 2.1.0, Matrix Science, Londres), assumindo carboximetilação e oxidação da metionina como modificações. Os resultados encontrados foram avaliados segundo *score* significativo e comparado à massa molecular e ponto isoelétrico do *spot* em análise. Sequenciamento *de novo* foi executado manualmente, subtraindo às massas dos íons encontrados nos espectros a partir da série Y. O valor da diferença foi comparado as massas dos aminoácidos e a sequência foi anotada. Em seguida, uma procura no banco de dados Swiss-Prot ([www.expasy.org](http://www.expasy.org)) foi feita utilizando a ferramenta MPSrch do *European Intitute of Bioinformatics* – EBI comparando-se o fragmento encontrado com as proteínas armazenadas no banco. Proteínas cujo valores de massa

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

---

e ponto isoelétrico fossem semelhantes com as dos *spots* analisados e cujo ponto de corte do fragmento encontrado fosse equiparável com um fragmento tríptico, foram anotadas.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

**4. RESULTADOS E DISCUSSÃO****4.1 *Metarhizium anisopliae***

Dez isolados de *Metarhizium anisopliae* que foram obtidos de diferentes insetos (Tabela 1), objetivando-se testar e avaliar sua patogenicidade contra *C. maculatus*.

<b>Isolados de <i>M. anisopliae</i></b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Origem</b>
CG34	<i>Conotrachelus sp.</i>	AM-Brasil
CG38	Coleoptera: Scarabaeidae	RO-Brasil
CG97	Coleoptera: Scarabaeidae	DF-Brasil
CG100	Coleoptera: Scarabaeidae	DF-Brasil
CG210	<i>Cerotoma arcuata</i>	GO-Brasil
CG236	<i>Coleomegilla maculate</i>	GO-Brasil
CG256	<i>Chalcodermus aeneus</i>	GO-Brasil
CG292	<i>Aphodius tasmaniae</i>	Australia
CG293	<i>Ancognatha scarabaeoides</i>	Colombia
CG294	<i>Popillia japonica</i>	Japão

**Tabela 1: Isolados de *M. anisopliae* com seus respectivos hospedeiros e origem**

Por meio de testes de patogenicidade previamente descritos em Material e Métodos, três isolados (CG34, CG292 e CG100) demonstraram virulência contra *C. maculatus* com mortalidade de 27%, 14% e 10% dos insetos respectivamente. Destes, apenas CG34 e CG100 causaram mortalidade significativa, sendo avaliados em seguida por testes CL50 a uma concentração de 1 à  $5 \times 10^4$  esporos.cm<sup>-2</sup>. O resultado pode ser observado na Tabela 2, onde CL50 não indicou diferença estatística entre os dois isolados embora os resultados da regressão mostrem que CG34 ocasionou maior letalidade (Tabela 2).

<i>M. anisopliae</i>	CL 50	a	b± (SE)	χ <sup>2</sup>
CG34	1,39 x 10 <sup>4</sup> (6,48 x 10 <sup>3</sup> – 2,88 x 10 <sup>4</sup> )	1,80	0,77 ± 0,11 b	4,29 ns
CG100	1,76 x 10 <sup>4</sup> (5,91 x 10 <sup>3</sup> – 5,11 x 10 <sup>4</sup> )	2,91	0,49 ± 0,08 b	7,13 ns

**Tabela 2: Testes CL50 (p<0,05) e parâmetros de regressão a (y- interseção) e b (inclinação) (estimado pelo método Probit) para os dois isolados testados contra insetos adultos de *Callosobruchus maculatus*. χ<sup>2</sup> indica os ajustes de dados para o modelo Probit. Valores de b indicam a diferença estatística (ANOVA F<sub>3,16</sub>=34.37, p<0.001 e teste Student-Newman-Keuls p<0.05).**

Assim, para todos os testes utilizando *M anisopliae* descritos nessa tese, foi usado o isolado CG34. Um ponto a ser considerado é o pH do meio usado para a incubação. Segundo St-Leger *et al.* (1998; 1999), o pH do ambiente é altamente determinante na expressão de enzimas degradantes de cutículas e, segundo o mesmo autor, *M. anisopliae* altera o pH do ambiente permitindo a atividade extracelular de proteinases. Desta forma não houve ajuste do pH dos meios utilizados, sendo que o meio possuía inicialmente pH de 3,6 e, após a incubação, o pH passou para 5,3 confirmando a alteração indicada (ST-LEGER *et al.*, 1999).

#### 4.1.1 Quantidade de proteínas obtidas, ensaios enzimáticos e análise de massa molecular por eletroforese

Como descrito em Material e Métodos, o sobrenadante do meio na presença e na ausência de exoesqueleto de *C. maculatus* foi recolhido por três dias seguidos após a incubação dos micélios. *Metarhizium anisopliae* demonstrou facilidade de germinação e manejo. Após a quantificação de proteínas (BRADFORD, 1976), foi constatado que no meio indutor, após três dias de incubação, foram contabilizadas 267 µg.mL<sup>-1</sup> enquanto no meio mínimo 49µg.mL<sup>-1</sup>, mostrando um acréscimo de 544%. No entanto o resultado da quantificação por este método pode estar

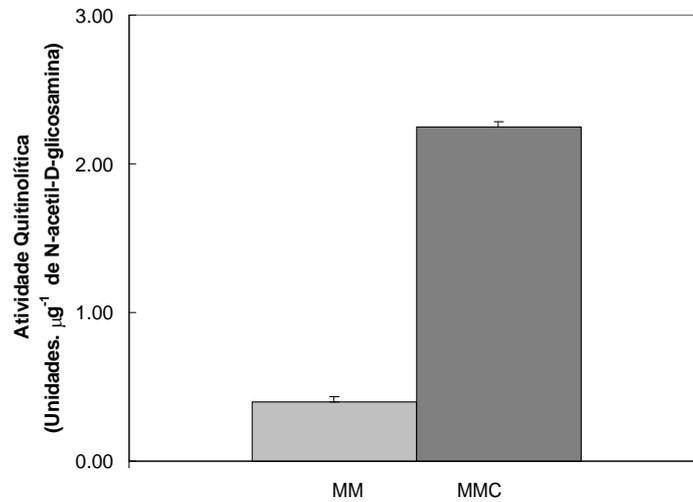
#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

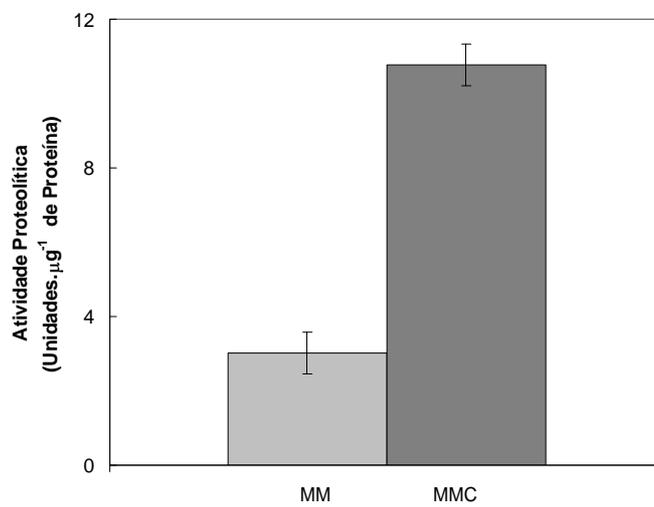
superestimado uma vez que em ambos os meios continham sulfato de amônio, que reage ao método Bradford aumentando a absorbância lida. Nos experimentos seguintes isso se demonstra verdadeiro, necessitando um maior cultivo para obtenção de quantidades suficientes para experimentos em géis bidimensionais.

Para verificar a produção de enzimas hidrolíticas, foram executados ensaios para detecção de proteases alcalinas bem como ensaios de atividade quitinolítica e  $\alpha$ -amilolítica. *M. anisopliae* apresentou elevada atividade proteolítica (11 Unidades. $\mu\text{g}^{-1}$ ) e quitinolítica (2,3 Unidades. $\mu\text{g}^{-1}$ ) e muito baixa atividade  $\alpha$ -amilolítica (0,65 Unidades. $\mu\text{g}^{-1}$ ) no meio indutivo (MMC), mas baixa ou nenhuma atividade no meio não indutivo (MM). Esses resultados podem ser visualizados na Figura 12. Estes resultados eram esperados uma vez que o meio indutivo continha 0,5% de exoesqueleto de *C. maculatus*, uma única e rica fonte de carbono, proteína e nitrogênio a disposição. A grande atividade proteolítica e quitinolítica demonstra a expressão dessas enzimas induzidas na presença de substratos específicos. Em contrapartida, a baixa atividade  $\alpha$ -amilolítica também era esperada uma vez que não havia amido nos meios produzidos.

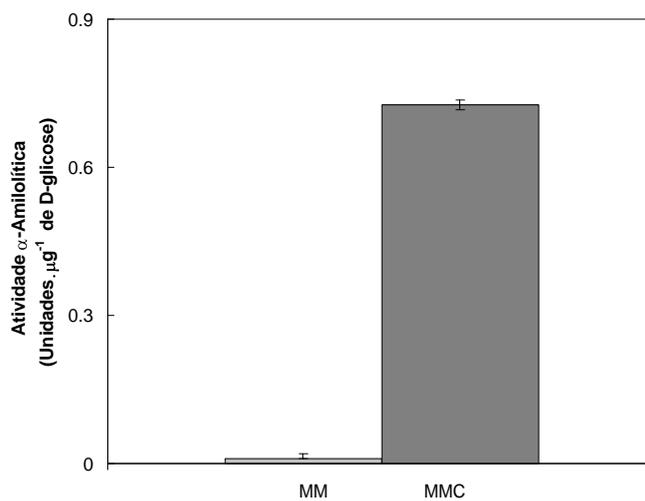
**A**



**B**



**C**



**Figura 12: Ensaio enzimático. Atividades A- quitinolítica, B- proteolítica e C-  $\alpha$ -amilolítica da secreção de *M. anisopliae* em meio indutivo (MMC) e não indutivo (MM).**

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

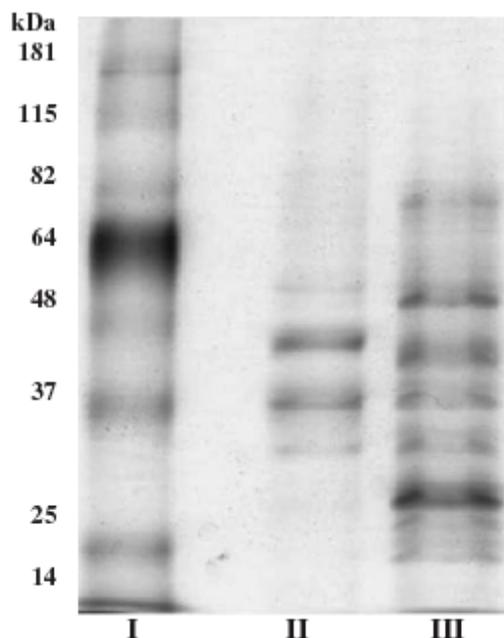


Figura 13 SDS-PAGE a 12,5%, das proteínas secretadas por *M. anisopliae*. I - Marcador de massa molecular, II- Proteínas encontradas no meio não indutivo (MM), III- proteínas encontradas no meio indutivo contendo 0,5% de exoesqueleto de *C. maculatus*. (p:v) (MMC).

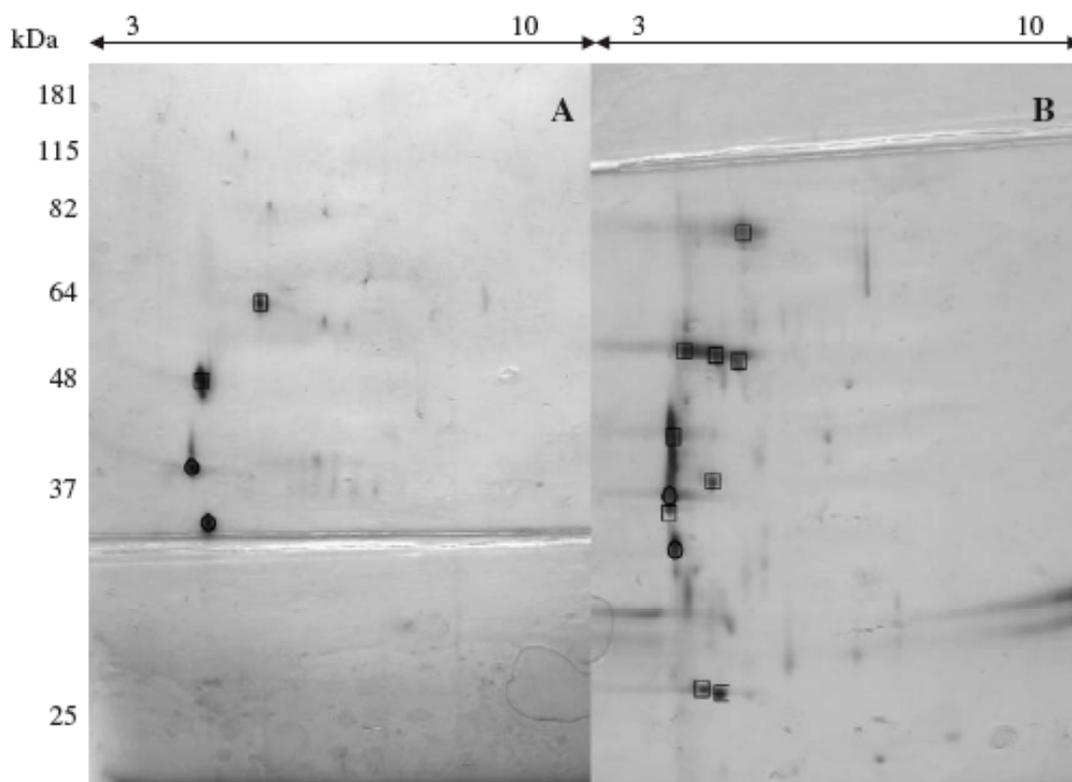
No intuito de analisar o padrão protéico, 100  $\mu$ g de proteína de cada amostra foram preparadas precipitando com TCA/acetona para a aplicação em SDS-PAGE a 12,5%. O gel resultante pode ser observado na Figura 13.

Este gel revelou o padrão de proteínas produzidas pelo *M. anisopliae* em situação de indução e não indução. Quantidades significantes de proteínas de diversas massas moleculares podem ser observados no meio contendo exoesqueleto de *C. maculatus*, dentre elas proteínas de aproximadamente 27 kDa, 30 kDa, 37 kDa, 45 kDa, 50 kDa e 70 kDa. Apesar do meio mínimo mostrar um padrão de bandas menor, proteínas de aproximadamente 32 kDa, 33 kDa, 35 kDa e 50 kDa foram observadas em quantidades consideráveis.

Para uma melhor compreensão do secretoma de *M. anisopliae* produzido na presença e ausência de exoesqueleto de *C. maculatus*, géis bidimensionais utilizando *strips* de 18cm e placas de 18x24x0,15cm foram feitos utilizando os métodos

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

descritos anteriormente. Na Figura 14 foi possível visualizar as diferenças (marcadas com quadrados) e semelhanças (marcados com círculos) entre MM e MMC.



**Figura 14:** Amostras de *M. anisopliae* analisadas por géis bidimensionais (18x24x0,15cm). MM (A) e MMC (B). Spots marcados em círculos identificam similaridades entre os géis A e B. Quadrados identificam as principais diferenças devido a presença de carapaças de *C. maculatus*.

Apenas 4 *spots* podem ser observados no gel MM (Figura 14A) enquanto 11 *spots* significantes foram visualizados em MMC (Figura 14B). Apenas 2 *spots* foram encontrados em posições idênticas em ambos os géis com massa molecular aproximada de 30 kDa e 37 kDa. 2 *spots* são encontrados apenas no gel MM com massas aproximadas de 47 kDa e 57 kDa. Em uma análise final, 6 *spots* são observados apenas na presença de *C. maculatus*, com massas de 27 kDa, 35 kDa, 39 kDa, 45 kDa, 50 kDa e 80 kDa e ponto isoelétrico de 3 a 5, aproximadamente (Figura 14B).

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Em outros trabalhos utilizando o mesmo organismo, varias proteínas com massas moleculares e pontos isoelétricos semelhantes já foram descritos. Segundo os trabalhos realizados por St-Leger *et al.* (1996a; 1998; 1999) duas isoformas de tripsina são produzidas por este fungo na presença de exoesqueleto de barata (*Periplaneta americana*) com ponto isoelétrico de 4,4 (massa molecular de 30 kDa) e de 4,9 (27 kDa) indicando que o isolado em estudo pode ter produzido proteínas semelhantes (marcado em quadrados na Figura 14B). Ainda nos estudos de St-Leger *et al.* (1996b) uma quitinase de 45 kDa foi descoberta para a mesma espécie com ponto isoelétrico de 5,0 induzindo o fungo contra cutícula de *Manduca sexta*. Complementando os estudos, três isoformas de uma quitina deacetilase de 26 kDa , 37 kDa e 70 kDa foram detectadas por Nahar *et al.* (2003) quando induzindo o fungo em meio de cultura contendo quitina vendida comercialmente pela Sigma. Estes resultados sugerem que o isolado em estudo deve produzir as mesmas enzimas uma vez que os ensaios enzimáticos detectaram essas atividades (Figura 12).

Ao analisar novamente o gel unidimensional (Figura 13) aparentemente existem mais proteínas do que as visualizadas nos géis bidimensionais. Com o intuito de detectar possíveis novas proteínas/enzimas, um novo gel bidimensional foi feito mas utilizando placas menores, com espessura menor (18x16x0,1cm) e *strips* de 13cm com escala de pH não linear de 3-11. O gel resultante pode ser observado na Figura 15.

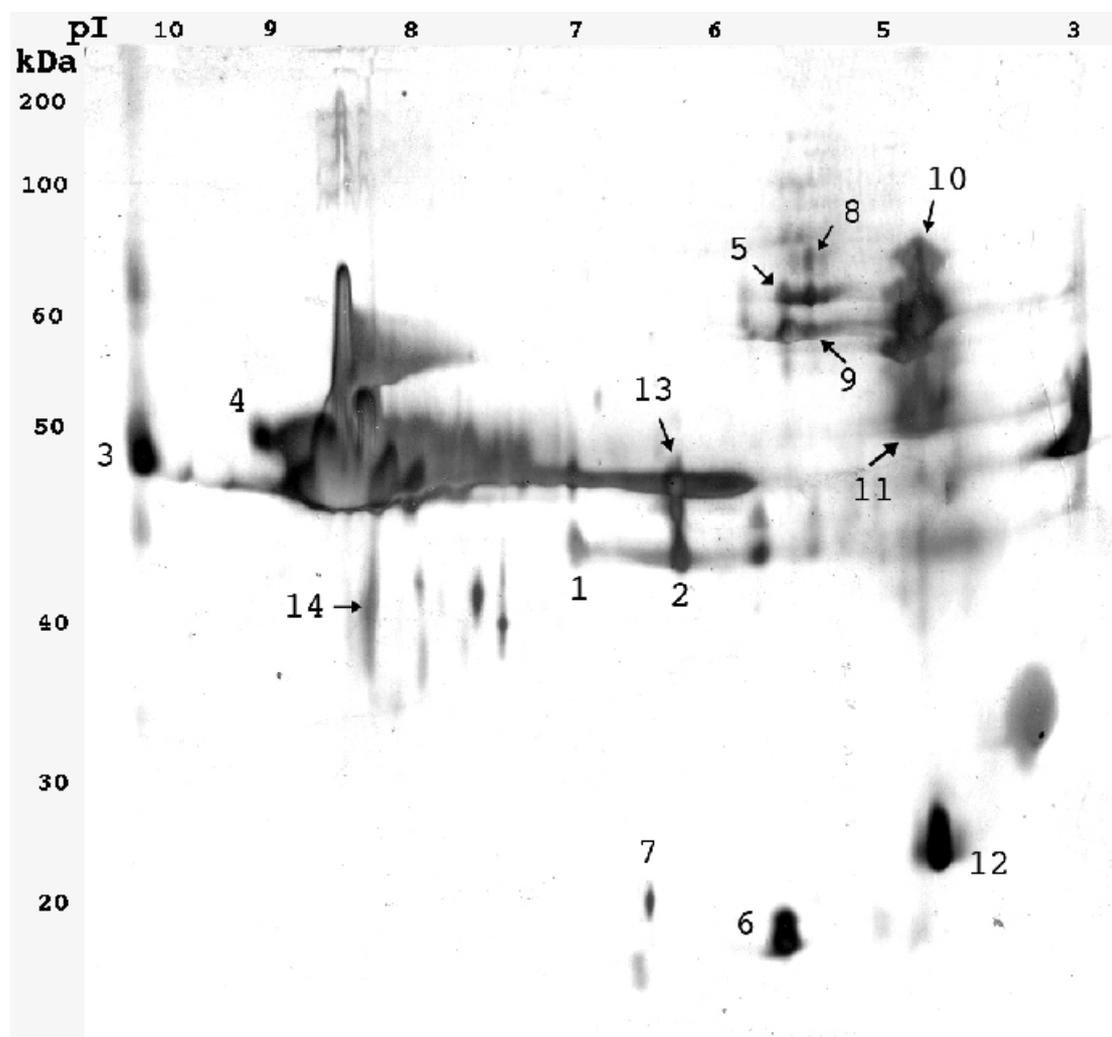


Figura 15: Gel bidimensional (18x16x0,1cm) de MMC. Números indicam *spots* identificados por PMF ou sequenciamento *de novo*.

Com esse novo gel foi possível identificar algumas proteínas que não puderam ser visualizadas no gel anterior (Figura 14B). Esse experimento demonstrou mais eficiência na detecção e identificação de *spots* do que o gel anterior, feito com placas maiores. Em contrapartida, os ruídos, como carboidratos e substâncias não protéicas são evidentes dificultando uma análise mais apurada. Para esses géis foram necessários um maior processamento das amostras visando a remoção de impurezas. Com este intuito foi utilizado o 2D-Clean-Up Kit da GE-HealthCare life sciences que

contém precipitantes e co-precipitantes que auxiliam na remoção desses interferentes, resultando em géis mais limpos.

Vários *spots* foram recortados e digeridos com tripsina, de acordo com o material e métodos, para identificação por PMF e sequenciamento *de novo*, mas apenas os *spots* de interesse marcados no gel (Figura 15) foram passíveis de identificação devido à maior concentração ou pureza.

### 4.1.2 Identificação de *spots* e vias metabólicas.

Após a digestão em gel dos *spots* de interesse, marcados na Figura 15, utilizando tripsina *Gold* (Promega), as amostras foram analisadas por espectrometria de massa como descrito anteriormente. Após a aquisição dos espectros, íons com boa relação sinal/ruído foram submetidos a refragmentação para sequenciamento *de novo*. Utilizando o software MASCOT, os resultados obtidos para as massas moleculares comparadas ao banco de dados não redundante do NCBI, tiveram como critério de seleção além do *score*, a posição de massa bem como o ponto isoelétrico dos *spots* no gel (Figura 15). Para as seqüências obtidas por *de novo*, foi comparado o fragmento encontrado com o banco Swiss-Prot utilizando a ferramenta MPSrch do *European Bioinformatics institute* – EBI. A Tabela 3 mostra a compilação dos resultados obtidos.

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Spot	Cobertura (%)	Score	Massa identificada	PI identificado	Hit	Código de acesso	Peptídeo Sequenciado	Semelhante à
1	15	54	24839	5,39	CIMG_00357 [ <i>Coccidioides immitis</i> RS]	gi 119191960	PMF	Acetiltransferase, familia GNAT <i>Aspergillus fumigatus</i> XP_749174.
2	2	47	43725	6,65	Metionina gama liase	A3EPF4_9BACT	KGYYVYTR	
3	21	44	43533	9,57	Proteína hipotética [ <i>Neurospora crassa</i> OR74A]	gi 85090383	PMF	ref ZP_01313438.1  AAA ATPase [ <i>Desulfuromonas acetoxidans</i> DSM 684]
4	10	45	51382	8,67	Proteína não nomeada [ <i>Kluyveromyces lactis</i> ]	gi 50310061	PMF	ref NP_015228.1 tyrosyl-tRNA sintetase mitocondrial [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]
5	16	34	57243	5,99	Proteinase tipo subtilisina [ <i>Isaria farinosa</i> ]	gi 68165000	PMF	emb CAB63907.1  protease tipo subtilisina PR1H [ <i>Metarhizium anisopliae</i> var. <i>anisopliae</i> ]
6	41	51	14535	5,12	Proteína hipotética [ <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21]	gi 58261708	PMF	sp Q4R5J1 NDUA5_MACFA NADH desidrogenase [ubiquinone]
7	37	44	16057	7,75	Proteína hipotética [ <i>Magnaporthe grisea</i> 70-15]	gi 39946240	PMF	ref NP_084164.1  zinc finger protein 142 [ <i>Mus musculus</i> ]
8	5	40	55108	4,93	Proteína hipotética [ <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> B-3501 <sup>A</sup> ]	gi 134113639	PMF	ref XP_572174.1  alpha-amilase [ <i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21]
9	10	46	51760	4,42	Proteína com papel na regulação da transposição de Ty1 [ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ]	gi 6324123	PMF	
10	9	39	56143	4,74	Proteína não nomeada [ <i>Kluyveromyces lactis</i> ]	gi 50310833	PMF	gi 119890705 ref XP_599034.3  Similar a A-kinase [ <i>Bos taurus</i> ]
11	4	72	38022	5,47	Amidohidrolase 2.	Q1F2S0_9CHLR	KAFWVFDMPNR	
12	24	67	26615	5,68	Tripsina protease [ <i>Metarhizium anisopliae</i> ]	gi 4768909	PMF	
13	2	37	48093	6,84	Possível aminotransferase	Q2P5Z4_XANOM	AFTYTR	
14	4	56	37017	6,73	Oxidoreductase,	A1ZIA1_9SPHI	KQVYHVYYINR	

Tabela 3: Identificação dos spots de MMC de *M. anisopliae*.

Kolkman *et al* (2006) utilizou da proteômica de forma diferente a aplicada no trabalho aqui desenvolvido. Pra isto os autores utilizaram géis unidimensionais onde as bandas foram tripsinizadas e aplicadas em LC MS/MS objetivando identificar a expressão diferenciada de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* em situação de estresse nutricional. Este trabalho apontou que com a limitação de fonte de carbono, a levedura *S cerevisiae* expressa em maior quantidade genes codantes para proteínas de metabolismo de carboidratos, além de algumas relacionadas a maquinaria celular, produção de energia, metabolismo de ácidos graxos, glicólise, fosforilação oxidativa e enzimas do ciclo de ácido cítrico (KOLKMAN *et al.*, 2006). Por outro lado, com a limitação de nitrogênio, a levedura expressa genes que codificam proteínas para metabolismo de aminoácidos, glicólise e metabolismo de glicogênio além de várias enzimas envolvidas na degradação de proteínas (KOLKMAN *et al.*, 2006). Buscando esclarecimentos em como os açúcares são processados em mamíferos e fungos, Lomako *et al* (LOMAKO *et al.*, 2004) revisou como a síntese de glicogênio é feita nestes organismos. Dois fatores se mostraram extremamente importantes: primeiro era necessário uma concentração baixa de UDP-glicose. Segundo observou-se a necessidade da expressão de glicogenina, uma proteína que se auto-glicosila utilizando apenas a UDP-glicose. A glicogenina já foi encontrada em diversos organismos como músculos de coelhos (CARRIZO e CURTINO, 1998), bactérias (UGALDE *et al.*, 2003) e fungos (MU *et al.*, 1996). Segundo Lomako *et al* (2004) estruturas quaternárias da glicogenina glicosilada possuindo massa molecular de 400 kDa chamada de proglicogênio seriam os elicitores ou promotores para a produção de polissacarídeos. Estes açúcares seriam importantes na produção de parede celular bem como na produção de energia. Ainda mais, Lesage e Bussey (2006) revisaram como a parede celular é construída em células de *S. Cerevisiae*. Para isso, diversas enzimas são necessárias incluindo as  $\beta$ -1,3/1,6 glucan sintase, as quitinas sintases (CSI, CSII e CSIII), as quitinas deacetilases envolvidas na biosíntese da parede celular de quitosana, manosição de proteínas

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

como a  $\alpha$ -1,6-manosil transferase,  $\beta$ -1,3 elongase ( $\beta$ -1,3 glucanosiltransferase) quitinases e transglicosidase (LESAGE e BUSSEY, 2006).

Com essas informações, analisando a Tabela 3, e se baseando na atividade enzimática, foi possível traçar uma provável via metabólica na qual as enzimas degradam os principais compostos contidos no meio induzido: quitina, proteínas, outros carboidratos e amônio. A Figura 16 demonstra o ciclo de degradação de quitina. Após a hidrólise da quitina por endo/exo quitinases (KANG *et al.*, 1999) (EC 3.2.1.14), detectados pelos ensaios enzimáticos (Figura 12), monômeros de N-acetil-D-glicosamina são fosforilados pela N-acetil-D-glicosamida kinase (*spot* 10 Figura 15). No caso da quitina ter sido deacetilada por uma quitina deacetilase (NAHAR *et al.*, 2003) (EC 3.5.1.41), que permitiria uma maior solubilização do substrato, após sua quebra por uma quitosanase (NAHAR *et al.*, 2003) (EC 3.2.1.132), os monômeros de D-glicosamina são novamente acetilados pela Glicosamina-N-acetiltransferase (*spot* 1 Figura 15 EC 2.3.1.3) e podem ser fosforilados pela N-acetil-D-glicosamida kinase (*spot* 10 Figura 15). Podemos levantar duas questões, porque deacetilar a quitina e porque fosforilar esses produtos enzimáticos? Propomos que a forma deacetilada da quitina, quitosana, é mais solúvel em água e permitiria a fácil penetração no interior da parede celular do fungo, bem como ser usada como matéria prima para formação da parede celular assim como descrita por Lesage e Bussey (2006). No caso da fosforilação, pode ser um mecanismo para reter os açúcares para uso posterior uma vez que monômeros fosforilados não podem passar pela parede celular. Outra hipótese é de que seja um passo essencial para se chegar a UDP-N-acetil-D-glicosamina, produto importante para a armazenagem, uma vez que poderia ser convertida em UDP-glicose e usada na produção de glicogênio (LOMAKO *et al.*, 2004). O produto dessa etapa, N-acetil-D-glicosamida-6P, pode seguir dois caminhos: ser utilizada na construção de paredes celulares ou continuar sua metabolização energéticas em vias intracelulares. Seguindo a via metabólica (Figura 16), a N-acetilneuraminato liase

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

(Aldolase) transforma N-acetil-neuraminato (sialato) em UDP-N-acetil-D-glicosamina liberando piruvato como subproduto da catálise. UDP-N-acetil-D-glicosamina é substrato importante na via de metabolização de glicosaminaglicanos, glicolipídios e proteoglicanos, ou seja, produtos para armazenagem e reserva de energia na célula (SORENSEN *et al.*, 2003). Como piruvato é substrato importante do ciclo de Krebs é insensato assumir que seja metabolizado extracelularmente uma vez que outros agentes podem se usufruir deste composto. Assim, com base nas proteínas identificadas, propomos que UDP-N-acetil-D-glicosamina é produzida intracelular seguindo a metabolização de N-acetil-D-glicosamina 6P, e usado para metabolização de substâncias para armazenagens no interior celular (SORENSEN *et al.*, 2003).

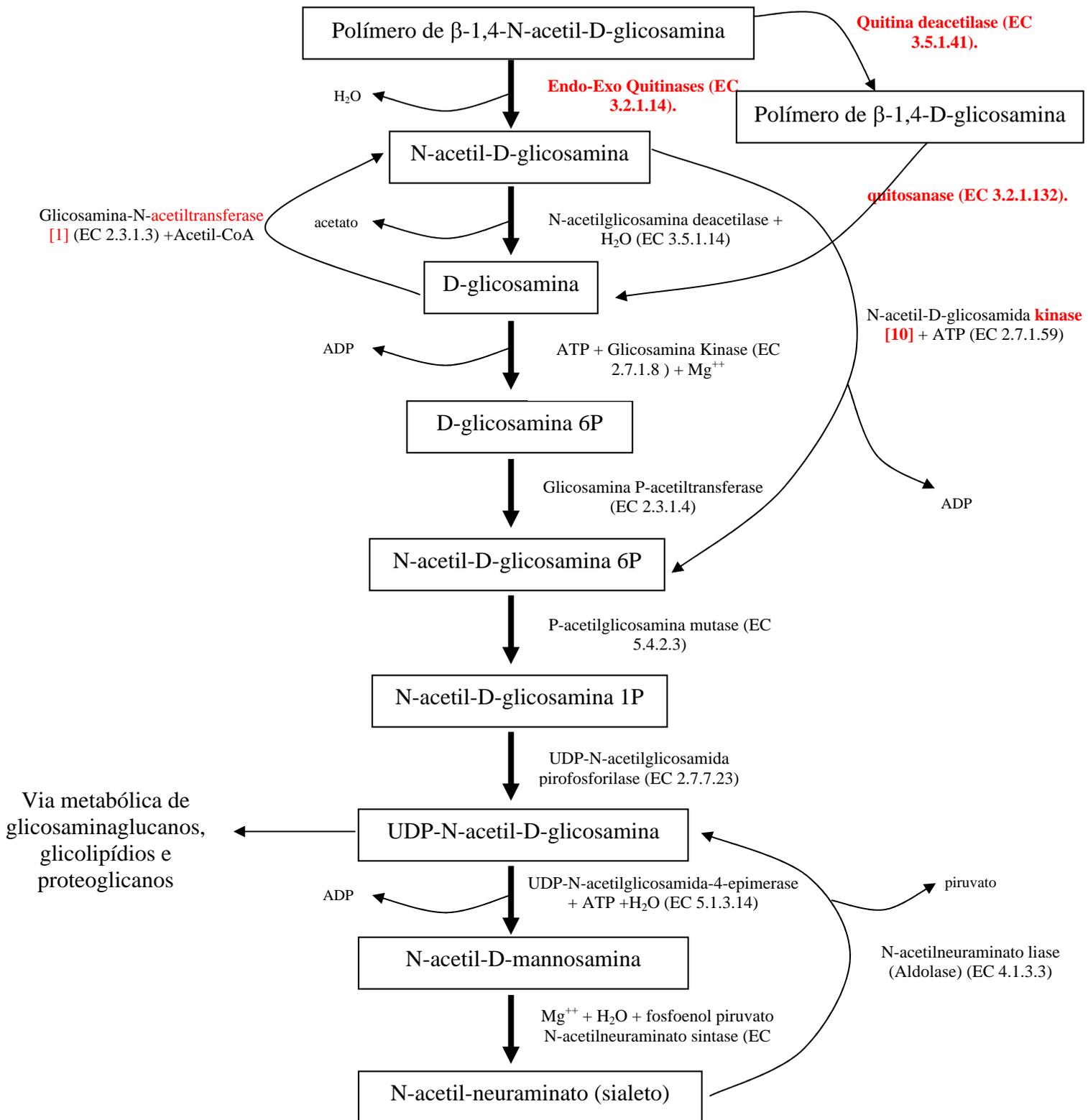


Figura 16: A via metabólica de degradação de quitina. Em vermelho destacam-se as enzimas identificadas e, entre colchetes, os spots equivalentes marcados no gel (Figura 15).

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Por outro lado, também é sabido da produção de enzimas hidrolíticas por *M. anisopliae* na colonização de seus hospedeiros (ST-LEGER *et al.*, 1986; ST-LEGER *et al.*, 1987). Sabe-se também que fungos possuem um mecanismo de regulação da metabolização de nitrogênio diferente de plantas e bactérias (KNEIP *et al.*, 2007). Fungos não são capazes de fixar nitrogênio a partir de N<sub>2</sub>, sendo esta atividade exclusiva de bactérias (KNEIP *et al.*, 2007), mas pode metabolizar moléculas contendo nitrogênio como glutamina, glutamato e amônia, assim como, nitrito, nitrato, aminoácidos, purinas, acetamida e inclusive acrilamida (MARZLUF, 1981). Para esses compostos a síntese de enzimas reguladas por nitrogênio é necessária e, para isso, duas condições devem ser cumpridas: 1- deve haver um aumento da repressão do catabolismo de nitrogênio (determinada pela concentração de amônio) e, 2- indução da produção dessas enzimas por um substrato específico (MARZLUF, 1981). Essas características foram estudadas em nível genético em *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* e sabe-se que a produção de nitrato redutase é diretamente ligada aos genes nit-3 e niaD respectivamente e a de nitrito redutase ligada aos genes nit-6 e niiA respectivamente (MARZLUF, 1981). Assim, sabendo-se da existência de proteínas no meio e da atividade proteolítica de *M. anisopliae* (Figura 12B), também foi possível traçar uma via de metabolização de proteínas e amônio utilizando algumas das identificações em nível proteômico. Na Figura 17 podemos observar uma representação esquemática e simplificada de parte do processo. Proteínas são hidrolisadas por uma tripsina (ST-LEGER *et al.*, 1996a) (Spot 12 Figura 15) e por uma subtilisina (ST-LEGER *et al.*, 1994) (Spot 5 Figura 15). A tripsina corta o ácido carboxílico de argininas e lisinas se não houver um resíduo de prolina antes deste. A subtilisina corta qualquer ligação peptídica. Como resultado obtemos resíduos de aminoácidos e peptídeos. Metionina gama liases (Spot 2 Figura 15) e amidohidrolases (Spot 11 Figura 15) hidrolisam a amina presentes nessas moléculas que por sua vez se tornam substrato para amônia monooxigenase resultando em hidróxidoalamina (NH<sub>2</sub>OH). Seguindo a

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

via metabólica (Figura 17),  $\text{NH}_2\text{OH}$  é oxidado pela Hidroxil-amina-desidrogenase (*Spot 6* Figura 15) em nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) que por sua vez é reduzido a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) pela oxidoreductase (*Spot 14* Figura 15) em um mecanismo semelhante ao descrito por Marzluf (1981). Este é um ciclo importantíssimo para absorção de nitrogênio. Altos níveis de amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) são tóxicos para vários organismos como encontrado em *S. cerevisiae* por Hess *et al* (2006) assim é necessário um mecanismo eficiente de metabolização tanto para esse composto como para seus derivados.

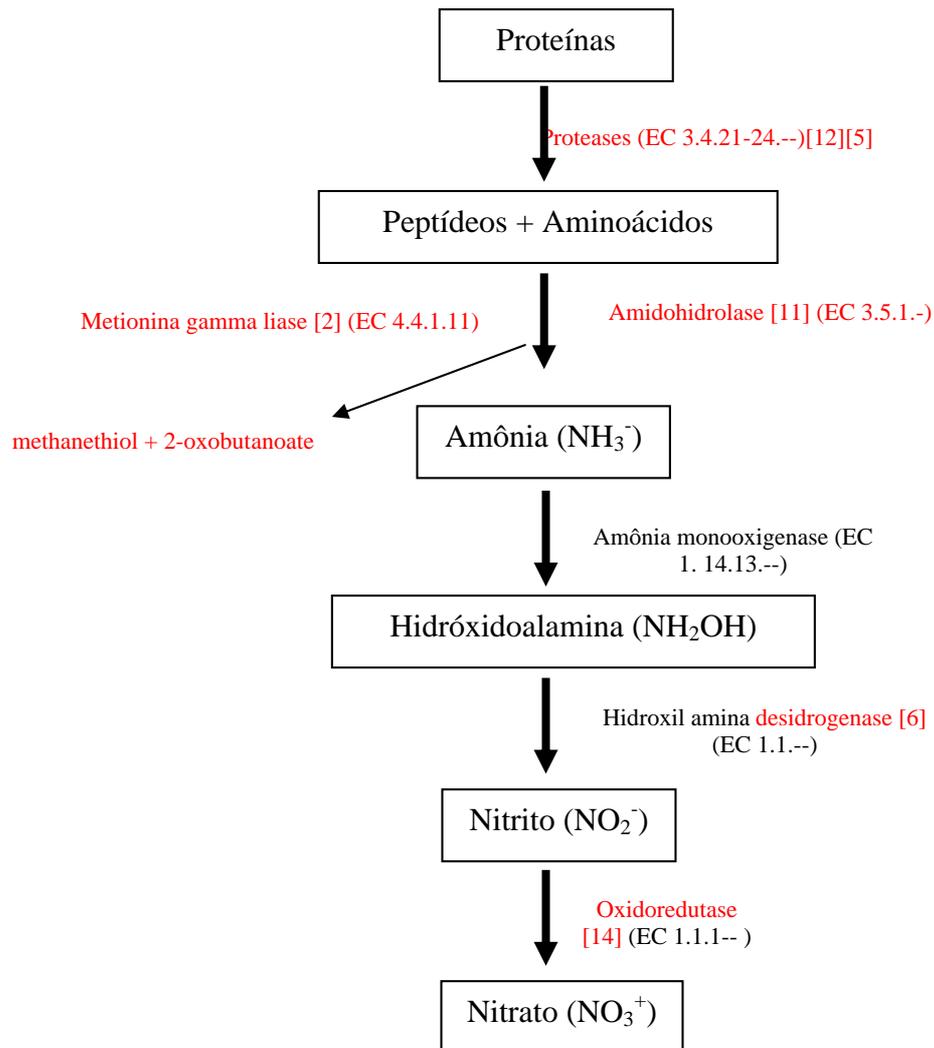


Figura 17: Metabolização de proteínas. Em vermelho proteínas identificadas. Em vermelho destacam-se as enzimas identificadas e, entre colchetes, os *spots* equivalentes marcados no gel (Figura 15).

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

Uma outra importante enzima encontrada foi a aminotransferase (*Spot* 13 Figura 15). Existem diversas aminotransferases. As mais comuns são as encontradas em vias de metabolização de aminoácidos. Como exemplo podemos citar a D-alanina aminotransferase (EC 2.6.1.21) que cataliza a reação D-alanina + 2-oxoglutarate = piruvato + D-glutamato, e aspartato aminotransferase (EC 2.6.1.1) que catalisa a reação L-aspartato + 2-oxoglutarate = oxaloacetato + L-glutamato. Esta ultima foi descrita anteriormente por Cronin *et al* (1991) em *S. cerevisiae*.

A identificação de uma  $\alpha$ -amilase (*Spot* 8), especialmente, chamou a atenção. Os ensaios enzimáticos demonstraram baixa atividade  $\alpha$ -amilolítica (Figura 12C). Não era de se esperar que fosse possível encontrar tal enzima já que carapaças de inseto não contêm amido. Algumas hipóteses podem ser levantadas: 1- o fungo identificou carboidratos no meio e secretou uma série de enzimas hidrolíticas que tenham sítios de ligação a carboidratos (CBD), assim secretando também amilases; 2- Podemos especular que ao autoclavar o meio, mudanças estruturais em algumas moléculas de quitina poderiam tê-las convertido em amido ou outras moléculas já que temperatura e pressão podem acelerar algumas reações. Como o *spot* no gel tem baixa intensidade pode-se supor que foi secretada em um momento mas não em quantidades expressivas. Assim a 1<sup>a</sup> hipótese é plausível de ser verdadeira.

Mas para algumas proteínas identificadas, é difícil de interpretar ou traçar um mecanismo. No caso ATPase (*Spot* 3), TRna Sintetase (*Spot* 4) e Zinc Finger (*Spot* 7) não fazem sentido estarem sendo expressas extracelular, uma vez que a ATPase cliva ATP liberando enorme energia para algum processo fisiológico, TRna sintetase produz Trna, molécula essencial na produção de proteínas, e *Zinc Finger* é geralmente uma proteína de ligação ao DNA e regulação de transcrição gênica (BERG *et al.*, 2002). O papel dessas proteínas ainda não pode ser explicado de maneira verossímil para o meio extracelular. Podemos supor para a proteína de regulação de Ty1 (*Spot* 9 Figura 15) podem atuar como

## 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

senalizador de níveis de produtos hidrolisados, ou regulação do transporte de compostos para o interior da célula fúngica. Sua caracterização, através de sequenciamento completo, poderia explicar seu funcionamento corretamente. Até o momento podemos apenas supor sua atividade.

### 4.2 *Beauveria bassiana*

Dez isolados de *B. bassiana* (Tabela 4) também foram avaliados com relação a sua patogenicidade contra *C. maculatus*, seguindo os testes previamente descritos. Todos os isolados apresentaram virulência contra *C. maculatus*, como pode ser visto na Tabela 5 que também mostra que os isolados CG05 e CG07 apresentaram mortalidade maior que 50%. Testes de CL50 entre estes dois isolados não mostraram diferenças estatísticas, assim como as curvas de regressão, por isso o isolado CG05 foi escolhido para os experimentos seguintes. Os valores encontrados indicam que *B. bassiana* é muito mais virulento que *M. anisopliae*, tornando-se uma melhor alternativa para o estudo em questão.

Isolados de <i>B. bassiana</i>	Hospedeiro	Origem
CG02	<i>Elaeidobius sp.</i>	AM-Brazil
CG05	<i>Coleoptera</i>	DF- Brazil
CG07	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>	U.S.A
CG08	<i>Coleoptera</i>	DF-Brazil
CG11	<i>Nezara viridula</i>	PR-Brazil
CG12	<i>Cycloneda sanguinea</i>	PR-Brazil
CG15	<i>Lebia concinna</i>	PR-Brazil
CG17	<i>Hypothenemus hampei</i>	SP-Brazil
CG26	<i>Coleoptera</i>	DF-Brazil
CG52	<i>Coleoptera</i>	DF-Brazil

Tabela 4: Isolados de *B. bassiana* utilizados nos testes de patogenicidade, hospedeiros naturais e origens

Isolado	Letalidade (%)
CG05	66.3 ( $\pm$ 28.47) a
CG07	54.5 ( $\pm$ 9.79) ab
CG26	39.17 ( $\pm$ 11.76) ab
CG11	25.9 ( $\pm$ 9.02) ab
CG15	19.4 ( $\pm$ 10.3) ab

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

CG17	16.67 ( $\pm$ 16.67) ab
CG12	9.1 ( $\pm$ 5.25) ab
CG8	6.37 ( $\pm$ 3.19) ab
CG2	5.1 ( $\pm$ 2.95) ab
CG52	3.33 ( $\pm$ 3.33) b
Controle	0

Tabela 5: Mortalidade de insetos adultos de *C. maculatus* pelos isolados de *B. bassiana* (valores médios  $\pm$  SE). (ANOVA  $F_{9,20}$ : 3,25  $P=0.013$ , teste SNK  $P>0.05$ )

<i>B. bassiana</i>	CL 50	a	b $\pm$ SE	$\chi^2$
CG05	$2,7 \times 10^4$ ( $1,45 \times 10^4 - 4,89 \times 10^4$ )	-1,09	$1,37 \pm 0,22$ a	1,28 ns
CG07	$5,05 \times 10^4$ ( $2,83 \times 10^4 - 8,56 \times 10^4$ )	-1,39	$1,35 \pm 0,21$ a	3,96 ns

Tabela 6: Testes CL50 ( $p<0,05$ ) e parâmetros de regressão a (y- interseção) e b (inclinação) (estimado pelo método Probit) para os dois isolados testados contra insetos adultos de *Callosobruchus maculatus*.  $\chi^2$  indica os ajustes de dados para o modelo Probit. Valores de b seguida indicam a diferença estatística (ANOVA  $F_{8,} = 0,0658$ ,  $p<0,001$  e teste Student-Newman-Keuls  $p<0.05$ ).

*M. anisopliae* apresentou manejo, cultivo, germinação e produção de esporos melhores que *B. bassiana* conferindo vantagens a *M. anisopliae* para produção em larga escala. Em contra partida, *B. bassiana* é letal em uma concentração de esporos maior que *M. anisopliae*, porém seu tempo de germinação é maior e a produção de esporos é bem menor levando duas vezes mais tempo para se obter a mesma quantidade de proteínas a partir de *M. anisopliae*.

##### 4.2.1 Quantidade de proteínas obtidas, ensaios enzimáticos e análise de massa molecular por eletroforese

Como descrito anteriormente, *B. bassiana* foi cultivado em um meio rico em nutrientes (TM). Em seguida os micélios produzidos foram lavados com água destilada e transferidos para o meio mínimo indutivo contendo 0,5% de exoesqueleto de *C. maculatus* (MMC) e um não indutivo contendo apenas meio mínimo (MM). Depois de 3 dias, o sobrenadante recolhido e filtrado foi submetido a uma quantificação de proteínas utilizando o método de Bradford (1976) onde  $164 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de proteínas foi obtido para o MMC e 33

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

$\mu\text{g.mL}^{-1}$  para MM, indicando um aumento na produção de proteínas de *B. bassiana* na presença de cutículas de *C. maculatus*. Um ponto a ser observado novamente, é a superestimação dos valores obtidos na quantificação de proteínas por esse método que, como no caso de *M. anisopliae*, pode ter sido alterado devido a uma reação entre sulfato de amônio presente no meio e ao método bradford, aumentando a absorbância. Nos experimentos seguintes isso se mostrou novamente verdadeiro, tornando necessária uma maior produção de amostras para os próximos experimentos.

Em seguida, foram executado ensaios em busca de enzimas hidrolíticas, como  $\alpha$ -amilases, quitinases e proteases. Na Figura 18 podemos observar os resultados obtidos. *B. bassiana* apresentou grande atividade quitinolítica ( $3,99 \text{ Unidades}.\mu\text{g}^{-1}$ ) e proteolítica ( $18,7 \text{ Unidades}.\mu\text{g}^{-1}$ ) e nenhuma atividade  $\alpha$ -amilolítica ( $< 0,1 \text{ Unidades}.\mu\text{g}^{-1}$ ). Esses resultados se assemelham aos de *M. anisopliae* nas mesmas condições. Em adição, esses resultados podem ser comparados aos estudos conduzidos por Bidochka e Khachatourians (1994) onde *B. bassiana* foi cultivado em meio contendo carapaças de *Melanoplus sanguinipes* apresentando atividades quitinolíticas e proteolíticas tão altas quanto as apresentadas aqui contra *C. maculatus*.

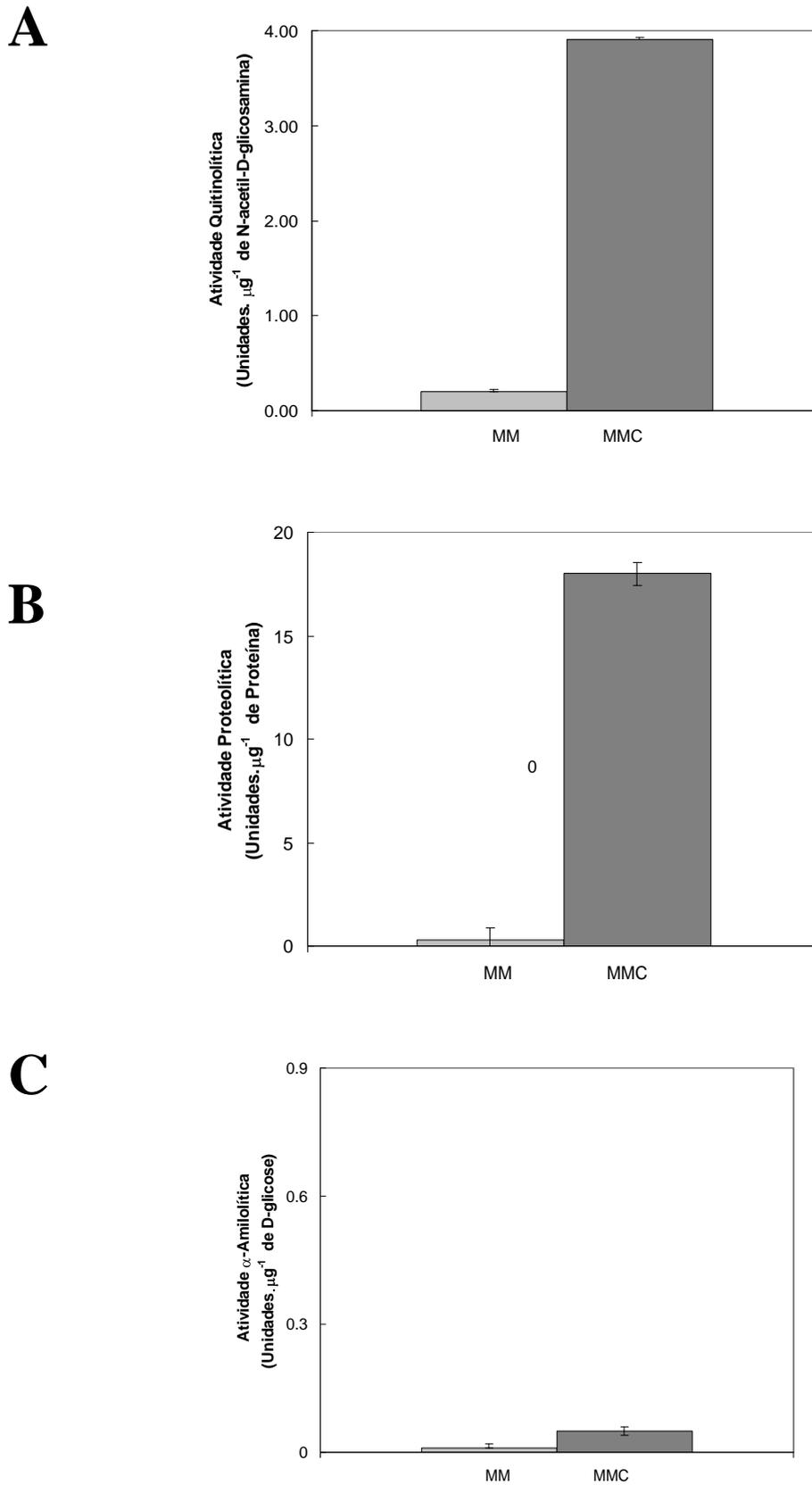


Figura 18: Ensaio enzimáticos com secretoma de *B. bassiana*. Atividades A- quitinolítica, B- proteolítica e C-  $\alpha$ -amilolítica da secreção de *B. bassiana* em meio indutivo (MMC) e não indutivo (MM).

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

No intuito de analisar o padrão protéico, 100 µg de cada amostra foram preparadas precipitando com TCA/acetona para a aplicação em SDS-PAGE a 12,5%. O gel resultante pode ser observado na Figura 19.

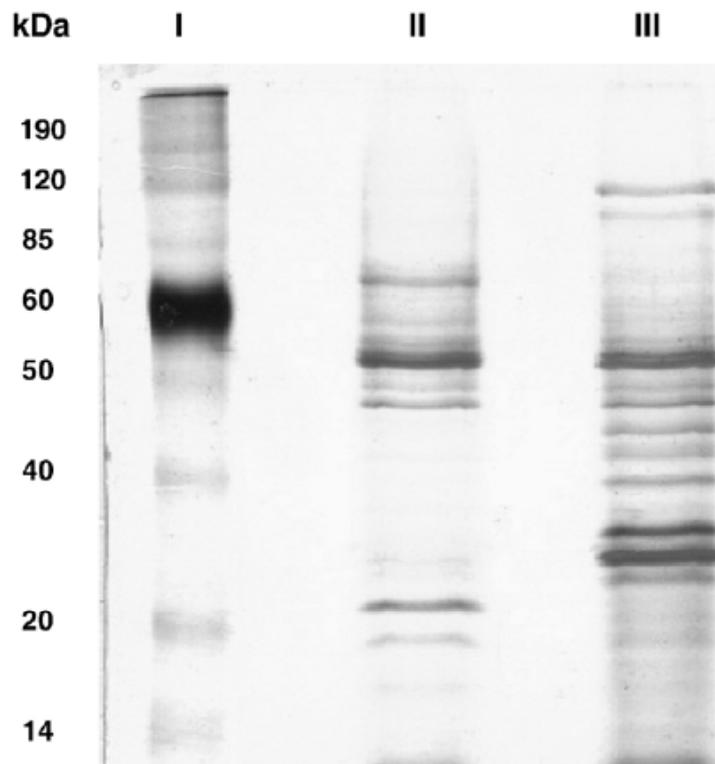


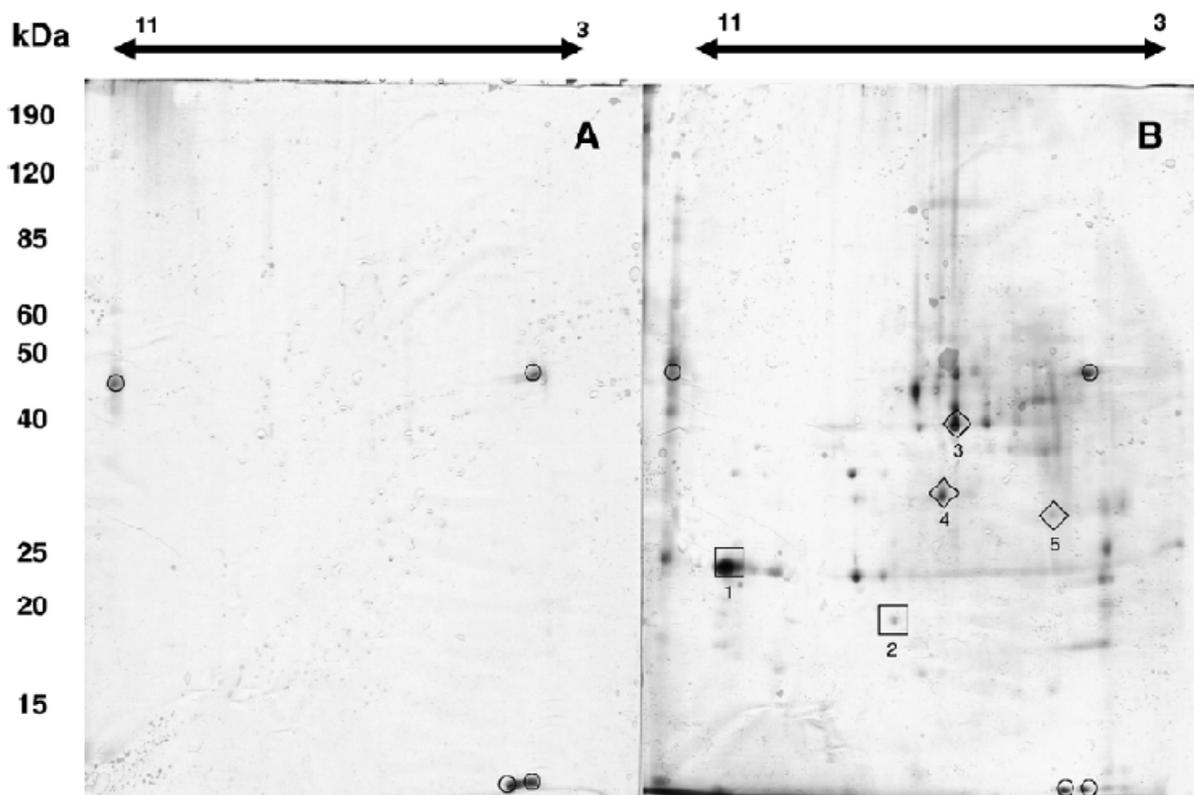
Figura 19: SDS-PAGE a 12,5%, das proteínas secretadas por *B. bassiana*. I - Marcador de massa molecular, II- Proteínas encontradas no meio não indutivo (MM), III- proteínas encontradas no meio indutivo contendo 0,5% exoesqueleto de *C. maculatus* (MMC).

Uma grande quantidade de proteínas pode ser identificada em MMC (Figura 19, coluna III) com bandas cujas massas correspondem a 28 kDa, 33 kDa, 55 kDa e 120 kDa mostrando maior destaque. Por outro lado, MM demonstrou baixa variedade de expressão apresentando bandas com massas aproximadas de proteínas de 22 kDa e 55 kDa (Figura 19 coluna II). Fazendo uma comparação com *M. anisopliae*, ambos apresentaram padrões de expressão distintos, indicando que ambos possuem mecanismos diferenciados para degradação de exoesqueletos de *C. maculatus*. *M. anisopliae* produziu um padrão protéico

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

que apresenou massas moleculares aproximadamente 27 kDa, 30 kDa, 37 kDa, 45 kDa, 50 kDa e 70 kDa.

Para uma melhor compreensão do secretoma de *B. bassiana* produzido na presença e ausência de exoesqueleto de *C. maculatus*, géis bidimensionais utilizando *strips* de 13cm e placas de 18x24x0,15cm foram feitos utilizando os métodos descritos anteriormente. É possível a visualização dos géis resultantes demonstrando as diferenças (marcadas com quadrados) e semelhanças (marcados com círculos) entre MM e MMC.



**Figura 20:** Amostras de *B. bassiana* analisadas por géis bidimensionais (18x24x0,15cm). MM (A) e MMC (B). *Spots* marcados em círculos identificam similaridades entre os géis A e B. posições 1 e 2 (marcado com quadrados), 3, 4 e 5 (marcados com losangos) são possíveis 26 kDa e 21 kDa endoproteases, 45 kDa e 33 kDa quitinases e 28 kDa chitosanase-like protein respectivamente.

Uma grande diferença de expressão protéica pode ser observada entre MM e MMC (Figura 20). Quatro *spots* podem ser observados em MM (Figura 20A) enquanto que 13 *spots* significantes podem ser identificacados em MMC (Figura 20B). Todos *spots* de MM podem ser localizados nas mesmas posições em MMC com massas moleculares de 10 kDa e 48 kDa

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

(Figura 20 circulados) sugerindo que essas proteínas são expressadas constitutivamente. Todos os outros *spots* observados em MMC são em decorrência da indução a exoesqueleto de *C. maculatus* onde os *spots* mais expressivos estão presentes nas posições 27 kDa e entre 40 kDa e 50 kDa (Figura 20B em losangos e quadrados).

Comparando com as proteínas secretadas por *M. anisopliae* (Figura 14), *B. bassiana*, CG05 expressa uma variedade maior de proteínas tanto em termos de massa molecular como em ponto isoelétrico. Este pode ser um dos pontos importantes que determinam a maior virulência por esse isolado nos ensaios de patogenicidade. Um fator que pode contribuir para esse ponto seria a produção de metabolitos secundários por *B. bassiana* como a beuverecina, um hexadepsipeptídeo cíclico que compromete o sistema imunológico de uma variedade de artrópodes como *Artemia salina* (CALO *et al.*, 2003). Em adição, alguns isolados podem produzir melanina, uma fator tóxico, para alguns microorganismos, causando alta mortalidade em lepidópteros como *Galleria mellonella* (FUGUET *et al.*, 2004). Estes dois compostos possuem massa molecular muito baixa e possivelmente foram removidos das amostras no processo de diálise.

Além disso, vários autores descreveram em seus estudos algumas quitinases. Havukkala *et al.*, (1993) cultivaram *B. bassiana* em quitina coloidal purificando, em seguida, quitinases de 45 kDa e 110 kDa. Ainda, uma quitinase de 33 kDa e ponto isoelétrico 5,4 foi clonado por Fang *et al.*, (2005). Fuguet *et al.*, (2004) purificaram uma quitosanase termolabil (Bclp) com massa molecular de 28 kDa e pI 4,0 tendo atividade citotóxica contra *G. mellonella*. Essa enzima causou grandes modificações celulares na hipoderme, traquéia e células sanguíneas das larvas demonstrando sua importância na patogenicidade. Seguindo esses dados, marcamos com losangos as posições relativas dessas enzimas no gel (Figura 20) com os números 3, 4 e 5 uma vez que o isolado apresentou atividade quitinolítica (Figura 18A). Proteases também foram purificadas ou clonadas de *B. bassiana*. Uma delas,

#### 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

encontradas por Joshi *et al.*, (1995a), possui massa molecular de 26 kDa e ponto isoelétrico predito entre 9 e 10. Adicionalmente, uma variante dessa enzima foi encontrada por Urtz e Rice (2000), possuindo um ponto isoelétrico mais baixo (7,5) e com 21 kDa. *Spots* com massas e pI semelhantes puderam ser observados no gel (Figura 20B) sendo marcadas com quadrados nas posições 1 e 2 respectivamente tendo em vista a atividade proteolítica detectada nos ensaios enzimáticos (Figura 18B). Mas muito mais *spots* podem ser visualizados no gel; pode-se supor que parte deles correspondem a proteínas estruturais presentes na cutícula de *C. maculatus* ou, ainda, outras proteínas de importância na degradação de compostos assim como as encontradas em *M. anisopliae*.

## **5. CONCLUSÃO**

---

### 5. CONCLUSÃO

Este trabalho trouxe novas informações a respeito do uso de fungos entomopatogênicos no controle biológico de insetos. Primeiramente em relação a informação sobre cultivo e manejo. *M. anisopliae* demonstrou uma facilidade de cultivo muito maior que *B. bassiana*. A maior produção de esporos seria uma escolha mais sensata em relação ao uso em larga escala. Já *B. bassiana* demonstrou ser mais letal que *M. anisopliae*, porém é mais trabalhoso de se cultivar. Posteriormente, ambos demonstraram possuir um arsenal de enzimas hidrolíticas das quais se utilizam delas para infectar o hospedeiro. Com estas enzimas, foi possível propor mapas metabólicos tanto para a degradação da carapaça do inseto quanto para a transformação da amônia em nitrato, aumentando o conhecimento acerca dos mecanismos de interação entre o fungo e seu hospedeiro bem como para algumas questões da própria fisiologia do fungo. Ainda em relação às enzimas, estas são passíveis de manipulação genética, e podem se tornar ferramentas na produção de novos compostos ativos contra *C. maculatus*, bem como a transformação genética de plantas resistentes ao mesmo.

## **6. PERSPECTIVAS**

---

### 6. PERSPECTIVAS

Como poderíamos usar *M. anisopliae* e *B. bassiana* no controle de *C. maculatus* de maneira eficiente e segura utilizando nossos dados? O bruquídeo em questão possui um ciclo de vida endofítico, no qual o indivíduo se aloja e se alimenta no interior das sementes. Quando adultos, eles apenas se reproduzem e utilizam toda a reserva energética adquirida na fase anterior. Sabendo que as enzimas hidrolíticas, como as quitinases, quitosanases e proteases, podem degradar a carapaça desses insetos, poderíamos criar sementes de feijão de corda geneticamente modificadas contendo um coquetel de enzimas/inibidores para quando as larvas de *C. maculatus* fossem se alimentar, compromete-se o sistema digestório destes e conseqüentemente criando adultos menos capazes de se reproduzir e repetir o ciclo. Tendo em vista as enzimas encontradas, podemos criar então uma nova experiência para comprovar sua eficácia antes de modificar a planta. Sugerimos a expressão heteróloga em levedura de uma quitinase, uma subtilisina (*spot 5* Figura 15), a amidohidrolase (*spot 11* Figura 15) e a metionina gamma liase (*spot 2* Figura 15). Se a via de metabolização for comprovada, a amidohidrolase e a metionina gama liase aumentariam a concentração de amônia no sistema digestório da larva, utilizando proteínas degradadas pela protease. A quitinase atacaria a membrana peritrófica da larva, diminuindo a absorção de nutrientes. Pode-se avaliar inibidores de amônia monooxigenase que, no interior da larva, interromperia a metabolização da amônia levando a níveis tóxicos. Para avaliar essas possibilidades, sementes artificiais como as descritas por Tarver *et al.*, (2007) poderiam ser criadas manipulando-se as concentrações de enzimas/inibidores. Finalmente, a eficácia do tratamento poderia ser analisado por microscopia de varredura procurando por alterações estruturais nas larvas de *C. maculatus*, assim como as encontradas por Fuguet *et al.*, (2004) ao analisar as larvas de *G. mellonella*.

## 6. PERSPECTIVAS

---

Através de promotores específicos de semente, esses genes poderão ser inseridos e super expressos e, ao final, as sementes modificadas obtidas serão resistentes aos bruquídeos e inócuas aos seres humanos, uma vez que as sementes são cozidas ou preparadas de alguma forma antes do consumo.

Outro aspecto importante seria a respeito da grande diversidade de hospedeiros de *M. anisopliae*. Este fungo possui uma alta taxa de mutação quando exposto a luz UV. Poderíamos criar uma teoria evolutiva a cerca desse fato onde a mutação é necessária para sobrevivência deste fungo. Experimentos poderiam ser conduzidos onde esporos de *M. anisopliae* submetidos e não submetidos a luz UV seriam germinados e posteriormente testados contra outros hospedeiros. Aqueles isolados que tiveram virulência poderiam ser estudados a fim de suportar essa teoria, analisando mutações no DNA e no padrão de expressão protéica.

## **7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA**

---

### 7. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abadjieva, A.; Hilven, P.; Pauwels, K. e Crabeel, M. The yeast ARG7 gene product is autoproteolyzed to two subunit peptides, yielding active ornithine acetyltransferase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, pp. 11361-11367, 2000.
- Aebersold, R. H.; Leavitt, J.; Saavedra, R. A.; Hood, L. E. e Kent, S. B. Internal amino acid sequence analysis of proteins separated by one or two-dimensional gel electrophoresis after in situ protease digestion on nitrocellulose. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, pp. 6970–6974, 1987.
- Aghajari, N.; Feller, G.; Gerday, C. e Haser, R. Crystal structures of the psychrophilic  $\alpha$ -amylase from *Alteromonas haloplanctis* in its native form and complexed with an inhibitor. **Protein Science**, v. 7, p. 564, 1998.
- Al-Aidroos, K. Demonstration of a parasexual cycle in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Canadian Journal of Genetic Cytology**, v. 22, pp. 309- 314, 1980.
- Alexandre, T. M.; Alves, L. F.; Neves, P. M. e Alves, S. B. Effect of temperature and poultry litter in *Beauveria bassiana* (bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch) virulence against the lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: *Tenebrionidae*). **Neotropical Entomology**, v. 35, pp. 75-82, 2006.
- Almeida, M. S.; Cabral, K. M. S.; Kurtenbach, E.; Almeida, F. C. L. e Valente, A. P. Solution structure of *Pisum sativum* defensin 1 by high resolution NMR: Plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. **Jornal of Molecular Biology**, v. 315, pp. 749-757, 2002.
- Andersen, J. S. e Mann, M. Functional genomics by mass spectrometry. **FEBS Letters**, v. 480, pp. 25-31, 2000.
- Anderson, L. e Seilhamer, J. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. **Eletrophoresis**, v. 18, pp. 533–537, 1997.
- Archer, D. B. e Wood, D. A. Fungal exoenzymes. **The Growing Fungus**, v. 7, pp. 138-162, 1995.
- Arenkov, P.; Kukhtin, A.; Gemmell, A.; Voloshchuk, S.; Chupeeva, V. e Mirzabekov, A. Protein microchips: use for immunoassay and enzymatic reactions. **Analytical Biochemistry**, v. 278, pp. 123–131, 2000.
- Aronson, J. M.; Cooper, B. A. e Fuller, M. J. Glucans of oomycetes cell walls. **Science**, v. 155, pp. 332–335, 1967.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- Bagagli, E.; Valadares, M. C. C. e Azevedo, J. L. Parameiosis in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Mestch.) Sorokin. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, pp. 261-271, 1991.
- Barrett, A. J. Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Enzyme Nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 4: corrections and additions. **FEBS Journal**, v. 250, pp. 1-6, 1997.
- Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. e Stryer, L. Bioquímica. **Editora Guanabara Koogan S.A.**, Rio de Janeiro, 2002.
- Bernfeld, P. Amylases alpha and beta. **Methods in Enzymology**, v. 1, pp. 149-150, 1955.
- Bidochka, M. J. e Khachatourians, G. G. Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 63, pp. 7-13, 1994.
- Bishop, J. G.; Dean, A. M. e Mitchell-Olds, T. Rapid evolution in plant chitinases: molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, pp. 5322-5327, 2000.
- Blackstock, W. P. e Weir, M. P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. **Trends in Biotechnology**, v. 17, pp. 121-127, 1999.
- Bolar, J. P.; Norelli, J. L.; Harman, G. E.; Brown, S. K. e Aldwinckle, H. S. Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. **Trangenic Research**, v. 10, pp. 533-543, 2001.
- Bortone, K.; Monzingo, A. F.; Ernst, S. e Robertus, J. D. The structure of an allosamidin complex with the *Coccidioides immitis* chitinase defines a role for a second acid residue in substrate-assisted mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 320, pp. 293-302, 2002.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, pp. 248-254, 1976.
- Broder, S. e Venter, J. C. Sequencing the entire genomes of free-living organisms: the foundation of pharmacology in the new millennium. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 40, pp. 97-132, 2000.
- Bruix, M.; Jimenez, M. A.; Santoro, J.; Gonzdlez, C.; Colilla, F. J.; Mendez, E. e Ricot, M. Solution Structure of yl-H and yl-P Thionins from Barley and Wheat Endosperm Determined by H-NMR: A Structural Motif Common to Toxic Arthropod Proteins. **Biochemistry**, v. 32, pp. 715-724, 1993.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- Bugs, M. R.; Forato, L. A.; Bortoleto-Bugs, R. K.; Fischer, H.; Mascarenhas, Y. P.; Ward, R. J. e Colnago, L. A. Spectroscopic characterization and structural modeling of prolamin from maize and pearl millet. **European Biophysics Journal**, v. 33, pp. 335-343, 2004.
- Calo, L.; Fornelli, F.; Nenna, S.; Tursi, A.; Caiaffa, M. F. e Macchia, L. Beauvericin cytotoxicity to the invertebrate cell line SF-9. **Journal of Applied Genetics**, v. 44, pp. 515-520, 2003.
- Cannon, R. D.; Niimi, K.; Jenkinson, H. F. e Shepherd, M. G. Molecular cloning and expression of the *Candida albicans* beta-N-acetylglucosaminidase (HEX1) gene. **Journal of Bacteriology**, v. 176, pp. 2640–2647, 1994.
- Carberry, S.; Neville, C. M.; Kavanagh, K. A. e Doyle, S. Analysis of major intracellular proteins of *Aspergillus fumigatus* by MALDI mass spectrometry: Identification and characterisation of an elongation factor 1B protein with glutathione transferase activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 341, pp. 1096-1104, 2006.
- Carrizo, M. E. e Curtino, J. A. Identification of two uridine binding domain peptides of the UDP-glucose-binding site of rabbit muscle glycogenin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 253, pp. 786-789, 1998.
- Carvalho, R. P. L. e Rossetto, J. C. Biologia de *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann) (Coleoptera, Bruchidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 13, pp. 105-117, 1968.
- Cornet, B.; Bonmatin, J.-M.; Hetru, C.; Hoffmann, J. A.; Ptak, M. e Vovelle, F. Refined three-dimensional solution structure of insect defensin A. **Structure**, v. 3, pp. 435-448, 1995.
- Cronin, V. B.; Maras, B.; Barra, D. e Doonan, S. The amino acid sequence of the aspartate aminotransferase from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **The Biochemical journal**, v. 277, pp. 335-340, 1991.
- Cutfield, S. M.; Davies, G. J.; Murshudov, G.; Anderson, B. F.; Moody, P. C. E.; Sullivan, P. A. e Cutfield, J. F. The structure of the exo- $\beta$ -(1,3)-glucanase from *Candida albicans* in native and bound forms: relationship between a pocket and groove in family 5 glycosyl hydrolases. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, pp. 771-783, 1999.
- Dempsey, D. A.; Silva, H. e Klessig, D. F. Engineering disease and pest resistance in plants. **Trends in Microbiology**, v. 6, pp. 54-61, 1998.
- Dendy, J. e Credland, P. F. Development, fecundity and egg dispersion of *Zabrotes subfasciatus*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 59, pp. 9-17, 1991.
- Dorit, R. L.; Jr, W. F. W. e Barnes, R. D. Culture and use of entomogenous fungi for the control of insect pests. Em: Publishing, S. C. (Ed.) Zoology. 1991.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- Dresner, E. Culture and use of entomogenous fungi for the control of insect pests. **Contributions from Boyce Thompson Institute**, v. 15, pp. 319-335, 1949.
- Duo-Chuan, L. Review of fungal chitinases. **Mycopathologia**, v. 161, pp. 345–360, 2006.
- Duthie, E. S.; Lorenz, L. Protease inhibitors. 1. Assay and nature of serum antiprotease. **The Biochemical Journal**, v. 44, pp. 173-178, 1949.
- Edman, P. A method for the determination of the amino acid sequence of peptides. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 22, pp. 475–483, 1949.
- Fang, W.; Leng, B.; Xiao, Y.; Jin, K.; Ma, J.; Fan, Y.; Feng, J.; Yang, X.; Zhang, Y. e Pei, Y. Cloning of *Beauveria bassiana* Chitinase Gene *Bbchit1* and Its Application To Improve Fungal Strain Virulence. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, pp. 363-370, 2005.
- Filho, S. P. C. e Signini, R. Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, pp. 169-173, 2001.
- Forato, L. A.; Doriguetto, A. C.; Fischer, H.; Mascarenhas, Y. P.; Craievich, A. F. e Colnago, L. A. Conformation of the Z19 prolamin by FTIR, NMR, and SAXS. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, pp. 2382-2385, 2004a.
- Forato, L. A.; Yushmanov, V. E. e Colnago, L. A. Interaction of two prolamins with 1-13C oleic acid by 13C NMR. **Biochemistry**, v. 43, pp. 121-126, 2004b.
- Franco, O. L.; Murad, A. M.; Leite, J. R.; Mendes, P. A. M.; Prates, M. V. e Jr, C. B. Identification of a cowpea  $\alpha$ -thionin with bactericidal activity. **FEBS Journal**, v. 273, pp. 3489-3497, 2006.
- Franco, O. L.; Rigden, D. J.; Melo, F. R. e Grossi-de-Sá, M. F. Plant  $\alpha$ -amylase inhibitors and their interaction with insect  $\alpha$ -amylases. Structure, function and potential for crop protection. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, pp. 397-413, 2002.
- Fuguet, R.; Théraud, M. e Vey, A. Production in vitro of toxic macromolecules by strains of *Beauveria bassiana*, and purification of a chitosanase-like protein secreted by a melanizing isolate. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 138, pp. 149-161, 2004.
- Fujinaga, M.; Cherniaia, M. M.; Tarasova, N. I.; Mosimann, S. C. e James, M. N. G. Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. **Protein Science**, v. 4, pp. 960-972, 1995.
- Fujinaga, M.; Cherney, M. M.; Oyama, H.; Oda, K. e James, M. N. The molecular structure and catalytic mechanism of a novel carboxyl peptidase from *Scytalidium lignicolum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, pp. 3364-3369, 2004.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- Fung, K. L.; Zhao, K. J.; He, Z. M. e Chye, M. L. Tobacco-expressed *Brassica juncea* chitinase BjCHI1 shows antifungal activity in vitro. **Plant Molecular Biology**, v. 50, pp. 283-294, 2002.
- Fuxa, J. R. e Tanada, Y. Epidemiological concepts applied to insect pathology. Em: Epizootiology of insect diseases. **John Wilwy & Sons**, New York, pp. 3-22, 1987.
- Gatehouse, A. M. R.; Boulder, D. e Hilder, V. A. Potential of plant-derived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance. Em: Biotechnology in Agriculture, Plant Genetic Manipulation for Crop Protection. **CAB International**, vol. 7, pp. 155-181, 1992.
- Gil-ad, N.; Bar-Nun, N. e Mayer, A. The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzyme activities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 199, pp. 109–113, 2001.
- Ginalski, K.; Elofsson, A.; Fischer, D. e Rychlewski, L. 3D-Jury: a simple approach to improve protein structure predictions. **Bioinformatics**, v. 19, pp. 105-1018, 2003.
- Goettel, M. S.; St-Leger, R. J.; Rizzo, N. W.; Staples, R. C. e Roberts, D. W. Ultrastructural localization of a cuticle-degrading protease produced by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* during penetration of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Microbiology**, v. 135, pp. 2233-2239, 1989.
- Grinyer, J.; Hunt, S.; McKay, M.; Herbert, B. R. e Nevalainen, H. Proteomic response of the biological control fungus *Trichoderma atroviride* to growth on the cell walls of *Rhizoctonia solani*. **Current Genetics**, v. 47, pp. 381-388, 2005.
- Grinyer, J.; McKay, M.; Nevalainen, H. e Herbert, B. R. Fungal proteomics: initial mapping of biological control strain *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**, v. 45, pp. 163-169, 2004.
- Guex, N. e Peitsch, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, pp. 2714-2723, 1997.
- Hamel, F.; Boivin, R.; Tremblay, C. e Bellemare, G. Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. **Journal of Molecular Evolution**, v. 44, pp. 614-624, 1997.
- Harman, G. E.; Hayes, C. K.; Lorito, M.; Broadway, R. M.; Di Pietro, A.; Peterbauer, C. e Tronsmo, A. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: purification of chitobiosidase and endochitinase. **Phytopathology**, v. 83, pp. 313–318, 1993.
- Havukkala, I.; Mitamura, C.; Hara, S.; Hirayae, K.; Nishizawa, Y. e Hibi, T. Induction and purification of *Beauveria bassiana* chitinolytic enzymes **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 61, pp. 97-102, 1993.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- Henrissat, B. A. Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. **The Biochemical Journal**, v. 280, pp. 309–316, 1991.
- Henrissat, B. e Bairoch, A. New families in the classification of glycosylhydrolases based on amino acid sequence similarities. **The Biochemical Journal**, v. 293, pp. 781–788, 1993.
- Henzel, W. J.; Billeci, T. M.; Stults, J. T. e Wong, S. C. Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, pp. 5011–5015, 1993.
- Hess, D. C.; Lu, W.; Rabinowitz, J. D. e Botstein, D. Ammonium Toxicity and Potassium Limitation in Yeast. **PloS Biology**, v. 4, p. doi: 10.1371/journal.pbio.0040351, 2006.
- Iranzo, M.; Aguado, C.; Pallotti, C.; Canizares, J. T. e Mormeneo, S. The use of trypsin to solubilize wall proteins from *Candida albicans* led to the identification of chitinase 2 as an enzyme covalently linked to the yeast wall structure. **Research in Microbiology**, v. 153, pp. 227–232, 2002.
- James, M. N. G. Catalytic pathway of aspartic peptidases. **Elsevier**, Londres, 2004.
- Jaques, A. K.; Fukamizo, T.; Hall, D.; Barton, R. C.; Escott, G. M.; Parkinson, T.; Hitchcock, C. A. e Adams, D. J. Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. **Microbiology**, v. 149, pp. 2931–2939, 2003.
- Joshi, L.; Leger, R. J. S. e Bidochka, M. J. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, pp. 211–217, 1995a.
- Joshi, L.; St-Leger, R. J. e Bidochka, M. J. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, pp. 211–217, 1995b.
- Jung, G.; Ueno, H. e Hayashi, R. Proton-relay system of carboxypeptidase Y as a sole catalytic site: studies on mutagenic replacement of His 397. **Journal of Biochemistry (Tokyo)**, v. 124, pp. 446–450, 1998.
- Kang, S. C.; Park, S. e Lee, D. G. Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 73, pp. 276–281, 1999.
- Klose, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. **Humangenetik**, v. 26, pp. 231–243, 1975.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- Kneip, C.; Lockhart, P.; Vob, C. e Maier, U.-G. Nitrogen fixation in eukaryotes – New models for symbiosis. **BMC Evolutionary Biology**, v. 7, pp. 1-12, 2007.
- Kniemeyer, O.; Lessing, F.; Scheibner, O.; Hertweck, C. e Brakhage, A. A. Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the humanpathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Current Genetics**, v. 49, pp. 178-189, 2005.
- Kogan, M. J.; Dalcol, I.; Gorostiza, P.; Lopez-Iglesias, C.; Pons, M.; Sanz, F.; Ludevid, D. e Giralt, E. Self-assembly of the amphipathic helix (VHLPPP)<sub>8</sub>. A mechanism for zein protein body formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 312, pp. 907-913, 2001.
- Kolkman, A.; Daran-Lapujade, P.; Fullaondo, A.; Olsthoorn, M. M. A.; Pronk, J. T.; Slijper, M. e Heck, A. J. R. Proteome analysis of yeast response to various nutrient limitations. **Molecular Systems Biology**, v. doi:10.1038/msb4100069, 2006.
- Krassilstschik, I. M. La production industrielle des parasites vegetaux pour la destruction des insectes nuisibles. **Bull. Sci. Fr. Belg.**, v. 19, pp. 461-472, 1888.
- Krishna, R. G. e Wold, F. Post-translational modification of proteins. **Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology**, v. 67, pp. 265–298, 1993.
- Kuranda, M. J. e Robbins, P. W. Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, pp. 19758–19767, 1991.
- Kurusu, G.; Kinoshita, T.; Sugimoto, A.; Nagara, A.; Kai, Y.; Kasai, N. e Harada, S. Structure of the zinc endoprotease from *Streptomyces caespitosus*. **Journal of Biochemistry (Tokyo)**, v. 121, pp. 304-308, 1997.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, pp. 680-685, 1970.
- Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S. e Thornton, J. M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, pp. 283-291, 1993.
- Laskowski, R. A.; Rullmann, J. A.; MacArthur, M. W.; Kaptein, R. e Thornton, J. M. AQUA and PROCHECK-NMR: programs for checking the quality of protein structures solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 8, pp. 477-486, 1996.
- Lay, F. T.; Schirra, H. J.; Scanlon, M. J.; Anderson, M. A. e Craik, D. J. The three-dimensional solution structure of NaD1, a new floral defensin from *Nicotiana glauca* and its application to a homology model of the crop defense protein alfAFP. **Journal of Molecular Biology**, v. 325, pp. 175-188, 2003.
- Lesage, G. e Bussey, H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 70, pp. 317-343, 2006.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- Limon, M. C.; Lora, J. M.; Garcia, I.; De La Cruz, J.; Llobell, A.; Benitez, T. e Pintor-Toro, J. A. Primary structure and expression pattern of the 33-kDa chitinase gene from the mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum*. **Current Genetics**, v. 28, pp. 478–483, 1995.
- Limon, M. C.; Margolles-Clark, E.; Benitez, T. e Penttila, M. Addition of substrate-binding domains increases substrate-binding capacity and specific activity of a chitinase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 198, pp. 57-63, 2001.
- Liu, Y.-J.; Cheng, C.-S.; Lai, S.-M.; Hsu, M.-P.; Chen, C.-S. e Lyu, P.-C. Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**, v. 63, pp. 777-786, 2006.
- Lomako, J.; Lomako, W. M. e Whelan, W. J. Glycogenin: the primer for mammalian and yeast glycogen synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1673, pp. 45-55, 2004.
- Lord, J. C. From Metchnikoff to Monsanto and beyond: The path of microbial control. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 89, pp. 19-29, 2005.
- Luger, O. Fungi which kill insects. **University of Minnesota**, v. 4, pp. 26-41, 1888.
- Luna, E. A. Características citológicas e genéticas de linhagens selvagens, mutantes e diplóides de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) SOROKIN. Doutorado, **Genética, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Rio de Janeiro**, 1985.
- Luna, E. A. e Azevedo, J. L. Obtenção de possíveis diplóides entre linhagens de *Metarhizium anisopliae*. **Ciência e Cultura**, v. 37, pp. 721-731, 1985.
- Machius, M.; Vertesy, L.; Huber, R. e Wiegand, G. Carbohydrate and protein-based inhibitors of porcine pancreatic  $\alpha$ -amylase: structure analysis and comparison of their binding characteristics. **Journal of Molecular Biology**, v. 260, pp. 409–421, 1996.
- Marzluf, G. A. Regulation of nitrogen metabolism and gene expression in fungi. **Microbiological Reviews**, v. 45, pp. 437-461, 1981.
- Matarasso, N.; Schuster, S. e Avni, A. A novel plant cysteine protease has a dual function as a regulator of 1- aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression. **The Plant Cell**, v. 17, pp. 1205–1216, 2005.
- Matsushima, N.; Danno, G.; Takezawa, H. e Izumi, Y. Three-dimensional structure of maize alpha-zein proteins studied by small-angle X-ray scattering. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1339, pp. 14-22, 1997.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- Mauch, F. e Staehelin, L. A. Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and [beta]-1,3-glucanase in bean leaves. **Plant Cell**, v. 1, pp. 447-457, 1989.
- Mbithi-mwikya, S.; Camp, J. V.; Mamiro, P. R.; Ooghe, W.; Kolsteren, P. e Huyghebaert, A. Evaluation of the nutritional characteristics of a finger millet based complementary food. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 8, pp. 3030-3036, 2002.
- Melo, D. R.; Reis, R. C. e Bittencourt, V. R. In vitro patogenicity of the fungi *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, on the tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, pp. 157-162, 2006.
- Melo, F. R.; Rigden, D. J.; Franco, O. L.; Mello, L. V.; Ary, M. B.; Grossi-de-Sá, M. F. e Bloch-Jr, C. Inhibition of trypsin by cowpea thionin: characterization, molecular modeling and docking **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 48, pp. 311-319, 2002.
- Messias, C. L. e Azevedo, J. L. Parasexuality in the deuteromycete *Metarhizium anisopliae*. **Transactions of British Mycological Society**, v. 75, pp. 473-477, 1980.
- Messias, C. L. Parassexualidade em *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Doutorado, **Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo-USP, São Paulo**, 1979.
- Metchnikoff, E. A. Zur Lehre über Insektenkrankheiten. **Zool Anz**, v. 3, pp. 44-47, 1880.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, pp. 426-428, 1959.
- Miserez, A.; Li, Y.; Waite, J. H. e Zok, F. Jumbo squid beaks: Inspiration for design of robust organic composites. **Acta Biomaterialia**, v. 3, pp. 139-149, 2007.
- Mossessova, E. e Lima, C. D. Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. **Molecular Cell**, v. 5, pp. 865-876, 2000.
- Mu, J.; Cheng, C. e Roach, P. J. Initiation of glycogen synthesis in yeast. Requirement of multiple tyrosine residues for function of the selfglucosylating Glg proteins in vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, pp. 26554-26560, 1996.
- Murad, A. M.; Laumann, R. A.; Lima, T. d. A.; Sarmiento, R. B. C.; Noronha, E. F.; Rocha, T. L.; Valadares-Ingliš, M. C. e Franco, O. L. Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*)

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- exoskeleton. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 142, pp. 365-370, 2006.
- Murad, A. M.; Laumann, R. A.; Mehta, A.; Noronha, E. F. e Franco, O. L. Screening and secretomic analysis of entomopathogenic *Beauveria bassiana* isolates in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, pp. 333-338, 2007.
- Nahar, P.; Ghormade, V. e Deshpande, M. V. The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect pests. **Invertebrate Pathology**, v. 85, pp. 80-88, 2003.
- Neuhoff, V.; Arold, N.; Taube, D. e Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. **Electrophoresis**, v. 9, pp. 255-262, 1988.
- Noronha, E. F. e Ulhoa, C. Characterization of a 29- kDa  $\beta$ -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 183, pp. 119-123, 2000.
- O'Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 250, pp. 4007-4021, 1975.
- Ollis, D. L.; Cheah, E.; Cygler, M.; Dijkstra, B.; Frolow, F.; Franken, S. M.; Harel, M.; Remington, S. J.; Silman, I.; Schrag, J.; Sussman, J. L.; Verscheuren, K. H. G. e Goldman, A. The alpha/beta hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, pp. 197-211, 1992.
- Onofre, S. B.; Vargas, L. R. B.; Rossato, M.; Barros, N. M.; Boldo, J. T.; Nunes, A. R. F. e Azevedo, J. L. Controle biológico de pragas na agropecuária, por meio de fungos entomopatogênicos. Em: Serafini, L. A., Barros, N. M. and Azevedo, J. L. (Eds.), Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria. **EDUCS**, Caxias do Sul, pp. 295-317, 2002.
- Payan, F. e Qian, M. Crystal structure of the pig pancreatic  $\alpha$ -amylase complexed with malto-oligosaccharides. **Journal of Protein Chemistry**, v. 22, p. 275, 2003.
- Pekkarinen, A. I.; Kleemola, T.; Laitila, A.; Haikara, A. e Jones, B. L. *Fusarium* Species Synthesize Alkaline Proteinases in Infested Barley. **Journal of Cereal Science**, v. 37, pp. 349-356, 2003.
- Pelegri, P. B. e Franco, O. L. Plant  $\gamma$ -thionins: Novel insights on the mechanism of action of a multi-functional class of defense proteins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, pp. 2239-2253, 2005.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- Pelegriani, P. B.; Murad, A. M.; Grossi-de-Sá, M. F.; Mello, L. V.; Romeiro, L. A. S.; Noronha, E. F.; Caldas, R. A. e Franco, O. L. Structure and enzyme properties of *Zabrotes subfasciatus*  $\alpha$ -amylase. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 61, pp. 77-86, 2006.
- Pimentel, C.; Van-Der-Straeten, D.; Pires, E.; Faro, C. e Rodrigues-Pousada, C. Characterization and expression analysis of the aspartic protease gene family of *Cynara cardunculus* L. **FEBS Journal**, v. 274, pp. 2523–2539, 2007.
- Pirttila, A. M.; Laukkanen, H. e Hohtola, A. Chitinase production in pine callus (*Pinus sylvestris* L.): a defense reaction against endophytes? **Planta**, v. 214, pp. 848-852, 2002.
- Pitson, S. M.; Seviour, R. J. e McDougall, B. M. Noncellulolytic fungal  $\beta$ -glucanases: their physiology and regulation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, pp. 178–190, 1993.
- Polgar, L. Catalytic mechanisms of cysteine peptidases. Em: Barrett, A. J., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F. (Eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes. **Elsevier**, London, pp. 1072-1079, 2004a.
- Polgar, L. Catalytic mechanisms of serine and threonine peptidases. Em: Barrett, A. J., Rawlings, N. D. and Woessner, J. F. (Eds.), Handbook of Proteolytic Enzymes. **Elsevier**, London, pp. 1440-1448, 2004b.
- Qian, F.; Cui, F.; Ding, J.; Tang, C. e Yin, C. Chitosan graft copolymer nanoparticles for oral protein drug delivery: preparation and characterization. **Biomacromolecules**, v. 7, pp. 2722-2727, 2006.
- Rao, F. V.; Anderson, O. A.; Vora, K. A.; Demartino, J. A. e Van Aalten, D. M. Methylxanthine drugs are chitinase inhibitors: investigation of inhibition and binding model. **Chemistry & Biology**, v. 12, pp. 973–980, 2005.
- Rawlings, N. D.; Morton, F. R. e Barrett, A. J. MEROPS: the peptidase database. **Nucleic Acids Research**, v. 34, pp. D270-D272, 2006.
- Reis, M. C. d.; Fungaro, M. H. P.; Duarte, R. T. D.; Furlaneto, L. e Furlaneto, M. C. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, pp. 197-202, 2004.
- Reverter, D.; Wu, K.; Erdene, T. G.; Pan, Z. Q.; Wilkinson, K. D. e Lima, C. D. Structure of a complex between Nedd8 and the Ulp/Senp protease family member Den1. **Journal of Molecular Biology**, v. 345, pp. 141-151, 2005.
- Roby, D.; Broglie, K.; Cressman, R.; Biddle, P.; Chet, I. L. e Broglie, R. Activation of a bean chitinase promoter in transgenic tobacco plants by phytopathogenic fungi. **Plant Cell**, v. 2, pp. 999-1007, 1990.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- Ryan, C. A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, pp. 425-449, 1991.
- Sales, M. P.; Gerhardt, I. R.; Grossi-de-Sá, M. F. e Xavier-Filho, J. Do legumes storage proteins play a role in defending seeds against bruchids? **Plant Physiology**, v. 124, pp. 515-522, 2000.
- Sali, A. e Blundel, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Jornal of Molecular Biology**, v. 234, pp. 779-815, 1993.
- Schlagenhauf, E.; Etges, R. e Metcalf, P. The crystal structure of the Leishmania major surface proteinase leishmanolysin (gp63). **Structure**, v. 6, pp. 1035-1046, 1998.
- Schmidt, A.; Jelsch, C.; Østergaard, P.; Rypniewski, W. e Lamzin, V. S. Trypsin revisited. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, pp. 43357-43362, 2003.
- Scholte, E.-J.; Njiru, B. N.; Smallegange, R. C.; Takken, W. e Knols, B. G. J. Infection of malaria (*Anopheles gambiae* s.s.) and filariasis (*Culex quinquefasciatus*) vectors with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Malaria Journal**, v. 2, pp. 1-8, 2003.
- Schuler, H. T.; Poppy, M. G.; Kerry, B. R. e Denholm, M. L. Insect-resistant transgenic plants. **Tibtech**, v. 16, pp. 168-174, 1998.
- Screen, S. E.; Hu, G. e St-Leger, R. J. Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* over expressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acidum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 78, pp. 260-266, 2001.
- Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O. e Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, pp. 850-858, 1996.
- Shimizu, M. e Wariishi, H. Development of a sample preparation method for fungal proteomics. **FEMS Microbiology Letters**, v. 247, pp. 17-22, 2005.
- Shimizu, T.; Ihara, K.; Maesaki, R.; Amano, M.; Kaibuchi, K. e Hakoshima, T. Parallel coiled-coil association of the RhoA-binding domain in Rho-kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, pp. 46046-46051, 2003.
- Sicheri, F. e Yang, D. S. **Nature**, v. 375, pp. 427-431, 1995.
- Sippl, M. J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins**, v. 17, pp. 355-362, 1993.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- Song, X.; Wang, J.; Wu, F.; Li, X.; Teng, M. e Gong, W. cDNA cloning, functional expression and antifungal activities of a dimeric plant defensin SPE10 from *Pachyrrhizus erosus* seeds. **Plant Molecular Biology**, v. 57, pp. 13-20, 2005.
- Sorensen, T. K.; Dyera, P. S.; Fierroc, F.; Laubea, U. e Peberdy, J. F. Characterisation of the gptA gene, encoding UDP N-acetylglucosamine: dolichol phosphate N-acetylglucosaminylphosphoryl transferase, from the filamentous fungus, *Aspergillus niger*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1619, pp. 89-97, 2003.
- Southgate, B. J. Biology of the Bruchidae. **Review of Entomology**, v. 24, pp. 449-473, 1979.
- Sperandio, L. A. A. Alguns aspectos do comportamento de oviposição de *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera, Bruchidae) em condições de privação do hospedeiro. Mestrado, **Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto USP, São Paulo**, 2001.
- St-Leger, R. J.; Bidochka, M. J. e Roberts, D. W. Isoforms of the cuticle-degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 313, pp. 1-7, 1994.
- St-Leger, R. J.; Charnley, A. K. e Cooper, R. M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 253, pp. 221-232, 1987.
- St-Leger, R. J.; Charnley, A. K. e Cooper, R. M. Characterization of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 253, pp. 221-232, 1987.
- St-Leger, R. J.; Cooper, R. M. e Charnley, A. K. Cuticle degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. **Journal Of Genetic Microbiology**, v. 132, pp. 1509-1517, 1986.
- St-Leger, R. J.; Joshi, L. e Roberts, D. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, pp. 709-713, 1998.
- St-Leger, R. J.; Joshi, L.; Bidochka, M. J. e Roberts, D. W. Characterization and ultrastructural localization of *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride*, and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, pp. 907-912, 1996b.
- St-Leger, R. J.; Joshi, L.; Bidochka, M. J.; Rizzo, N. W. e Roberts, D. W. Biochemical characterization and ultrastructural localization of two extracellular trypsins produced by *Metarhizium anisopliae* in infected insect cuticles. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, pp. 1257-1264, 1996a.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- St-Leger, R. J.; Nelson, J. O. e Screen, S. E. The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* alters ambient pH, allowing extracellular protease production and activity. **Microbiology**, v. 145, pp. 2691-2699, 1999.
- Stone, B. e Clarke, A. Chemistry and biology of (1,3)  $\beta$ -Glucans. **La Trobe University Press**, Melbourne, 1992.
- Strobl, S.; Maskos, K.; Betz, M.; Wiegand, G.; Huber, R.; Gomis-Ruth, F. X. e Glosckshuber, R. Crystal structure of yellow meal worm  $\alpha$ -amylase at 1.64 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 278, pp. 617–628, 1998.
- Suarez, M. B.; Sanz, L.; Chamorro, M. I.; Rey, M.; González, F. J.; Llobell, A. e Monte, E. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*: identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. **Fungal Genetics and Biology**, v. 42, pp. 924–934, 2005.
- Taiz, L. e Zeiger, E. Fisiologia Vegetal. **Artmed Editora**, 2004.
- Takaya, N.; Yamazaki, D.; Horiuchi, H.; Ohta, A. e Takagi, M. Cloning and characterization of a chitinase-encoding gene (*chiA*) from *Aspergillus nidulans*, disruption of which decreases germination frequency and hyphal growth. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 62, pp. 60–65, 1998a.
- Takaya, N.; Yamazaki, D.; Horiuchi, H.; Ohta, A. e Takagi, M. Intracellular chitinase gene from *Rhizopus oligosporus*: molecular cloning and characterization. **Microbiology**, v. 144, pp. 2647–2654, 1998b.
- Tamai, M. A. Controle de *Tetranychus urticae* Koch com fungos entomopatogênicos. Doutorado, **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo**, 2002.
- Tarver, M. R.; Shade, R. E.; Shukle, R. H.; Moar, W. J.; Muir, W. M.; Murdock, L. M. e Pittendrigh, B. R. Pyramiding of insecticidal compounds for control of the cowpea bruchid (*Callosobruchus maculatus* F.). **Pest Management Science**, v. 63, pp. 440-446, 2007.
- Tatham, A. S.; Field, J. M.; Morris, V. J.; l'Anson, K. J.; Cardle, L.; Dufton, M. J. e Shewry, P. R. Solution conformational analysis of the alpha-zein proteins of maize. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, pp. 26253-26259, 1993.
- Thomas, C. e Sparks, A. Micro Probit 3.0. Probit Analysis for the IBM PC and Compatibles. v. 1, 2001.
- Tinline, R. D. e Noviello, C. Heterokaryosis in the entomogenous fungus *Metarhizium anisopliae*. **Mycologia**, v. 63, pp. 701-712, 1971.
- Ugalde, J. E.; Parodi, A. J. e Ugalde, R. A. De novo synthesis of bacterial glycogen: *Agrobacterium tumefaciens* glycogen synthase is involved in glucan initiation and elongation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, pp. 10659–10663, 2003.

## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

---

- Urtz, B. E. e Rice, W. C. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v. 104, pp. 180-186, 2000.
- Utida, S. Collective oviposition and larval aggregation in *Zabrotes subfasciatus* (Boh.) (Coleoptera, Bruchidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 2, pp. 315-322, 1967.
- Van Der Spoel, D.; Lindahl, E.; Hess, B.; Groenhof, G.; Mark, A. E. e Berendsen, H. J. GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, pp. 1701-1718, 2005.
- Veen, K. H. Recherches sur la maladie, due a *Metharhizium anisopliae* chez le criquet pèlerin. **Landbouwhogeschool Wageningen**, 1968.
- Vicentini, S.; Faria, M. e Oliveira, M. R. V. Screening of *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) isolates against nymphs of *Bemisia tabaci* (Genn.) biotype B (Hemiptera: Aleyrodidae) with description of a new bioassay. **Neotropical Entomology**, v. 30, pp. 97-103, 2001.
- Wilkins, M. R.; Sanchez, J. C.; Gooley, A. A.; Appel, R. D.; Humphery-Smith, I.; Hochstrasser, D. F. e Williams, K. L. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. **Biotechnology & Genetic Engineering Reviews**, v. 13, pp. 19-50, 1995.
- Yanai, K.; Takaya, N.; Kojima, N.; Horiuchi, H.; Ohta, A. e Takagi, M. Purification of two chitinases from *Rhizopus oligosporus* and isolation and sequencing of the encoding genes. **Journal of Bacteriology**, v. 174, pp. 7398-7406, 1992.
- Zheng, A. P.; Wang, J. C.; Lu, W. L.; Zhang, X.; Zhang, H.; Wang, X. Q. e Zhang, Q. Thymopentin-loaded pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral administration: preparation, characterization, and pharmacodynamics. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 6, pp. 2936-2944, 2006.
- Zhu, S.; Gao, B. e Tytgat, J. Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the Cs $\alpha\beta$  superfamily. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 13, pp. 1-9, 2005.

## **8. ARTIGOS**

---

## 8. ARTIGOS

### ***8.1 Screening and secretomic analysis of enthomopathogenic Beauveria bassiana isolates in response to cowpea weevil (Callosobruchus maculatus) exoskeleton***

Publicado no volume 142, páginas 365-370 de 2006 no periódico Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.

Autores: Murad, A. M.; Laumann, R. A.; Lima, T. d. A.; Sarmiento, R. B. C.; Noronha, E. F.; Rocha, T. L.; Valadares-Inglis, M. C. e Franco, O. L.

*8.2 Screening of entomopathogenic Metarhizium anisopliae isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (Callosobruchus maculatus) exoskeleton*

Publicado no volume 145, páginas 333-338 de 2007 no periódico Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology.

Autores: Murad, A. M.; Laumann, R. A.; Mehta, A.; Noronha, E. F. e Franco, O. L.

***8.3 Proteomic analysis of a *Metarhizium anisopliae* secretion in the presence of *Calosobruchus maculatus* exoskeleton***

Submetido ao periódico Proteomics

Autores: André Melro Murad<sup>1</sup> , Luciano Paulino Silva<sup>2</sup> , Carlos Bloch-Jr<sup>2</sup> , Eliane Ferreira Noronha<sup>1</sup>, Octávio Luiz Franco<sup>1\*</sup> .

*8.4 Novel insights on the mechanism of action of  $\alpha$ -amylase inhibitors from plant defensins family*

Submetido ao periódico Peptides: structure, function and bioinformatics.

Autores: Patrícia B. Pelegrini, Fung T. Lay, André M. Murad, Rosemary Renda, Marilyn A. Anderson, Octavio L. Franco.

*8.5 Structural and biochemical insights of a novel antimicrobial glycine rich peptide from guava (Psidium guajava) seeds: can storage molecules work effectively at plant defence system?*

Submetido ao periódico Proteins: structure, function and bioinformatics.

Autores: Patricia B. Pelegrini, Andre M. Murad, Luciana. P. Silva, Raquel C. P. dos Santos, Paula. D. Tagliari, Carlos. Bloch Jr., Eliane F. Noronha, Robert N. G. Miller e Octavio. L. Franco.

### *8.6 Structure and Enzyme Properties of Zabrotes subfasciatus $\alpha$ -Amylase*

Publicado no volume 61, páginas 77-86 em 2006 no periódico Archives of Insect Biochemistry and Physiology.

Autores: Pelegrini, P. B.; Murad, A. M.; Grossi-de-Sá, M. F.; Mello, L. V.; Romeiro, L. A. S.; Noronha, E. F.; Caldas, R. A. e Franco, O. L.

#### **Material e Métodos**

A seqüência contendo os 483 resíduos de ZSA foi obtido do NCBI (código AAF73435) sendo alinhada contra as estruturas protéicas armazenadas no protein data bank. Para este propósito, o Bioinfo Meta server (GINALSKI *et al.*, 2003) foi usado para encontrar um molde específico. Os melhores scores de FFAS (129) e ORFeus-2 (351) indicaram a estrutura de  $\alpha$ -amilase de *Tenebrio molitor* (TMA) (STROBL *et al.*, 1998) como a possuindo a melhor homologia estrutural. O modelo foi construindo usando o programa DeepView/Swiss PdbViewer, desenvolvido pelo Swiss Institute of Bioinformatics (GUEX e PEITSCH, 1997). A seqüência primaria de ZSA foi carregada ao programa, em seguida as coordenadas atômicas foram transferidas de TMA para ZSA. Uma minimização de energia foi feita usando Gromos96 como campo de força, e executando 80.000 passos de steepest descent e 44.000 passos de conjugate gradients. Foi necessário reconstruir as ligações peptídicas entre Asn358, Ile359, Cys360, Tyr228, e Phe229. Valores de plot de Ramachandran e RMSD foram considerados para validação do modelo.

#### **Caracterização teórica de ZSA**

O alinhamento contra outras  $\alpha$ -amilases indicou alta conservação dos resíduos envolvidos no processo catalítico e também em sítios adjacentes (PELEGRINI *et al.*, 2006) (Fig. 5). Este alinhamento mostrou a formação dos três domínios (A, B e C) em ZSA. Estes podem ser facilmente reconhecidos (PELEGRINI *et al.*, 2006) (Fig. 6) comparados a estrutura 3D de TMA (STROBL *et al.*, 1998). Domínio B é formado por folhas  $\beta$ , enquanto que a C é formada por um conjunto de folhas  $\beta$  e o domínio A é formado por um barril  $(\alpha/\beta)_8$ . Continuando, os resíduos envolvidos na catálise são conservados entre  $\alpha$ -amilases, sendo estes (Asp204, Glu240, e Asp305) encontrados nessas posições bem como os resíduos envolvidos na ancoragem do amido na enzima (His118, Ala206, Lys207, e His304) (PELEGRINI *et al.*, 2006) (Figs. 5 e 6). Analisando o plot de Ramachandran apenas 2,5% dos resíduos estão em regiões não permitidas. Análises posteriores por dinâmica pode sugerir mudanças conformacionais.

O modelo proposto mostrou similaridade estrutural com outras amilases já bem caracterizadas, como a de pâncreas de porco (PAYAN e QIAN, 2003) e de *Alteromonas haloplancti* (AGHAJARI *et al.*, 1998). Os domínios A, B e C podem ser encontrados bem como o sítio catalítico no fundo do barril  $(\alpha/\beta)_8$ , extremamente conservados em ambas enzimas (ZSA e TMA) bem como os resíduos envolvidos na orientação do substrato.

Comparando a seqüência e estrutura com as amilases descritas, podemos sugerir que elas possuem um mecanismo de catálise comum. Com base nisso propomos que os domínios A e B acomodam no mínimo 6 moléculas de açúcar ocorrendo a hidrólise entre a terceira e a quarta piranose (MACHIUS *et al.*, 1996; STROBL *et al.*, 1998; FRANCO *et al.*, 2002). Tendo em vista os três resíduos ácidos do sítio catalítico, ocorre um ataque nucleofílico, a partir de uma molécula de água,

## **8. ARTIGOS**

---

no C1, subsítio 3 da ligação ao açúcar moiety, linearizando a piranose, seguindo pela hidrólise da cadeia.

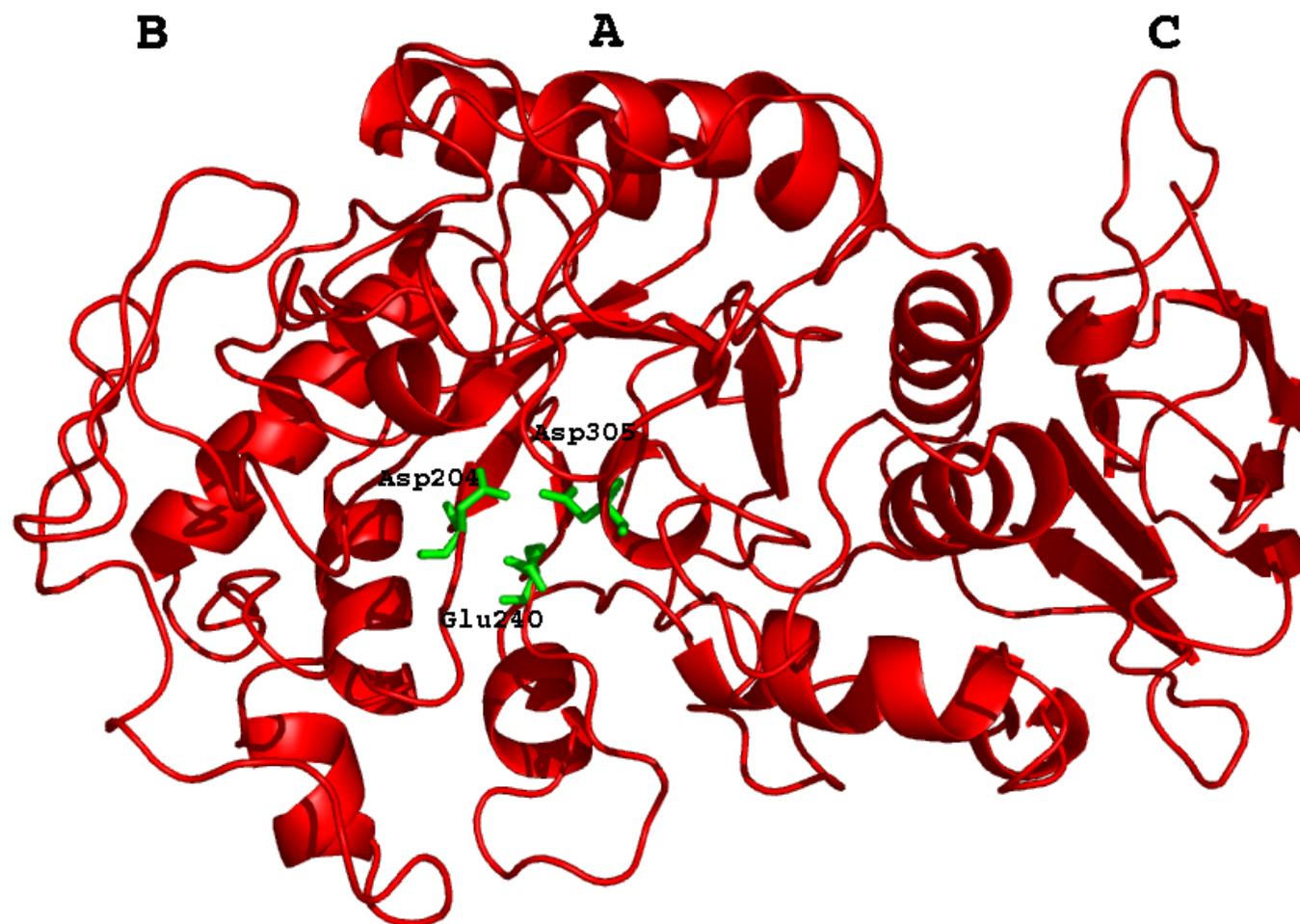


Figura 21: Estrutura tridimensional da  $\alpha$ -amilase de *Zabrotes subfaciatus*. A, B e C indicam os três motivos da enzima. Em hélices as  $\alpha$ -hélices e setas para as folhas  $\beta$ . Em verde os resíduos da tríade catalítica.

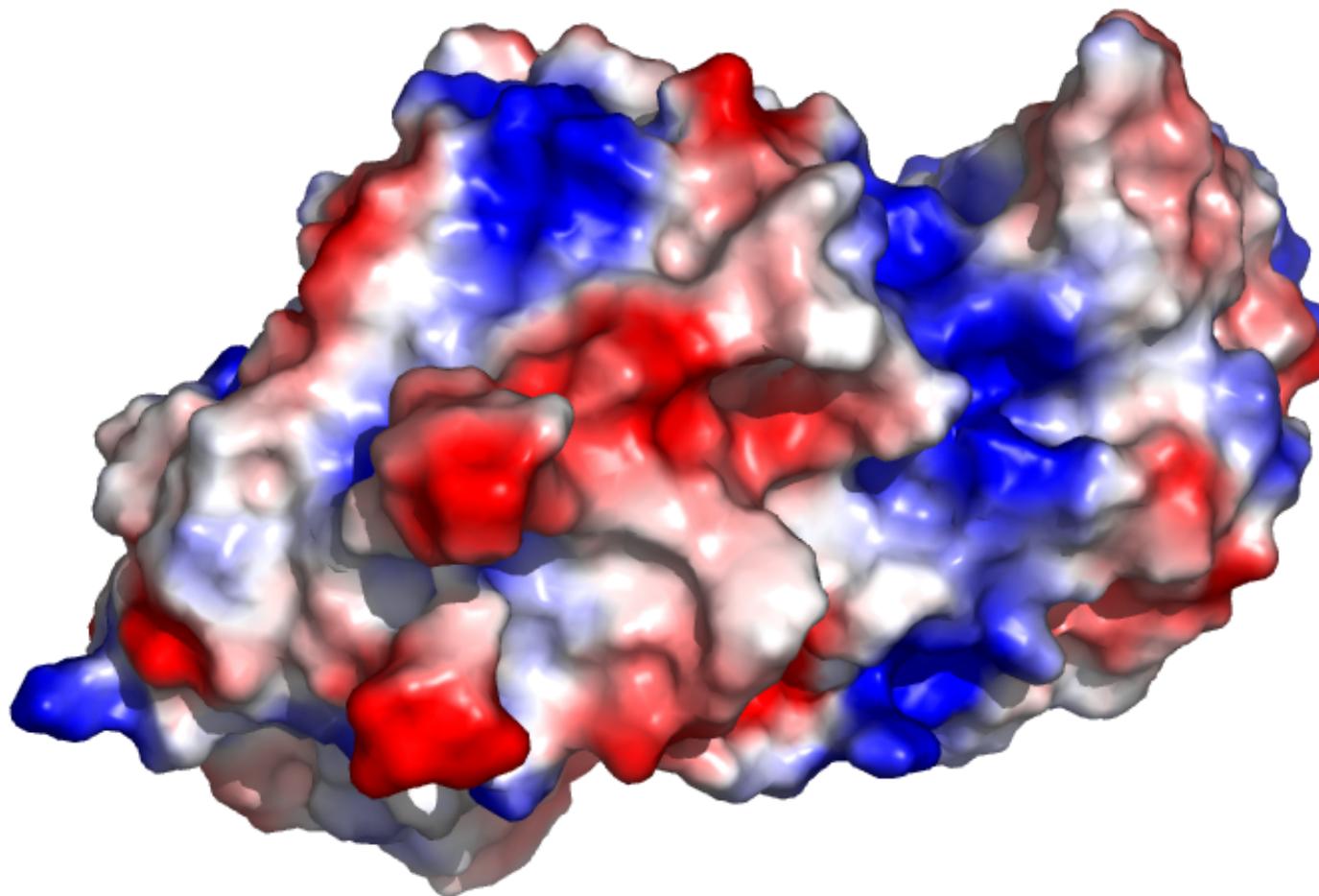


Figura 22: Superfície molecular da  $\alpha$ -amilase de *Z. subfaciatus*. em vermelho as cargas negativas, em azul as positivas e em branco as não carregadas.

### ***8.7 Cloning and Structural Analysis of an Indian Little Millet (*Panicum sumatrense*) Zein Like Storage Protein: Implications for Molecular Assembly***

Publicado no volume 71, páginas 1181-1191 de 2006 no periódico Biochemistry (Moscow).

Autores: Sivakumar, S.; Franco, O. L.; Thayumanavan, B.; Murad, A. M.; Manickam, A.; Mohan, M. e Mridula, M.

#### **Material e métodos**

Para modelagem molecular, a seqüência da zeína foi dividida em duas e foram comparadas ao banco de estruturas de proteínas utilizando o BioInfo Meta Server (GINALSKI *et al.*, 2003) buscando um melhor molde para análises por *threading*. Resultados do 3D PSSM indicaram uma proteína anticongelante (PDB code: 1WFB) (59.2%) (SICHERI e YANG, 1995) e uma Rho kinase (PDB code: 1UIX) (16.4%) (SHIMIZU *et al.*, 2003). Um alinhamento quimérico das duas seqüências com a seqüência da zeína foi feito sendo ajustado manualmente, em seguida Modeller v8 (SALI e BLUNDEL, 1993) foi usado para transferência das coordenadas atômicas. GROMOS96 foi usado para dinâmica molecular usando Gromacs (VAN DER SPOEL *et al.*, 2005). Após uma minimização de energia usando 2.000 passos de steepest descent, uma dinâmica molecular utilizando temperatura e pressão de acoplamento foi efetuada em 90.000 passos a 300°K. Para isso foi utilizado uma Sun Workstation bi processada. Deep View Swiss PDB Viewer 3.7 (GUEx e PEITSCH, 1997) foi usado para visualização e manipulação da molécula.

#### **Resultados**

Para prever a estrutura terciária da zeína, um modelo foi construído mostrando boa estabilidade quando submetido a dinâmica molecular. Análises da trajetória demonstraram que a proteína não quebrou ou modificou sua estrutura tridimensional pelas forças elétricas da caixa d'água. O modelo final mostra seis  $\alpha$ -hélices numa conformação anti paralela. (Fig. 4). A estrutura do modelo foi validada utilizando PROCHECK v3.5 (LASKOWSKI *et al.*, 1996) demonstrando que 98% dos resíduos do modelo ocupavam as regiões mais favoráveis do plot de Ramachandran. Previsões de estrutura anteriores sugeriam, como observado nesse trabalho, um repetido  $\alpha$ -helical haripin motif, conectado por loops e turns (FORATO *et al.*, 2004b). O modelo aqui apresentado (Fig. 4) também é representado por esses mesmos fatores que também foram encontrados por FTIR espectroscopia e fast N-H to N-D exchange medidas por NMR (FORATO *et al.*, 2004b). Por outro lado, nosso modelo difere da estrutura teórica proposta por Matsushima (MATSUSHIMA *et al.*, 1997) onde a zeína se arranjará em várias estruturas por loops e folhas beta e não por hélices antiparalelas como nosso modelo. Em adição, o modelo (Fig. 4) também difere da estrutura 3D de  $\alpha$ -zeína de milho, na qual mostrou uma  $\alpha$ -hélice dobrada em si mesma, parcialmente ou totalmente, formando um complexo hélico (TATHAM *et al.*, 1993) sugerindo que o C terminal estabilizaria o dobramento por pontes de hidrogênio intra moleculares. Por outro lado, nosso modelo acorda com outras estruturas propostas ao analisarmos as propriedades anfipáticas (MATSUSHIMA *et al.*, 1997; BUGS *et al.*, 2004). Estruturas secundárias anfipáticas possuem um papel importante no dobramento e interação de proteínas e também na auto montagem (KOGAN *et al.*, 2001). Resíduos apolares presentes nas hélices do modelo sugerem interação intramolecular desses resíduos levando a agregação protéica (TATHAM *et al.*, 1993; KOGAN *et al.*, 2001). Foi observado que prolaminas Z19 podem se ligar em ácidos

graxos livres, mantendo essas interações por forças de van der Waals fornecidos por esses resíduos hidrofóbicos (FORATO *et al.*, 2004b). Estas interações, sugeridas pelo nosso modelo (Fig. 4), pode facilitar a agregação e formação de corpos protéicos, uma vês que interações protéico-lipídicas normalmente são necessárias (FORATO *et al.*, 2004a). Além disso, a molécula hidrofóbica aparentemente é estável em ambiente simulado contendo água como solvente. Essa é uma propriedade essencial para proteínas de armazenagem contidas em sementes, como observado por Bugs *et al.*, (2004).

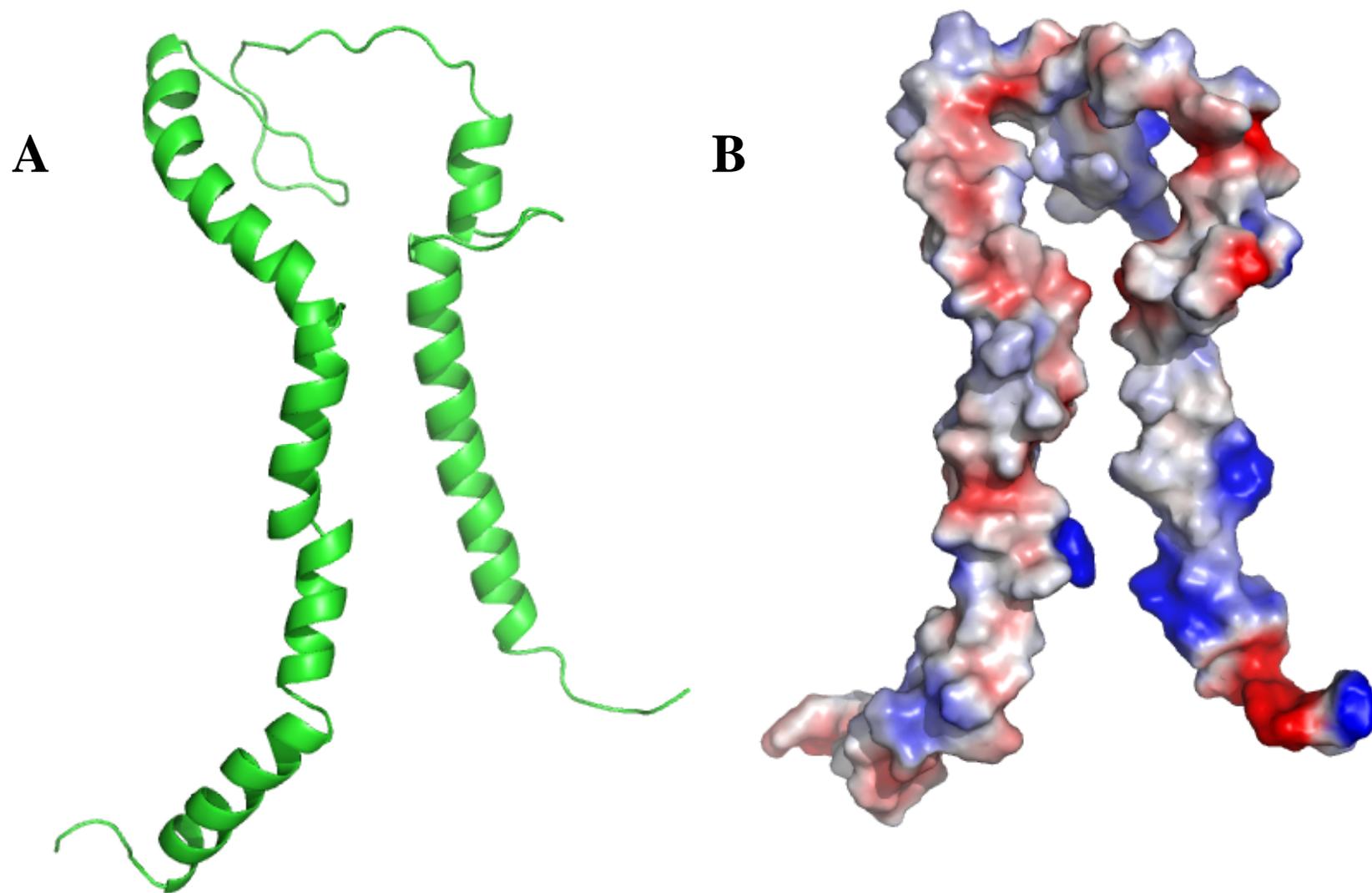


Figura 23: Estrutura terciária da Zeína. A) representação em cartoon da estrutura sendo hélices para  $\alpha$ -hélices B) superfície molecular da zeína. Vermelho para regiões negativas, azul para positivas e branco para não carregadas.

### *8.8 Identification of a cowpea $\gamma$ -thionin with bactericidal activity.*

Publicado no volume 273, páginas 3489-3497 de 2006 no periódico FEBS Journal.

Autores: Franco, O. L.; Murad, A. M.; Leite, J. R.; Mendes, P. A. M.; Prates, M. V. e Bloch-Jr, C.

#### **Material e Métodos**

Os melhores moldes para a construção do modelo de Cp-thionin II foram determinados por *threading* utilizando o Bio-info Meta Server (GINALSKI *et al.*, 2003). Destes, a defensina de *Vigna radiata* VrD1 (PDB file 1TI5), determinada por NMR possui 73% de identidade em um alinhamento sem *gaps* contra Cp-thionin II (LIU *et al.*, 2006). A estrutura mais representada de Vrd1 foi utilizado para a construção do modelo. A validação do modelo foi feito usando PROSA e PROCHECK (LASKOWSKI *et al.*, 1993; SIPPL, 1993).

#### **Resultados**

O molde usado para a construção do modelo da Cp-thionin II demonstrou possuir 73% de identidade resultando em um modelo de alta qualidade confirmados pelas análises dos resultados de PROSA e PROCHECK. O modelo apresentou um estrutura já conhecida chamada Cysteine-stabilized  $\alpha$ -helix  $\beta$ -sheet motif (CS $\alpha/\beta$ ), nome dado por Cornet (CORNET *et al.*, 1995) e analisado 10 anos depois por Zhu (ZHU *et al.*, 2005). Estruturalmente, Cp-thionin II é formada por uma  $\alpha$ -hélice seguida por 3 folhas beta. Em nosso modelo, essa estrutura é estabilizada por quatro conservadas pontes de disulfeto (ALMEIDA *et al.*, 2002; LAY *et al.*, 2003). Muitos

peptídeos com diversas atividades foram encontradas e sua estrutura determinada possuindo esse mesmo motif. Muitas estratégias foram utilizadas para traçar um paralelo entre função e estruturas, mas a maioria das  $\gamma$ -tioninas possuem sua estrutura terciária conservada em todos os grupos funcionais (ALMEIDA *et al.*, 2002; PELEGRINI e FRANCO, 2005) causando grande dificuldade no estudo. Duas dessas estratégias esta na análise do potencial eletrostático e da multimerização da molécula. Esta ultima ocorre provavelmente por causa dos resíduos hidrofóbicos expostos na superfície do peptídeo. Embora o mecanismo real de multimerização ainda não foi encontrado, uma hipótese pode ser sugerida com base na análise do modelo proposto onde os resíduos hidrofóbicos fariam um papel importante entre duas moléculas (SONG *et al.*, 2005). Isto pode ser observado no modelo uma vez que alguns resíduos hidrofóbicos podem ser encontrados no loop 2 (Fig. 4). Uma importante questão a se levantar é em relação a perda de atividade inibitória de Cp-thionin II em relação a Cp-thionin I que claramente é capaz de inibir proteases do tipo tripsina (MELO *et al.*, 2002). De acordo com os modelos moleculares, Cp-thionin I se liga a tripsina bovina de modo canônico, com a Lys11 do inibidor ocupando a cavidade catalítica da enzima. Portanto é interessante comparar as duas Cp-thioninas. Procurando por Lys11 na Cp-thionin II encontramos no lugar uma glicina, um resíduo não polar. Esta única substituição poderia explicar a perda de atividade inibitória de Cp-thionin II. Analisando a camada eletrostática e a superfície das duas defensinas demonstra que Cp-thionin I possui uma diferença espacial entre a  $\alpha$ -hélice e as folhas  $\beta$ , demonstrando que mais espaço é necessário para ter interação do sítio catalítico com a defensina. Outra questão relacionada a estrutura e função biológica nos leva a acreditar que uma combinação de resíduos expostos ao solvente mais a camada eletrostática são necessárias para se obter múltiplas atividades, uma vez que estudos

## 8. ARTIGOS

---

de interação entre defensina e seu alvo leva a um modelo de complementaridade (MELO *et al.*, 2002; PELEGRINI e FRANCO, 2005) insuficiente para explicar multifuncao como atividade bactericida, antifúngica ou inibidor de protease (ALMEIDA *et al.*, 2002).

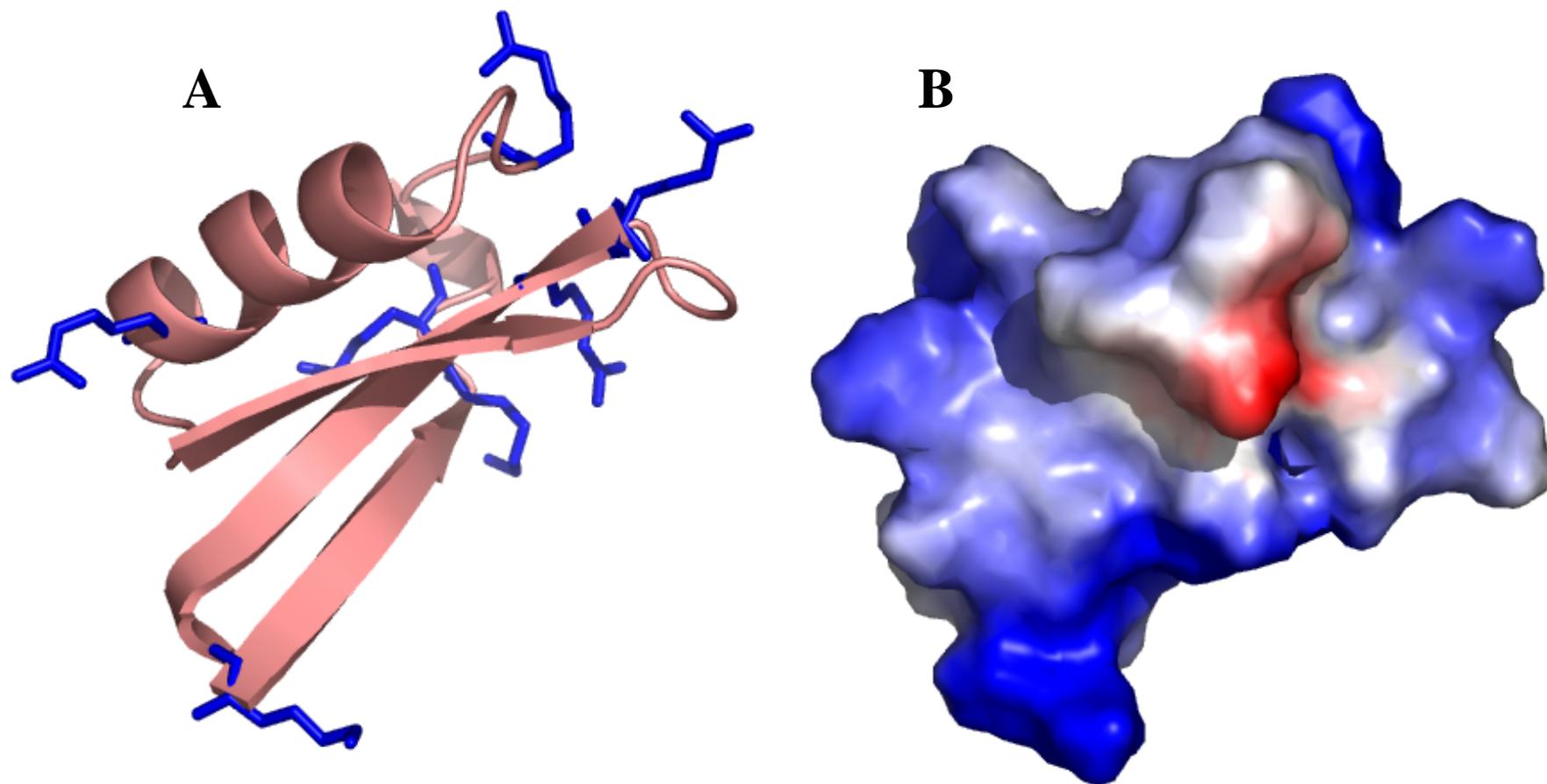


Figura 24: Estrutura terciária da CPthionin II de *Vigna unguiculata*. A) representação em cartoon da estrutura sendo hélices para  $\alpha$ -hélices e setas para folhas  $\beta$ . Resíduos de arginina são representados em bastões azuis B) superfície molecular da defensina. Vermelho para regiões negativas, azul para positivas e branco para não carregadas.

### 8.9 *Trichomonas vaginalis*: Identification of a triacylglycerol acylhydrolase

Publicado no volume 11, páginas 260–263 de 2005 no periódico *Experimental Parasitology*.

Autores: Carvalho, S. E.; Freitas, D.; Murad, A. M.; Franco, O. L. e Simões-Barbosa, A.

#### Material e Métodos

Para determinar o modelo tridimensional da triacilglicerol lipase de *T. vaginalis*, um alinhamento contra estruturas de proteínas foi feito. Para isso foi usado o BioInfo Meta Server (GINALSKI *et al.*, 2003) Obtendo os melhores *scores* de FFAS03 e ORFeus-2, observamos que uma triacilglicerol acilhidrolase de *R. Miehei* (PDB 3TGL) possui a melhor homologia (Figs. 2B and C). os primeiros 33 resíduos de 3TGL indicaram ser um peptídeo sinal, então esta seqüência não foi incluída. O modelo foi construído usando os softwares Tripos Sybyl6.9 e Tripos Biopolymer. Após superposição das coordenadas atômicas dos 187 resíduos, uma minimização de energia foi efetuada. Apenas 1000 passos do algoritmo da Tripos, usando Tripos96 como force field, foram necessários para atingir a força mínima local. Foi necessário reconstruir as ligações peptídicas entre os seguintes resíduos: Ala74, Asn75, Glu99, Cys100, Arg127, Gly128, Tyr154, e Ile155.

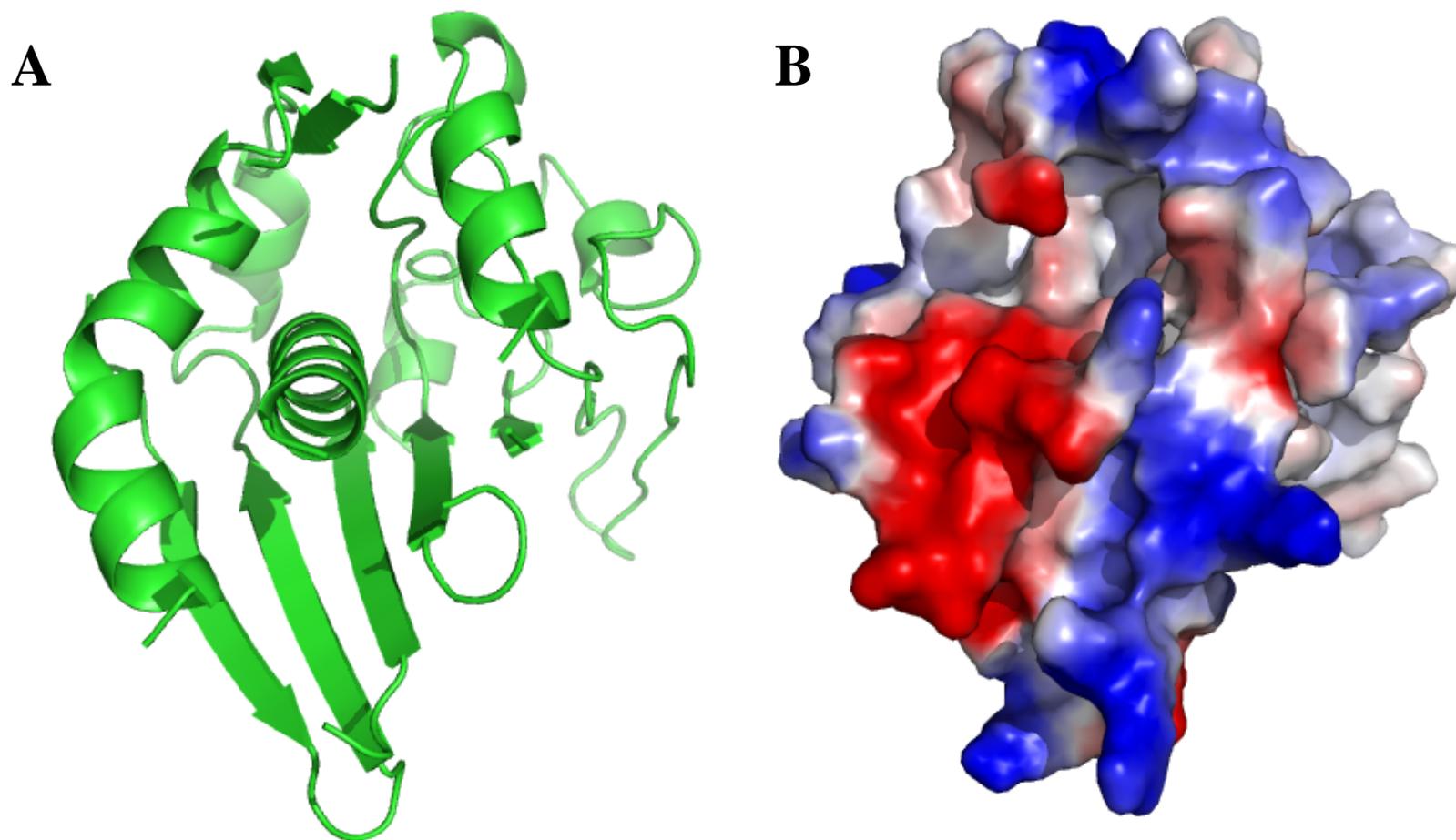
#### Resultados

O modelo consiste numa cadeia única de 187 resíduos de aminoácidos onde 5 folhas beta é envolta por 5  $\alpha$ -helices (Figs. 2B e C). O sítio catalítico das

## 8. ARTIGOS

---

triacilglicerol lípases geralmente é composto por uma tríade Ser-His-Asp mas no modelo nas mesmas posições podem ser encontradas Ser110-Glu217-Asp163, tendo um glutamato na posição destinada a histidina (Fig. 2C). Ensaio enzimático será necessário para elucidar o papel desse resíduo.



**Figura 25:** Estrutura terciária da Triacil glicerol hidrolase de *Tricomonas vaginalis*. A) representação em cartoon da estrutura sendo hélices para  $\alpha$ -hélices e setas para folhas  $\beta$ . B) superfície molecular da enzima. Vermelho para regiões negativas, azul para positivas e branco para não carregadas.

## **9. CAPÍTULOS DE LIVROS**

---

## **9. CAPÍTULOS DE LIVROS**

### ***9.1 Biologia computacional***

Capitulo 11 do Livro Informática em saúde (Editora Universa). ISBN 978-85-60485-03-1. À publicar.

Autores: André Melro Murad e Octávio Luiz Franco

***9.2 Novel findings over defensins and their utilization on construction of transgenic plants***

Autores: André M. Murad, Patrícia B. Pelegrini, Simone M. Neto and Octavio L. Franco

Global science books, Transgenic Plant Journal v. 1 issue 1 pp. 39-48.

## **9. CAPÍTULO DE LIVRO**

---

## **10. APÊNDICE**

---

## 10. APÊNDICE

---

### 10.1 Massas dos peptídeos fragmentados dos spots identificados por PMF de *M. anisopliae*.

#### Spot 1

ID	Mass	TotalScore	S/N
<u>651</u>	655.923	12639	50.5
<u>660</u>	861.0015	11902	34.8
<u>567</u>	665.8935	11778	36.2
<u>539</u>	1060.0823	11612	27.9
<u>652</u>	633.9117	9942	15
<u>634</u>	758.2669	8854.5	13
<u>662</u>	876.9495	8619.5	16.9
<u>663</u>	1066.0309	8565	15.7
<u>655</u>	701.2637	7577	11.2
<u>649</u>	2221.2292	7508	11.1
<u>654</u>	671.9051	7080	14
<u>657</u>	789.3289	6822	10.3
<u>656</u>	745.3065	6343	9.7
<u>658</u>	832.9743	5854	11.4
<u>661</u>	870.9409	4707	10.3
<u>6</u>	855.0627	0	58.9
<u>1</u>	643.9429	0	164.3
<u>2</u>	649.9724	0	102.2
<u>254</u>	606.3006	0	16.4
<u>653</u>	657.2107	0	12.7
<u>538</u>	839.023	0	24.2
<u>659</u>	833.3838	0	9.2

#### Spot 3

ID	Mass	TotalScore	S/N
<u>1</u>	643.9429	0	19.3
<u>2</u>	649.9724	0	63.8
<u>6</u>	855.0627	0	32.7
<u>254</u>	606.3006	0	31
<u>538</u>	839.023	0	16.2
<u>539</u>	1060.0823	5347.5	9.8
<u>566</u>	633.9259	9248.5	12.7
<u>567</u>	665.8935	10771	23.1
<u>569</u>	655.9322	13132.5	47.5
<u>571</u>	861.0121	13203.5	38.6
<u>572</u>	1066.0697	7320.5	12.2
<u>578</u>	694.908	4230.5	6.4
<u>579</u>	671.8744	8190.5	14.8

## 10. APÊNDICE

---

<u>580</u>	877.0508	10648.5	15.3
<u>581</u>	1428.7082	20125.5	461.7
<u>582</u>	1460.7044	19371.5	99.1
<u>583</u>	1988.0566	18046.5	48.7
<u>584</u>	2020.0205	6704	9.5
<u>585</u>	889.3034	17908.5	45.8
<u>597</u>	842.4168	11486.5	12
<u>598</u>	684.1713	9866.5	9.8
<u>599</u>	1411.6536	12878	14.1
<u>600</u>	1770.8247	13908.5	16.6
<u>601</u>	2427.0701	12360.5	13.2
<u>602</u>	2536.0522	15006.5	20.7
<u>603</u>	3102.2766	12430	13.3

### *Spot 4*

ID	Mass	TotalScore	S/N
<u>1</u>	643.9429	0	33
<u>2</u>	649.9724	0	44.8
<u>6</u>	855.0627	0	19
<u>254</u>	606.3006	0	12.5
<u>538</u>	839.023	0	8.4
<u>566</u>	633.9259	6336.5	10.9
<u>567</u>	665.8935	9306.5	15.5
<u>569</u>	655.9322	11505.5	23.5
<u>580</u>	877.0508	8351.5	10.7
<u>581</u>	1428.7082	12625.5	18.9
<u>583</u>	1988.0566	4923	6.7
<u>608</u>	671.8728	4878	9.3
<u>609</u>	861.0021	11474.5	20.7
<u>610</u>	1001.5186	7593.5	9.8
<u>611</u>	1031.527	10961.5	14.3
<u>612</u>	1379.7494	9933.5	12.6
<u>613</u>	1507.8319	14800.5	33.7

### *Spot 5*

ID	Mass	TotalScore	S/N
<u>1</u>	643.9429	0	70
<u>2</u>	649.9724	0	11.5
<u>6</u>	855.0627	0	11.8
<u>254</u>	606.3006	0	33.2
<u>538</u>	839.023	0	7.7
<u>667</u>	1659.9174	16065	34.7
<u>668</u>	2336.2525	15407.5	27.1
<u>673</u>	1583.8567	13370	17.1

## 10. APÊNDICE

---

<u>678</u>	1017.498	7457.5	8.3
<u>679</u>	1230.7031	9718	10.8
<u>680</u>	1393.8054	6817	9.3
<u>681</u>	1400.8074	7473	10
<u>682</u>	2851.5664	11697	13.4

### *Spot 6*

ID	Mass	TotalScore	S/N
<u>1</u>	643.9429	0	66.4
<u>2</u>	649.9724	0	19.8
<u>6</u>	855.0627	0	17.3
<u>254</u>	606.3006	0	7.7
<u>538</u>	839.023	0	13
<u>669</u>	975.4412	8456	7.8
<u>670</u>	1119.578	19601	135.9
<u>671</u>	1343.6966	11399	11.1
<u>672</u>	4100.2219	15597	19.9

### *Spot 7*

ID	Mass	TotalScore	S/N
<u>1</u>	643.9429	0	75.1
<u>2</u>	649.9724	0	21.9
<u>6</u>	855.0627	0	22.5
<u>254</u>	606.3006	0	6.4
<u>538</u>	839.023	0	14.5
<u>539</u>	1060.0823	11920	11.8
<u>694</u>	695.1352	9978	9.5
<u>695</u>	842.4519	0	7.2
<u>696</u>	4121.6752	8606	8

### *Spot 8*

ID	Mass	TotalScore	S/N
<u>1</u>	643.9429	0	111.6
<u>2</u>	649.9724	0	45.8
<u>6</u>	855.0627	0	39.5
<u>254</u>	606.3006	0	28.4
<u>538</u>	839.023	0	19.1
<u>539</u>	1060.0823	11865	13.8
<u>684</u>	655.9607	0	8.3

## 10. APÊNDICE

---

<u>686</u>	633.8928	8834	12.7
<u>687</u>	637.1562	0	8.1
<u>688</u>	659.1755	7250	10.8
<u>689</u>	665.8882	10511	15.8
<u>690</u>	861.0248	10343.5	14.1

### *Spot 9*

ID	Mass	TotalScore	S/N
<u>1</u>	643.9429	0	56.6
<u>2</u>	649.9724	0	34.5
<u>6</u>	855.0627	0	37.8
<u>538</u>	839.023	0	13.9
<u>539</u>	1060.0823	10114.5	13.4
<u>567</u>	665.8935	14017.5	19.6
<u>660</u>	861.0015	9243.5	12.6
<u>674</u>	870.9872	6288.5	9
<u>675</u>	1066.1018	10893.5	14.9
<u>676</u>	1082.0801	7740.5	8.5
<u>677</u>	2647.458	6002.5	6.5

### *Spot 10*

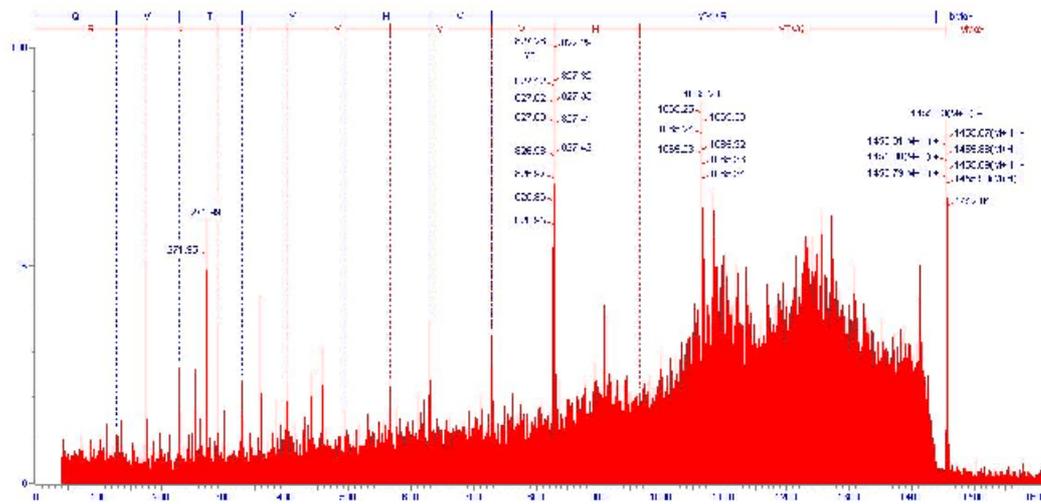
ID	Mass	TotalScore	S/N
<u>1</u>	643.9429	0	13.9
<u>514</u>	695.1972	18071	47.9
<u>521</u>	1185.598	20014	214.1
<u>530</u>	1105.592	19853	168
<u>531</u>	1168.5605	12653.5	13.6
<u>532</u>	1679.9473	12512.5	13.3
<u>533</u>	1711.9734	20030	218.7
<u>534</u>	2095.1804	16718.5	30.6
<u>535</u>	2229.271	19284	88.7
<u>541</u>	1318.7974	12612.5	13.6

### *Spot 13*

ID	Mass	TotalScore	S/N
<u>1</u>	643.9429	0	89.1
<u>2</u>	649.9724	0	12.5
<u>6</u>	855.0627	0	20.4
<u>254</u>	606.3006	0	8.2
<u>500</u>	1060.085	11116	14
<u>519</u>	884.4534	11422	13.9
<u>519</u>	884.4534	12362	13.6
<u>520</u>	1056.5224	0	9.1
<u>521</u>	1185.598	6975	7
<u>522</u>	1356.7585	16706	32.7



Spot 14



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)