

**TOXINA DA SOJA [*Glycine max* (L.) Merril]: ASPECTOS
BIOQUÍMICOS E SEU PROVÁVEL PAPEL NA
DEFESA DA PLANTA**

ELISÂNGELA ALENCAR SIEBRA

FORTALEZA-CEARÁ

2004

**TOXINA DA SOJA (*Glycine max* (L.) Merrill): ASPECTOS
BIOQUÍMICOS E SEU PROVÁVEL PAPEL NA
DEFESA DA PLANTA**

ELISÂNGELA ALENCAR SIEBRA

**TESE SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA, COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM BIOQUÍMICA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA-CE

MARÇO-2004

S573t

Siebra, Elisângela Alencar

Toxina da Soja [*Glycine Max* (L.) Merrill]: aspectos bioquímicos e seu provável papel na defesa da planta / Elisângela Alencar Siebra –

149 f. :il.-.:

Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

Orientadora: Profa. Dra. Ilka Maria Vasconcelos

1. *Glycine Max* 2. Proteína 3. Neurotoxina

4. Defesa I. Título

C.D.D. 574.192

C.D.U. 577.1

Esta tese foi apresentada como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca de Ciências e Tecnologia da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta tese é permitida, desde que seja feita de acordo com as normas da ética científica.

Elisângela Alencar Siebra

TESE APROVADA EM: _____

Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Universidade Federal do Ceará
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular

Dr. Thalles Barbosa Grangeiro
Universidade Federal do Ceará
Depto. de Biologia

Dra. Célia Regina R. S. Carlini
Universidade Federal do Rio Grande do
Sul
Depto. de Biofísica

Dr. José Luís de Lima Filho
Universidade Federal de Pernambuco
Depto. de Bioquímica e Biofísica

Dra. Ilka Maria Vasconcelos
Orientadora
Universidade Federal do Ceará
Depto. de Bioquímica e Biologia Molecular

DEDICATÓRIA

Ao criador ***Deus***

Aos meus amados ***Pais***

Aos meus companheiros ***Irmãos***

Aos meus amores ***Fabiano e Leon,***

dedico com imensa gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Dra. **Ilka** Maria Vasconcelos, pela orientação e fundamentais ensinamentos transmitidos durante a realização desta tese, conferindo a cada dia, maturidade à minha carreira científica. Em especial, pelo carinho e confiança depositados em minha pessoa, fortificando nosso laço de amizade.

Ao Dr. José **Tadeu** Abreu de Oliveira, por sua constante contribuição para a execução deste trabalho e por sua incansável transmissão dos conhecimentos científicos, fruto de sua sede do saber.

A Dra. **Célia** Regina Carlini, por suas sugestões e esclarecimentos científicos de especial valia na execução desta tese. Pela pronta disponibilidade de seu laboratório, alunos e funcionários para a realização dos experimentos de atividade inseticida e ensaios complementares. Pela atenção e carinho dispensados à minha pessoa, em especial durante minha estada em Porto Alegre.

Ao Dr. **Thalles** Barbosa Grangeiro, pela participação da banca examinadora desta tese, pela disponibilidade de seu laboratório e alunos para a execução de ensaios de atividade inseticida. Ao agradável professor pesquisador pelas sugestões e correções realizadas nesta tese.

Ao Dr. **José Luís** de Lima Filho, pela revisão e participação da banca examinadora desta tese.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Meio Norte), na pessoa do pesquisador Gilson Jesus Campelo, pelo fornecimento das sementes de soja pesquisadas nesta tese.

A Dra. **Vânia** Maria Maciel Melo, pela disponibilidade de seu laboratório, equipamentos e literatura fornecidos durante a execução deste trabalho.

A Dra. **Fátima** Grossi de Sá e Dra. **Maura** Cunha, pela realização dos experimentos de sequenciamento.

Aos colegas **Ana Cristina Monteiro, Gandhi Radis, Éder, Daniel, Celso Nagano, Roseane, Helena, Cláudio Ferreira, Melissa, Fernanda Mullinari**, pelo auxílio na realização de experimentos científicos complementares.

Aos amigos de laboratório **Fernanda, Sílvia, Lúcia, Isabel, Ricristhi, Cláudio, Emanuele, Henrique, Cléberon, Simone, Gina, Ygor, Tiago, Adem, Waneska, Ana Lúcia, Sílvio** e tantos mais que com suas amizades e sorrisos tornaram tão agradável minha caminhada neste departamento.

De forma especial, agradeço o companheirismo e esforço empenhado pelas minhas grandes amigas **Daniele e Janne Keila**, que ao meu lado trabalharam e compartilharam os lamentos de um experimento furado, assim como vibraram a cada sucesso dos muitos experimentos realizados.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (UFC), pelos ensinamentos transmitidos, pela disponibilidade de seus laboratórios e equipamentos por mim utilizados.

Aos meus **Pais e Irmãos**, pelo inestimável amor e pelo estímulo diário que cada um me proporcionou com suas palavras de incentivo e atitudes de uma família repleta de respeito, dignidade e verdadeira AMIZADE.

Agradeço a **DEUS** pelo dom da vida e de maneira muito especial aos amados **Fabiano e Leon**, presentes divinos que me dão uma força inexplicável para viver as conquistas que faço em minha vida. Obrigado pelo AMOR de vocês!

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através da concessão de bolsa de Pós-Graduação concedida à autora. Por concessão de auxílio à pesquisa através dos Projetos de Pesquisa: “Proteínas envolvidas no mecanismo de defesa das plantas contra seus agressores” (Projeto Integrado, Processo nº. 523168/95-0), com vigência de 2000 a 2004 (CNPq – PRONEX) e “Desenvolvimento de plantas resistentes a insetos: uma abordagem entomológica e molecular” (Processo N ° 661045/997-8), vigência: julho de 1997 a julho de 2002 (FINEP/PRONEX).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por concessão de auxílio à pesquisa através do Projeto “Proteínas de Sementes: Aspectos Estruturais, Funcionais e Potencial Biotecnológico” (PROCAD, Convênio no 0015/01-6).

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA-PI), pela concessão de sementes dos genótipos e informações imprescindíveis para realização deste trabalho.

Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, em cujos laboratórios foi realizada esta pesquisa.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xvi
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xvii
RESUMO	xix
ABSTRACT	xxi
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	5
2.1 - <u>Recentes Avanços na Agricultura e Exploração de Genótipos Resistentes às Pragas de Soja</u>	6
2.2 - <u>Resistência Vegetal x Fitófagos e Fitopatógenos Naturais (Insetos e Fungos)</u>	11
2.2.1- Insetos	11
2.2.2 - Fungos	18
2.3 - <u>Defesa Vegetal contra o Ataque de Patógenos e Atuação das Proteínas Relacionadas à Patogênese</u>	20
2.4 - <u>Toxinas de Fontes Diversas</u>	23
3 - OBJETIVOS	25
3.1 - Gerais	26
3.2 - Específicos	26
4 - MATERIAIS	27
4.1 - <u>Sementes</u>	28
4.2 - <u>Eritrócitos</u>	28
4.3 - <u>Animais de Experimentação</u>	28
4.3.1 - Camundongos	28
4.3.2 - Coelho	29
4.3.3 - <i>Callosobruchus maculatus</i>	29
4.3.4 - <i>Dysdercus peruvianus</i>	29

4.4 - <u>Cercospora sojina</u>	29
4.5 - <u>Reagentes Químicos</u>	30
5 - MÉTODOS	31
5.1 - <u>Preparação da Farinha dos Genótipos BR-10, TRC e TRC-H</u>	32
5.1.1 - Obtenção da Farinha	32
5.1.2 - Delipidação da Farinha	32
5.2 - <u>Análise Comparativa dos Genótipos BR-10, TRC e TRC-H</u>	32
5.2.1 - Composição Centesimal	32
Determinação do Teor de Umidade	33
Determinação do Teor de Cinzas	33
Determinação do Teor de Proteína Total	33
Determinação do Teor de Lipídio Total	34
5.2.2 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)	34
5.2.3 - Composição em Aminoácidos	35
5.2.4 - Extração e Determinação de Proteína	36
5.2.5 - Detecção e Quantificação de Fatores Tóxicos e/ou Antinutricionais	38
Toxina	38
Inibidor de Tripsina	38
Urease	39
Lectina	40
5.2.6 - Detecção e Dosagem de Proteínas Relacionadas à Patogênese (PR-Proteínas)	40
Preparação dos Extratos Protéicos	41
Atividade Quitinásica	41
Atividade β -1,3-Glucanásica	42
Atividade Peroxidásica	42
5.3 - <u>Purificação da Toxina da Soja (SBTX)</u>	42
5.3.1 - Extração e Purificação da SBTX	42
5.3.2 - Cromatografias	44
Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose	44

Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de CM-Sepharose	46
Cromatografia de Exclusão Molecular em Coluna de Superdex 200 HR 10/30	46
5.4 - <u>Caracterização Físico-Química da SBTX</u>	47
5.4.1 - Determinação da Massa Molecular	47
Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	47
Filtração em Gel	48
Eletroforese Bidimensional	49
Espectrometria de Massa	49
5.4.2 - Determinação do Ponto Isoelétrico	50
5.4.3 - Análise da Composição de Aminoácidos	50
5.4.4 - Determinação da Seqüência de Aminoácidos NH ₂ -Terminal	51
5.4.5 - Determinação do Espectro de Absorção	51
5.4.6 - Dosagem de Carboidratos	51
5.5 - <u>Caracterização Biológica da SBTX</u>	52
5.5.1 - Detecção de Atividades Relacionadas à Defesa Vegetal	52
5.5.2 - Avaliação da Atividade Antifúngica	53
Ensaio em Placa e Discos Estéreis	53
Ensaio em Placa em Meio Sólido Perfurado	53
5.5.3 - Avaliação do Potencial Inseticida	56
<i>Dysdercus peruvianus</i>	56
Origem e Manutenção dos Insetos	56
Preparação das Dietas	58
Ensaio Biológico	58
<i>Callosobruchus maculatus</i>	58
Origem e Manutenção dos Insetos	60
Preparação das Dietas	60
Ensaio Biológico	60
5.6 - <u>Avaliação Temporal e Localização Tecidual da SBTX Durante a Germinação</u>	62
5.6.1 - Germinação das Sementes do Genótipo BR-10	62

Tratamento das Sementes	62
Semeadura	62
Coleta das Plântulas e Separação dos Tecidos Vegetais	64
5.6.2 - Preparação dos Extratos Vegetais	64
5.6.3 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida dos Tecidos Vegetais	65
5.6.4 - Atividade Hemaglutinante	65
5.6.5 - Atividade Inibidora de Tripsina	65
5.6.6 - Ensaio Imunológico	66
Obtenção de Anticorpos Policlonais Anti-SBTX	66
<i>Western Blotting</i>	67
ELISA (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	68
5.7 - <u>Análise Estatística</u>	69
6 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
6.1 - <u>Composição Centesimal</u>	72
6.2 - <u>Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Sob Condições Desnaturantes</u>	74
6.3 - <u>Composição em Aminoácidos</u>	74
6.4 - <u>Deteção e Quantificação de Fatores Tóxicos e/ou Antinutricionais</u>	77
Toxina	77
Inibidor de Tripsina	79
Urease	80
Lectina	81
6.5 - <u>Deteção e Quantificação de PR-Proteínas</u>	83
Quitinases	83
β -1,3-Glucanases	85
Peroxidases	85
6.6 - <u>Extração e Purificação da Toxina da Soja</u>	86
6.7 - <u>Caracterização da Toxina da Soja</u>	91
6.7.1 - Massa Molecular	91
6.7.2 - Ponto isoelétrico	95
6.7.3 - Composição de Aminoácidos e Sequência NH ₂ -terminal	99

6.7.5 - Dosagem de Açúcar Total	102
6.8 - <u>Determinação das Atividades Biológicas de SBTX Relacionadas à Defesa</u>	104
6.8.1 - Atividade Antifúngica contra <i>Cercospora sojina</i>	105
6.8.2 - Atividade Inseticida contra <i>Dysdercus peruvianus</i>	107
6.8.3 - Atividade Inseticida contra <i>Callosobruchus maculatus</i>	110
6.9 - <u>Localização Tecidual da SBTX</u>	115
6.9.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida dos Tecidos Vegetais	116
6.9.2 - Atividade Hemaglutinante	116
6.9.3 - Atividade Inibidora de Tripsina	119
6.9.4 - Detecção de SBTX nos Tecidos Vegetais por <i>Western Blotting</i>	121
6.9.5 - Quantificação de SBTX nos Tecidos Vegetais por ELISA	123
7 - CONCLUSÕES	126
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1- Produção total em milhões de hectares (ha) de soja, feijão, arroz e milho nos anos de 2002 e 2003, segundo pesquisas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)	7
2 - Esquema de obtenção do extrato total	37
3 - Esquema geral de purificação da toxina da soja (SBTX)	45
4 - Folhas de soja infectadas com <i>Cercospora sojina</i> apresentando a doença mancha de olho-de-rã.	54
5 - Desenhos esquemáticos dos ensaios de avaliação da atividade antifúngica da SBTX contra o fungo <i>Cercospora sojina</i> .	55
6 - <i>Dysdercus peruvianus</i>	57
7 - <i>Callosobruchus maculatus</i>	59
8 - Avaliação da atividade inseticida das diferentes frações obtidas durante o processo de purificação da SBTX para <i>Callosobruchus maculatus</i> (gorgulho)	61
9 - Localização tecidual da toxina da soja em plântulas do genótipo BR-10, germinadas por 12 dias em câmara escura, a 25 °C ± 2 °C.	64
10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS e β-mercaptoetanol das farinhas de sementes de soja, corada com "Coomassie Brilliant Blue" R-250.	75
11- Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose	88
12 - Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-sepharose	89
13 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HR 10/30	92
14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, cuja amostra foi tratada ou não com β-	93

	mercaptoetanol, da toxina da soja (SBTX).	
15 -	Estimativa da massa molecular da toxina da soja (SBTX) por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HR 10/30	95
16 -	Eletroforese bidimensional da toxina da soja (SBTX) revelada com nitrato de prata.	96
17 -	Espectrometria de massa da toxina da soja (SBTX).	97
18 -	Espectro de absorção da toxina da soja (SBTX).	101
19 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida da toxina da soja (SBTX) corada com ácido periódico de Schiff.	103
20 -	Avaliação da atividade antifúngica de frações protéicas obtidas durante a purificação da SBTX contra o fungo <i>Cercospora sojina</i> .	106
21 -	Avaliação do efeito da toxina da soja (SBTX) sobre o ganho de peso médio (mg) de <i>Dysdercus peruvianus</i> , alimentados por 10 dias com dietas experimentais (0,02; 0,2 e 1,0% SBTX) e dieta controle (farinha de sementes de algodão).	108
22 -	Avaliação do efeito da toxina da soja (SBTX) sobre a sobrevivência de <i>Dysdercus peruvianus</i> , alimentados por 10 dias com dietas experimentais (0,02; 0,2 e 1,0% SBTX) e dieta controle (farinha de sementes de algodão).	109
23 -	Avaliação do efeito do extrato total (ET), da fração obtida por precipitação do ET com sulfato de amônio (F _{20-55%}) e de uma fração rica em SBTX obtida em cromatografia em coluna de DEAE-celulose (PREP.C-Ia) sobre a emergência de <i>Callosobruchus maculatus</i> , alimentados por 33 dias com dietas experimentais (0,05; 0,1; 0,5 e 1,0% PREP.CIa) e controle (farinha de sementes de feijão-de-corda).	111
24 -	Avaliação do efeito do extrato total (ET), da fração obtida por precipitação do ET com sulfato de amônio (F _{20-55%}) e de uma fração rica em SBTX obtida em cromatografia em	113

- uma fração rica em SBTX obtida em cromatografia em coluna de DEAE-celulose (PREP.C-Ia) sobre o peso médio de *Callosobruchus maculatus*, alimentados por 33 dias com dietas experimentais (0,05; 0,1; 0,5 e 1,0% PREP.CIa) e controle (farinha de sementes de feijão-de-corda).
- 25 - Avaliação do efeito do extrato total (ET), da fração obtida por precipitação do ET com sulfato de amônio (F_{20-55%}) e de uma fração rica em SBTX obtida em cromatografia em coluna de DEAE-celulose (PREP.C-Ia) sobre o tempo médio de desenvolvimento *Callosobruchus maculatus*, alimentados por 33 dias com dietas experimentais (0,05; 0,1; 0,5 e 1,0% PREP.CIa) e controle (farinha de sementes de feijão-de-corda). 114
- 26 - Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, na presença de β-mercaptoetanol, de tecidos vegetais obtidos durante a germinação de sementes do genótipo BR-10, revelada com prata. 117
- 27 - *Western blotting* de tecidos vegetais obtidos durante a germinação de sementes do genótipo BR-10, revelados com substrato para fosfatase alcalina BCIP/NBT. 122
- 28 - Teores de toxina da soja (SBTX) nos tecidos vegetais obtidos durante a germinação de sementes do genótipo BR-10, detectados por ELISA, usando IgG anti-SBTX. 124

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
1 - Principais insetos-praga da soja e parte da planta agredida	12
2 - Composição centesimal (g/100 de farinha) de sementes de soja, genótipos BR-10, TRC e TRC-H, expressa em percentual do peso seco	73
3 - Composição em aminoácidos (g/100 gP) das farinhas de sementes de soja, genótipos BR-10, TRC e TRC-H	76
4 - Fatores tóxicos e/ou antinutricionais presentes nos extratos brutos dos genótipos BR-10, TRC e TRC-H	78
5 - Atividade hemaglutinante* (UH/mgP) presente nos extratos brutos dos genótipos BR-10, TRC e TRC-H frente a eritrócitos de coelho tratados e não tratados com enzimas proteolíticas	82
6 - Atividades quitinásica, β -1,3-glucanásica e peroxidásica presente nos extratos brutos dos genótipos BR-10, TRC e TRC-H	84
7 - Purificação da toxina da soja (SBTX)	90
8 - Composição em aminoácidos da toxina da soja (SBTX)	100
9 - Atividade hemaglutinante* de extrato de cotilédones obtidos durante a germinação de sementes do genótipo BR-10, frente a eritrócitos de coelho (2%)	118
10 - Atividade inibidora de tripsina* presente em extrato bruto de cotilédone, raiz, caule e folha, obtidos durante a germinação de sementes do genótipo BR-10	120

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

BAPNA	<i>N</i> α-L-Benzoil-Arginina- <i>p</i> -Nitroanilida
BBI	Inibidor de tripsina de Soja tipo Bowman Birk
BSA	Albumina Sérica Bovina
CCK	Colecistocinina
CM	Carboximetil
CNPSO	Centro Nacional de Pesquisa da Soja
CNTX	Canatoxina
Con A	Lectina de <i>Canavalia ensiformis</i>
DEAE	Dietilaminoetil
DL ₅₀	Dose capaz de matar 50 % dos animais testados
DMAB	<i>p</i> -dimetilaminobenzaldeído
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FRIFOR	Frigorífico Industrial de Fortaleza
GalNAc	<i>N</i> -acetil-D-galactosamina
GlcNac	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina
GNA	Lectina de <i>Galanthus nivalis</i>
HEMOCE	Centro de Hemoterapia do Ceará
IgG	Imunoglobulina G
im	Intramuscular
ip	Intraperitoneal
iv	Intavenoso
KSTI	Inibidor de Tripsina de Soja tipo Kunitz
Mr	Massa molecular aparente
nKat	Nanokatal. Definido como 1 nmol de <i>N</i> -acetil-D-glucosamina liberado por segundo.
NBT/BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro blue tetrazolium

PAGE-SDS	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
PHA	Aglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
pNPP	p-nitrofenil fosfato
p-OHMB	p-hidroxi-mercuri-benzoato
PVDF	difluoreto polivinilideno
RIPs	Proteínas Inativadoras de Ribossomos
SBA	Aglutinina de soja
SBTI	Inibidores de Tripsina de Soja
SBTX	Toxina da soja
sc	Subcutâneo
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SYTX	Soyatoxina
TEMED	N,N,N',N' - tetrametiletilenodiamina
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
Tween	Polioxietileno sorbitan mono-oleato
UAP	Unidade de Atividade Peroxidásica. Definida como a variação de 1 unidade de absorbância por minuto.
UH	Unidade de Hemaglutinação. Definida como o inverso da maior diluição que é capaz de aglutinar uma suspensão de eritrócitos a 2%.
UI	Unidade de Inibição. Definida como a quantidade em mg tripsina inibida.
WGA	Lectina de <i>Triticum vulgaris</i>

RESUMO

Três genótipos de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] da mesma linhagem genética, BR-10 Teresina, Teresina RC e Teresina RCH, foram comparados quanto à composição centesimal, conteúdo aminoacídico, presença de fatores tóxicos e/ou antinutricionais e presença de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas). Os três genótipos estudados apresentaram quantidade considerável de carboidratos (18,75-28,59%) e elevado teor protéico (37,0-47,5%). Os teores de cinzas e lipídios das três amostras variaram de 5,26 a 5,35% e de 20,44 a 21,61%, respectivamente. Os aminoácidos presentes em maiores quantidades nos genótipos estudados foram ácido glutâmico/glutamina, ácido aspártico/asparagina, arginina, alanina e leucina. Os extratos brutos dos três genótipos apresentaram atividades inibitória de tripsina (74,7-79,1 UI/gF) e ureásica (643,2-746,4 U/KgF). A presença de lectina foi detectada nos extratos dos três genótipos quando em contato com eritrócitos de coelho. O genótipo BR-10 exibiu o menor valor de DL₅₀ (155,0 mgP/Kg de peso corpóreo) e foi, portanto, o mais tóxico dentre os três genótipos testados. Os extratos brutos dos genótipos estudados apresentaram atividades quitinásica, β -1,3-glucanásica e peroxidásica, cujos valores variaram de 0,26 a 0,44 nKat/mgP, 5,44 a 5,67 nKat/mgP e 4,71 a 5,49 UAP/mgP, respectivamente. A proteína tóxica, SBTX, foi purificada através de cromatografias de troca iônica e filtração em gel. PAGE-SDS revelou que SBTX trata-se de uma proteína dimérica de massa molecular de 44,0 kDa, composta por duas subunidades distintas, uma de 27,0 kDa e outra de 17,0 kDa. Por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HR 10/30, a SBTX apresentou massa molecular de 43,0 kDa. Eletroforese bidimensional de SBTX revelou a presença de duas subunidades de massas moleculares aparentes de 29,0 e 17,0 kDa, com valores de pontos isoelétricos correspondentes a 5,3 e 8,0, respectivamente. Espectrometria de massa revelou a presença de moléculas de 43,0, 21,0 e 17,0 kDa. SBTX é uma glicoproteína (5,0% de carboidratos), rica em glutâmico/glutamina (14,98%), alanina (11,12%), lisina (10,05%) e aspártico/

asparagina (9,09%) e possui a seguinte seqüência NH₂-terminal ILKEPVHGV. SBTX inibiu o crescimento do fungo *Cercospora sojina*, induziu redução dos percentuais de sobrevivência e peso médio de *Dysdercus peruvianus* e, aparentemente, exerceu efeitos tóxicos negativos sobre a emergência, ganho de peso e tempo de desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus*. SBTX foi detectada em cotilédones, caules, raízes e folhas de plântulas de BR-10. Durante a germinação das sementes, houve uma redução nos teores de SBTX em cotilédones, caules e raízes e um aumento nas folhas. Os resultados obtidos sugerem o envolvimento da SBTX na defesa contra agressores.

ABSTRACT

Three genetically related soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] cultivars, BR-10 Teresina, Teresina RC and Teresina RCH, were compared as to proximate analysis, aminoacidic content, the presence of antinutritional/toxic factors, and the presence of proteins related to plant defense (PR-proteins). The studied genotypes showed expressive contents of carbohydrates (18.75-28.59%) and high proteic levels (37.0-47.5%). Ash and lipids contents varied from 5.26-5.35% and 20.44-21.61%, respectively. The amino acids present with the highest contents were glutamic/glutamine, aspartic/asparagine, arginin, alanin and leucin. The crude extracts of all genotypes showed trypsin inhibitory and ureasic activities (74.7-79.1 UI/g flour, and 643.2-746.4 U/Kg flour, respectively). The presence of the lectin was detected on extracts of three genotypes when exposed to rabbit erythrocytes. The BR-10 genotype showed the lowest value of DL₅₀ (155.0 mgP/Kg mouse body weight) and was, this way, the most toxic of the three tested genotypes. The crude extracts of the studied genotypes showed chitinasic, glucanasic and peroxidasic activities, with values varying from 0.26-0.44 nKat/mgP, 5.44-5.67 nKat/mgP and 4.71-5.49 UAP/mgP, respectively. The toxic protein, SBTX, was purified in chromatographic matrices of ion exchange and gel filtration. PAGE-SDS showed that SBTX is a 44.0 kDa dimeric protein composed by two distinct subunities (27.0 and 17.0 kDa). SBTX applied on a molecular exclusion column of Superdex 200 HR 10/30 showed a molecular mass of 43.0 kDa. Bidimensional eletrophorese of SBTX revealed the presence of two subunities of apparent molecular of 29.0 and 17.0 kDa, with isoeletric points values corresponding to 5.3 and 8.0, respectively. Mass spectrometry showed the presence of 43.0, 21.0 and 17.0 kDa molecules. SBTX is a glycoprotein (5.0% of carbohydrates), rich in glutamic/glutamine (14.98%), alanin (11.12%), lisin (10.05%) and aspartic/asparagin (9.09%) and exhibit the NH₂-terminal sequence ILKEPVHGV. SBTX inhibited the growing of the fungi *Cercospora sojina*, induced reduction on the survival percentages and the mean weight of *Dysdercus peruvianus* and exhibit negative toxic effects on the

emergence, weight gain and development time of *Callosobruchus maculatus*. SBTX was detected on cotyledons, stems, roots and leaves of BR-10 plants. During the seeds germination, occurred a reduction in levels of SBTX in cotyledons, stems, roots and growing on leaves. The results suggest the involvement of SBTX in plant defense against aggressors.

1. INTRODUÇÃO



Vários órgãos mundiais voltados para a nutrição humana já vêm, há alguns anos, alertando para um cenário preocupante de déficit alimentar crescente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Para combater este quadro de carência alimentar é que produtores de diversas partes do mundo investem, cada vez mais, em tecnologias que gerem aumento da produção (Kg) e da produtividade (Kg/ha) das principais culturas de subsistência.

Desde a época da colonização, alguns cultivos, como a cana-de-açúcar, o cacau e o café, marcaram a história do País. Agora, no Brasil do século XXI, a estrela da lavoura é a soja. Com 52 milhões de toneladas colhidas em 2003, o Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos. A surpresa não se resume ao tamanho da safra! A cada ano são desenvolvidas mais e mais aplicações. A soja é considerada a mais importante fonte de óleo e proteína vegetal da atualidade (Zeller, 1999; Merz-Demlow, 2000). Os grãos podem ser usados no combate ao alcoolismo e em tratamentos contra o câncer de próstata e de mama. A partir do óleo, é possível produzir tintas, colas e até protetores solares. Com tantas formas de uso, a soja tornou-se uma verdadeira mina de ouro e as lavouras tomaram conta de quase todo o País. Nas últimas quatro décadas, a produção deu um salto de 206 mil toneladas para 52 milhões de toneladas no ano passado, indício de que as áreas de cultivo cresceram na mesma proporção (Revista Isto É, nº 1796, 10 de março/2004).

Embora a soja apresente elevados índices de produção, é importante salientar que esta leguminosa mesmo sendo uma excelente fonte de proteínas contém, também, fatores antinutricionais e/ou tóxicos (lectinas, inibidores de proteases, taninos, alérgenos, toxinas etc.) que depreciam a sua qualidade nutritiva (Liener, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1994; Siebra, 1998). Além da existência de tais fatores, uma outra questão preocupante em relação à cultura da soja é a forte predação e ataques exercidos por vários organismos fitopatogênicos. Diante dos aspectos negativos citados, pesquisadores de todo o mundo, que trabalham com a soja, vêm direcionando os estudos para a área biotecnológica objetivando, particularmente, o desenvolvimento de genótipos de elevada produtividade, com baixos teores de componentes antinutricionais e/ou tóxicos e resistentes ao

ataque de predadores e fitopatógenos naturais. Assim, as modernas técnicas de controle estão se voltando para o isolamento e identificação de genes de resistência que possam ser transferidos para variedades comerciais, a fim de torná-las mais resistentes a predadores e patógenos (Carlini e Grossi-de-Sá, 2002).

Ainda na década de 50, Liener constatou a toxicidade de extratos aquosos de soja para camundongos, quando injetados intraperitonealmente, a qual foi atribuída, a princípio, aos inibidores de tripsina (SBTI) e/ou aglutinina da soja (SBA), constituintes protéicos presentes nas sementes de soja (Liener, 1951). Logo em seguida, foi constatado que a fração tóxica era destituída de atividade inibitória de tripsina e de atividade hemaglutinante (Liener e Pallansch, 1952). Várias tentativas, embora sem sucesso, foram feitas no sentido de isolar o princípio tóxico. No final da década de 80, Carlini e colaboradores retomaram os estudos de toxicidade da soja e observaram a coexistência de lectina e proteína tóxica no extrato bruto de sementes de soja (Carlini *et al.*, 1988). Em 1994, Vasconcelos e colaboradores isolaram e caracterizaram uma toxina protéica presente na soja comercial, denominada de soyatoxina (SYTX), distinta de SBTI e da SBA. Todavia, durante o procedimento de purificação da SYTX, foi detectada a existência de uma outra fração tóxica. Em 1998, Siebra isolou e caracterizou parcialmente o princípio responsável pela toxicidade nesta fração, uma proteína, a qual foi designada de toxina da soja (SBTX).

A existência de duas toxinas protéicas nas sementes com propriedades distintas, verificadas, particularmente, durante a purificação de cada uma delas (Vasconcelos *et al.*, 1994; Siebra, 1998), juntamente com o conhecimento da existência de genótipos de soja contendo teores diferenciados destas toxinas (Vasconcelos *et al.*, 1997) acarretaram alguns questionamentos:

1. *O melhoramento genético realizado em sementes de soja, de modo a combater o ataque de fitófagos e fitopatógenos, poderia alterar caracteres bioquímicos, em particular as toxinas, a ponto de justificar a resistência e/ou suscetibilidade a um dado patógeno?*

2. *Uma modificação na metodologia para purificação da SBTX poderia resultar no aprimoramento de seu isolamento, de modo a possibilitar uma caracterização físico-química mais adequada dessa toxina e, ainda, um acúmulo de toxina na forma ativa, a fim de permitir uma avaliação de algumas atividades biológicas?*
3. *A SBTX participa do sistema de defesa da soja?*

Para responder aos questionamentos citados, foi realizado um estudo bioquímico comparativo de três genótipos de soja geneticamente relacionados (BR-10 Teresina, Teresina RC e Teresina RCH), assim como uma avaliação da provável atuação da SBTX nos mecanismos de defesa da soja contra potenciais pragas e fitopatógenos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA



2.1 - Recentes Avanços na Agricultura e Exploração de Genótipos Resistentes às Pragas de Soja

Dentre as mais variadas fontes alimentares disponíveis, as sementes merecem atenção especial devido à disponibilidade de uma gama de compostos moleculares calóricos, tais como proteínas, carboidratos e lipídios. As leguminosas, incluindo feijões, lentilhas, ervilhas e outros vegetais, são bons exemplos de fontes nutricionais ricas em compostos moleculares. A soja é uma leguminosa que representa bem este grupo, sendo bastante investigada por apresentar além de elevados teores de óleo e proteína, 12 tipos diferentes de isoflavonas que induzem, dentre outros efeitos, redução nos níveis de colesterol do tipo LDL, sendo considerada a mais importante fonte de óleo e proteína vegetal da atualidade (Zeller, 1999; Merz-Demlow, 2000).

O Brasil é um dos principais países produtores de soja do mundo perdendo somente para os Estados Unidos. Uma análise recente de dados econômicos, fornecida pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), revelou que a produção total de leguminosas, cereais e oleaginosas do ano de 2003 foi reduzida em 1,41% em relação a da safra passada de 2002. Porém, no que concerne à soja, a produção para a safra 2002/2003 indica uma área plantada de 17,5 milhões de hectares, superior em 8% àquela plantada na safra pretérita que foi de 16,2 milhões de hectares (FIGURA 1). Todos os Estados que produzem soja no país apresentaram aumento em 2003, sendo os maiores acréscimos observados na Bahia (39%), Rio Grande do Sul (38%), Paraná (12%), Mato Grosso (12%), Goiás (12%) e Mato Grosso do Sul (11%) (<http://www.ibge.gov.br>).

Os percentuais citados revelam o esforço constante empenhado pelos agricultores brasileiros no intuito de elevar a produtividade e aproximar-se da produção de soja norte-americana.

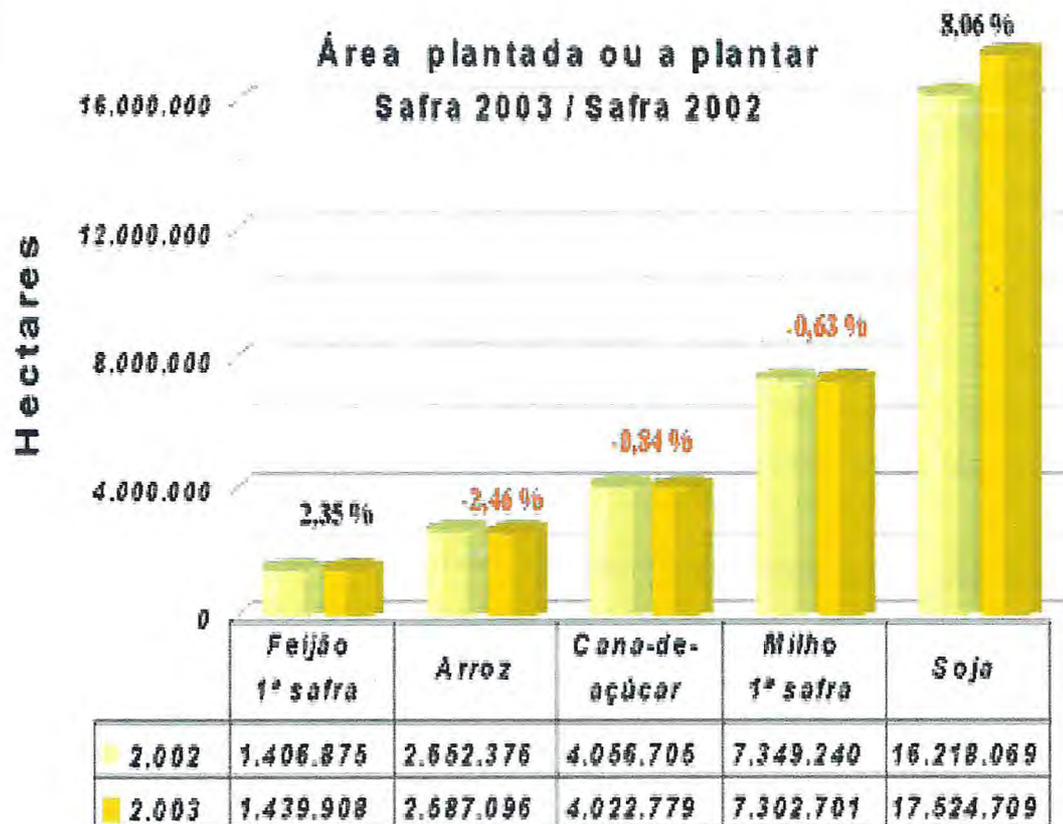


FIGURA 1 - Área total, em milhões de hectares (ha), plantada com soja, feijão, arroz e milho nos anos de 2002 e 2003, segundo levantamento feito pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE).

Embora a soja apresente elevados índices de produção, é importante que a população saiba que esta leguminosa, mesmo sendo uma excelente fonte de proteínas, contém, também, fatores antinutricionais e/ou tóxicos (lectinas, inibidores de proteases, taninos, alérgenos, toxinas etc.) que depreciam a sua qualidade nutritiva (Liener, 1994; Vasconcelos *et al.*, 1994; Siebra, 1998). Além da existência de tais fatores, uma outra questão preocupante em relação à cultura da soja é a forte predação e ataques exercidos por vários organismos fitopatogênicos, tais como insetos, fungos e bactérias. Diante dos aspectos negativos citados, pesquisadores de todo o mundo, que trabalham com a soja, têm direcionado os estudos para a área biotecnológica objetivando, particularmente, o desenvolvimento de genótipos de elevada produtividade, com baixos teores de componentes antinutricionais e/ou tóxicos e resistentes ao ataque de predadores naturais e fitopatógenos.

A engenharia genética, através de tecnologia avançada, permitiu a transferência de genes entre organismos, conferindo caracteres dantes inexistentes. Dessa forma, plantas suscetíveis ao ataque de certos predadores e fitopatógenos tornaram-se resistentes e satisfatoriamente produtivas. Atualmente, existem bancos de sementes espalhados por todo o mundo com exemplares de plantas transgênicas detentoras das mais diversas características.

Com o desenvolvimento de plantas transgênicas, surgiu como possibilidade o uso de compostos protéicos antinutricionais e/ou tóxicos, considerados armas químicas, contra insetos fitófagos e microorganismos fitopatogênicos. Tais proteínas vegetais, como o exemplo das δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*, receberam a denominação de bioinseticidas. Dentre as leguminosas, a soja se apresenta como uma candidata promissora para o desenvolvimento de bioinseticidas; devido em sua composição estar a presença de constituintes antinutricionais e/ou tóxicos, como os inibidores de tripsina, lectina, urease, soyatoxina (SYTX) e toxina da soja (SBTX) (Siebra, 1998; Vasconcelos *et al.*, 2001).

Estudos voltados para o combate de predadores e fitopatógenos de soja (insetos, nematódeos, fungos, bactérias e vírus) já vêm sendo desenvolvidos há

algumas décadas. Na década de 90, pesquisadores identificaram a linhagem de soja 417061 como detentora de elevada resistência a *Epilachna varietis*, *Anticarsia gemmatalis* e outros insetos. Em 1998, Kilen e Lambert empenharam-se em determinar se os genes de resistência na linhagem 417061 possuíam alguma diferença quando comparados aqueles das linhagens PI 171451, PI 227687 e PI 229358, também conhecidas como de alta resistência. Os dados obtidos mostraram que o controle genético da expressão dos genes ligados à resistência na linhagem 417061 era diferente do encontrado para PI 171451 e PI 227687, mas que a maioria dos genes envolvidos com a resistência em PI 417061 estava, provavelmente, presente em PI 229358. Sendo assim, foi suposto que a utilização de linhagens oriundas de cruzamentos entre PI 417061 e PI 229358 seria bastante vantajosa para o emprego nos programas de melhoramento e obtenção de linhagens ainda mais resistentes ao ataque de fitófagos e fitopatógenos.

Heterodera glycines é um dos principais nematódeos que atacam plantações de soja e muitas linhagens já foram identificadas como resistentes às raças 3, 5 e 14, mas não às raças 1 e 2. Em 1997, Rao Arelli e colaboradores estudaram 86 linhagens de soja com o intuito de observar a resistência contra as raças 1 e 2 de *H. glycines*. Os estudos revelaram que as linhagens 89772, 90763, 404198A, 437654 e 438489B se mostraram resistentes ao ataque das raças 1 e 2, e que a linhagem 437654 era a única possuidora de resistência contra as diferentes raças 1, 2, 3, 5 e 14.

As plantações de soja são, também, atacadas severamente por diversos vírus, fungos e bactérias. O vírus do mosaico da soja (SMV) é o causador da doença viral mais comum, provavelmente, nas regiões de plantação de soja, podendo causar volumosas perdas no rendimento. Wang e colaboradores, em 1998, estudaram o padrão de herança dos genes de resistência ao SMV-G1 em 4 cultivares de soja da China [Feng shou huang (PI 458507), Ke feng N° 1 (PI 556949), Da bai ma (PI 556948) e Xu dou N° 1 (PI 556950)]. Eles observaram que cada uma delas possuía um gene dominante único para resistência ao SMV-G1 e, ainda, que somente o cultivar PI 458507 tinha um gene dominante único no locus *Rsv1*. Os outros três cultivares possuíam gene dominante para resistência em

outros loci, o que é vantajoso, pois acredita-se que uma única linhagem com resistência multigênica apresenta resistência a variadas cepas do SMV, ampliando, assim, seu espectro de ação.

A mancha de olho de rã, causada pelo fungo *Cercospora sojina*, é uma das principais doenças foliares de soja, podendo ocorrer também no caule e semente. As perdas no rendimento das plantações decorrentes dessa doença podem chegar até 60%, como já ocorreu na Nigéria (Dashiell e Akem, 1991). Apesar de fungicidas reduzirem, em parte, o ataque de fitopatógenos, a utilização de cultivares de soja resistentes se mostra como uma alternativa ambiental menos agressiva para o controle de pragas. Um total de 1686 acessos de soja, provenientes do banco de germoplasma americano (USDA), foram inoculados com o fungo *C. sojina* para avaliação da resistência à mancha de olho de rã. Do total testado, 660 acessos desenvolveram sintomas leves, sendo considerados resistentes, e 12 não apresentaram nenhum sintoma, chamados de "imunes". Tais acessos "imunes" são fontes potenciais de genes de resistência para o desenvolvimento de cultivares de soja resistentes a mancha de olho de rã (Yang e Weaver, 2001).

Um outro fungo fitopatogênico da soja é o *Sclerotinia sclerotiorum*, causador da doença conhecida como podridão da haste. Nos EUA, a podridão da haste foi considerada em 1994 como sendo a segunda maior doença devastadora das plantações de soja. Kim e colaboradores (1999) avaliaram 18 genótipos de soja plantados no campo quanto a resistência a este fungo e analisaram o parentesco ancestral com outras linhagens já estudadas. Os pesquisadores observaram que os genótipos NKS19-90, Asgrow A2506, Colfax e Corsoy 79 possuíam os mais elevados níveis de resistência contra *Sclerotinia sclerotiorum* e, também, que aqueles genótipos que tinham parentesco com as linhagens Williams ou Asgrow A3127 apresentavam altos índices de severidade da doença.

Assim como a soja, outras espécies vegetais estão sendo exploradas na busca de possíveis compostos bioativos e, portanto, de novas fontes de resistência ao ataque de predadores e fitopatógenos.

2.2 - Resistência Vegetal x Fitófagos e Fitopatógenos Naturais (Insetos e Fungos)

2.2.1 - Insetos

Segundo os entomologistas, os insetos são considerados os maiores competidores do homem na busca pelos recursos disponíveis na natureza. Estes constituem os organismos mais diversificados da Terra, perfazendo aproximadamente 72% de todos os animais, sendo conhecidas e classificadas ao redor de 900.000 espécies (Gallo *et al.*, 1988). Ademais, tem sido estimado que a metade deles é composta por espécies fitófagas (Daly *et al.*, 1978).

Uma espécie bastante estudada é o gorgulho, *Callosobruchus maculatus*, sendo considerada a pior praga de armazenamento do feijão-de-corda. Este coleóptero passa pelas fases de ovo, larva, pupa e adulto, iniciando seu ataque ainda no campo e, posteriormente, durante a estocagem dos grãos, há penetração das larvas, que passarão a se alimentar dentro destes. Como consequência, pode ocorrer decréscimo na porcentagem de germinação das sementes, aumento de plântulas anormais e redução do vigor da planta (Santos e Quinderé, 1988). No caso de sementes para o plantio, o poder germinativo é muito afetado, chegando a provocar perdas volumosas em seis meses de armazenamento (Singh e Allen, 1980).

De maneira geral, a predação exercida pelos insetos sobre as plantações se sobressai quando comparada com todas as outras pragas, onerando perdas milionárias quanto ao rendimento e, portanto, produtividade final da cultura atacada. Uma cultura de relevado valor econômico excessivamente predada por uma gama das mais diferentes classes de insetos é a da soja (TABELA 1).

Os produtores, em geral, utilizam defensivos agrícolas na tentativa de devastar, ou mesmo atenuar, o ataque das pragas às plantações. Porém, o uso de tais defensivos gera resíduos tóxicos para o meio ambiente e, por conseguinte, para o homem, animais e todos os organismos que neste habitam.

TABELA 1 - Principais insetos-praga da soja e parte da planta agredida

Nome científico	Nome popular	Parte da planta agredida
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Lagarta-da-soja	Folhas
<i>Euschistus heros</i>	Percevejo marrom	Sementes
<i>Piezodorus guildinii</i>	Percevejo verde pequeno	Sementes
<i>Nezara viridula</i>	Percevejo verde	Sementes
<i>Sternechus subsignatus</i>	Tamanduá-da-soja	Hastes
<i>Scaptocoris castanea</i>	Percevejo-castanho-da-raíz	Raízes
<i>Maecolaspis calcarifera</i>	Vaquinha	Folhas
<i>Epinotia aporema</i>	Broca-das-axilas	Folhas; Vagens
<i>Diabrotica speciosa</i>	Patriota	Folhas; Raízes
<i>Aracanthus mourei</i>	Torrãozinho	Folhas; Cotilédones

Fonte: EMBRAPA Soja (<http://www.embrapa.gov.br>).

Pensando nisso, foi que surgiram as técnicas de melhoramento genético permitindo, assim, que culturas se tornassem resistentes ao ataque de pragas devido à expressão de genes de resistência anteriormente inexistentes. Este foi um grande avanço científico, ressaltando a importância da biotecnologia para os olhos do mundo. Desde então, genes expressando principalmente compostos protéicos têm sido transferidos para as mais diversas espécies vegetais através de técnicas moleculares consideradas não poluidoras do meio ambiente.

Os genes transferidos para as plantas expressam os chamados bioinseticidas, que são compostos do tipo toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), inibidores de proteases, inibidores de α -amilases, lectinas, arcelinas e proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs). Os cristais tóxicos (δ -endotoxinas) de *B. thuringiensis* foram as primeiras proteínas de comprovada ação inseticida, sendo expressas até hoje (Estruch *et al.*, 1997). A introdução de genes de resistência das toxinas Bt nas mais diversas culturas se revelou como o maior sucesso de aplicabilidade da tecnologia da engenharia genética na agricultura. As toxinas Bt são altamente ativas e específicas, conferindo um elevado grau de proteção contra uma espécie alvo, apesar da resistência cruzada para outras espécies ser baixa ou inexistente (Gatehouse, 2002).

Zhang e colaboradores (2000) estudaram o efeito da suplementação de δ -endotoxina com inibidor de proteinase de soja (STI) sobre larvas de *Helicoverpa armigera* e observaram que os dois fatores, atuando em sinergismo, causaram significativa redução do crescimento larval. Recentemente, Bobrowski e colaboradores (2002) caracterizaram duas novas linhagens de *B. thuringiensis* (UNI498 e UNI872) isoladas de solos do sul brasileiro, cujos resultados mostraram que as concentrações letais (CL₅₀) dos cristais tóxicos para larvas de *Anticarsia gemmatalis* foram 1,69 e 0,49 ng/cm², respectivamente.

Dentre os muitos metabólitos produzidos pelas plantas atuantes na defesa contra patógenos, as proteínas e peptídeos tóxicos têm sido extensivamente estudados, devido à sua utilização na biotecnologia vegetal. Proteínas entomotóxicas participam de um mecanismo de defesa natural em muitos órgãos de armazenamento das plantas, tais como raízes e sementes (Richardson, 1991).

Um exemplo de proteína entomotóxica é a canatoxina (CNTX), encontrada em sementes de feijão-de-porco, *Canavalia ensiformis* (Carlini e Guimarães, 1981). Esta proteína, comprovadamente tóxica para camundongos, mostrou-se letal quando ingerida por algumas espécies de insetos (*C. maculatus* e *Rhodnius prolixus*), não afetando a outras (*Manduca sexta*, *Schistocerca americana* e *Aedes aegypti*) (Carlini *et al.*, 1997). Posteriormente, foi observado que a CNTX é ativada proteoliticamente no trato gastrointestinal de insetos suscetíveis, tendo sido detectados peptídeos da CNTX no intestino médio e na hemolinfa de *R. prolixus* alimentados com a proteína (Ferreira da Silva *et al.*, 2000).

Os inibidores de proteases atuam inibindo a atividade de enzimas, tais como tripsina, quimotripsina e outras, reduzindo ou prevenindo a digestão dos nutrientes da dieta (Liener e Kakade, 1980). Além de agir sobre enzimas proteolíticas das sementes, os inibidores de proteases são expressos para responder ao ataque da planta por predadores inibindo suas enzimas digestivas (Ryan, 1989; Koiwa *et al.*, 1997), conferindo-lhes, dessa forma, um provável papel de defesa.

A descoberta de que muitos insetos predadores de plantas utilizam proteases cisteínicas para digerir a proteína da dieta possibilitou a exploração de genes codificadores de inibidores de proteases cisteínicas (CPIs) para o controle de insetos (Murdock *et al.*, 1987). Batatas transgênicas expressando orizacistatina I (OCI) causaram mortalidade acentuada de larvas do besouro da batata, *Leptinotarsa decemlineata*, que se alimentaram das folhas (Lecardonnell *et al.*, 1999).

Broadway e Calvin (1994), estudando o efeito dos inibidores de proteases de repolho sobre espécies da ordem Lepidoptera, verificaram a inibição da atividade proteolítica no ventrículo das larvas de *Plutella xylostella* (40-50%), *Trichoplusia ni*, *Lymantria dispar* e *Helicoverpa zea* (55-85%) por inibidores de proteases desta planta.

Recentemente, foi observado que um inibidor de tripsina isolado das sementes de *Dimorphandra mollis* (DMTI-II) exibiu atividade inseticida, produzindo

67% de mortalidade em larvas de *C. maculatus* quando incorporado em dietas artificiais a 1% (Macedo *et al.*, 2002).

Uma isoforma do inibidor de quimotripsina tipo Bowman-Birk (BBI) obtido de ervilha (PsTI-2) foi tóxica para o afídeo *Acyrtosiphon pisum*, exibindo CL_{50} de 48 μ M. Tais resultados demonstraram, pela primeira vez, que inibidores de quimotripsina tipo BBI podem atuar como agentes tóxicos contra afídeos sugadores de floema (Rahbé *et al.*, 2003).

Um grupo de proteínas entomotóxicas vastamente estudado é o das lectinas. Estas são definidas, de acordo com sua estrutura e funções de alguns genes, como qualquer proteína que possua pelo menos um domínio não-catalítico capaz de ligar-se, reversivelmente a mono- ou oligossacarídeos específicos (Peumans e Van Damme 1995; 1996). As lectinas, assim como os inibidores de proteases e outras moléculas defensivas, atuam na defesa do vegetal, mas quando necessário, as mesmas proteínas são fontes de energia para os processos de desenvolvimento e reprodução. Com o passar dos anos, ficou claro que as lectinas exercem dois papéis principais nas plantas: primeiro, elas são armazéns de proteínas que podem ser mobilizadas para o crescimento e desenvolvimento do vegetal; segundo, elas atuam na defesa do vegetal contra herbívoros e patógenos (Murdock e Shade, 2002). Tal proteção ocorre devido à sua capacidade de ligação a glicoconjugados e conseqüente desestabilização do metabolismo do fitófago exercendo, portanto, seu efeito deletério (Bandyopadhyay *et al.*, 2001).

Uma das aplicações em estudo para as lectinas vegetais é a de construção de plantas transgênicas expressando essas proteínas como bioinseticidas. Hilder e colaboradores (1993) demonstraram que lectinas de *Galanthus nivalis* (GNA) e *Allium sativum* (ASAL), específicas por manose, mostraram-se efetivas no controle de insetos predadores e não foram tóxicas para mamíferos e pássaros. Diante disso, muitas plantas já foram transformadas com o gene que codifica para a GNA: batata (*Solanum tuberosum*), arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum aestivum*) e fumo (*Nicotiana tabacum*). Em todos os casos, as plantas exibiram um grau de resistência elevado contra insetos que destas se alimentavam. A presença de

GNA em arroz transgênico no teor de 2,0% de proteína solúvel retardou o desenvolvimento de *Nilaparvata lugens* e inibiu sua ingestão (Rao *et al.*, 1998).

Existem evidências de que a ingestão crônica de lectinas por insetos pode causar uma hipertrofia intestinal. Tal fato foi observado em larvas da mosca do tomate (*Lacanobia olercea*), quando alimentadas por 16 dias com dietas contendo concanavalina A (Con A), uma lectina de sementes de *Canavalia ensiformis* (Fitches e Gatehouse, 1998). Estudos complementares demonstraram que a ingestão de batatas transgênicas expressando a Con A levou a um retardo no desenvolvimento e decréscimo no peso larval da mosca do tomate (Gatehouse *et al.*, 1999).

A ASAL foi capaz de ligar-se a receptores de membrana dos homópteros *Lypaphis erysimi* e *Dysdercus cingulatus*, reduzindo suas taxas de crescimento e sobrevivência. Os resultados mostram que a ASAL permaneceu estável no trato digestório dos animais revelando-se uma forte candidata a agente de controle contra o ataque das duas pragas testadas (Bandyopadhyay *et al.*, 2001).

Um potente sítio de ação lectínica é a matriz peritrófica, um envelope protetor secretado por células epidérmicas intestinais, que é composta por proteínas, glicoproteínas, quitina e glicosaminoglicanos. A ingestão de WGA (lectina de trigo) pela larva de *Ostrinia nubilalis* causou anormalidades na estrutura de sua matriz peritrófica. A matriz, normalmente em camada única no intestino, tornou-se uma massa convoluta nos insetos alimentados com WGA. A malha formada de quitina foi rompida, formando grandes buracos na estrutura da matriz peritrófica (Harper *et al.*, 1998).

Acessos selvagens do feijão *Phaseolus vulgaris* são ricos em arcelinas, outro grupo de proteínas consideradas entomotóxicas. A propriedade inseticida das arcelinas contra bruquídeos é relevante, em particular os efeitos inibitórios sobre larvas de *Zabrotes subfasciatus* (Osborn *et al.*, 1988; Cardona *et al.*, 1990), uma das pragas mais importantes de feijões durante o armazenamento. O mecanismo de ação das arcelinas ainda é pouco conhecido, podendo exibir toxicidade (Osborn *et al.*, 1988), ou somente resistência à digestão, induzindo a desnutrição das larvas (Minney *et al.*, 1990).

Insetos que se alimentam de sementes durante a fase adulta e/ou larval possuem as α -amilases como as principais enzimas digestivas (Grossi de Sá e Chrispeels, 1997; Strobl *et al.*, 1998). Os inibidores de α -amilases, presentes em cereais e leguminosas, são, também, considerados entomotóxicos, despertando grande interesse como ferramenta para o desenvolvimento natural ou biotecnológico de plantas resistentes a insetos (Chrispeels *et al.*, 1998; Gatehouse e Gatehouse, 1998; Franco *et al.*, 2000; Valencia *et al.*, 2000). A expressão de genes de inibidores de α -amilases em sementes foi capaz de prevenir a infestação por bruquídeos, como o caruncho da ervilha (*Bruchus pisorum*), o caruncho do feijão-de-corda (*C. maculatus*) e o do feijão azuki (*C. chinensis*) (Schroeder *et al.*, 1995; Ishimoto e Chrispeels, 1996; Morton *et al.*, 2000).

As proteínas inativadoras de ribossomos (RIPs), inibidoras da síntese protéica, encontram-se amplamente difundidas na natureza, não possuindo, porém, papel fisiológico completamente elucidado. Resultados voltados para avaliação da atividade inseticida conferiram suporte para um provável papel de defesa contra o ataque de patógenos. RIPs de *Ricinus communis* e *Saponaria officinalis* quando oferecidas em dietas para duas espécies de coleópteros, *C. maculatus* e *Acanthocelides grandis* exibiram atividade inseticida (Gatehouse *et al.*, 1990; Ferreras *et al.*, 1993). Em 1996, Van Damme e colaboradores isolaram e caracterizaram uma RIP de *Sambucus nigra*, ninigrina b (SNA V), propondo que a associação da ninigrina b com uma RIP tipo 2, também presente nessa mesma espécie, era a base da grande resistência apresentada pela planta contra insetos fitófagos e animais herbívoros.

De maneira geral, as RIPs são encontradas apenas em alguns vegetais e em baixas concentrações. Tais fatos não descartam, porém, a importância de sua existência e possível atuação no vegetal, em conjunto com outros compostos, no combate diário aos predadores naturais.

2.2.2 - Fungos

Os fungos são organismos heterotróficos, desprovidos de clorofila, eucariotos, portadores de esporos, que vivem como parasitas ou como simbiontes em associação comensal com outros organismos. Estes podem chegar a perfazer 70-80% da biomassa microbiana dos solos ricos em matéria orgânica e de pH ácido (Siqueira e Franco, 1988; Menezes e Oliveira, 1993).

As estruturas somáticas são na maioria constituídas de filamentos ramificados, de forma e tamanho variáveis, de acordo com as espécies envolvidas. A parede celular dos filamentos tubulares contém quitina ou celulose. A maioria dos fungos é constituída de espécies saprófitas e muitas delas são benéficas às plantas, decompondo a matéria orgânica, tornando, então, os elementos disponíveis para estas (Menezes e Oliveira, 1993).

Os fungos do gênero *Cercospora* apresentam conidióforos pigmentados, simples e fasciculados e conidiosporos longos e septados, os quais ao serem destacados deixam cicatrizes nos conidióforos. Este gênero apresenta mais de 1800 espécies de importância econômica. *Cercospora sojina* é considerada uma das principais pragas das plantações de soja e causadora da doença foliar mancha de olho de rã, podendo atacar também as sementes. Atualmente, centros de pesquisa como a EMBRAPA desenvolvem genótipos resistentes a diversos fungos devastadores das plantações.

Para estudar a composição e arquitetura da parede celular de fungos, lectinas das mais variadas espécies vegetais têm sido pesquisadas quanto à sua capacidade de ligação aos polissacarídeos estruturais. As lectinas de soja (SBA) e amendoim (PNA) foram capazes de inibir a germinação de esporos de alguns fungos na concentração de 5 mg/ml (Barkai-Golan, 1978). Melo (2001) demonstrou que esporos dos fungos *Aspergillus niger*, *Colletotrichum lindemutianum* e *Fusarium solani*, incubados na presença da lectina de *Luetzelburgia auriculata* (LAL), tiveram seu crescimento inibido, quando comparado com o respectivo controle cultivado na presença de albumina sérica

bovina (BSA). A inibição foi traduzida a partir da quantidade de massa micelial produzida, medida em termos de absorbância a 630 nm. Os mecanismos de ação sugeridos para as lectinas sobre os fungos fitopatogênicos foram retardamento da germinação de esporos e/ou inibição do desenvolvimento de hifas jovens (Van Parijs *et al.*, 1992; Ciopraga *et al.*, 1999).

Além das lectinas um outro grupo de proteínas de comprovada ação antifúngica, descoberto há mais de duas décadas, é o dos peptídeos antimicrobianos. Eles se incluem em dois tipos de classes estruturais: peptídeos α -hélice (cecoprinas e magaininas) ou peptídeos folha- β (defensinas, protegrinas e taquiplesinas). Estes possuem um amplo espectro de ação tóxica agindo não somente em fungos, mas, também, em bactérias e vírus fitopatogênicos (Osusky *et al.*, 2000). Alguns destes peptídeos são derivados de precursores maiores constituídos de uma seqüência sinal. Tais peptídeos sofrem modificações pós-traducionais que incluem processamentos proteolíticos, glicosilação, amidação carboxi-terminal e halogenação. Exemplos destes peptídeos derivados de moléculas maiores são a buforina II da histona 2A (Kim *et al.*, 2000) e lactoferricina da lactoferrina (Ulvatne e Vorland, 2001).

Dois polipeptídeos ricos em cisteína isolados de sementes de ervilha (*P. sativum*) exibiram elevada atividade antifúngica contra *A. niger*. Estes dois novos peptídeos apresentaram similaridade de seqüência com algumas defensinas básicas ricas em cisteína (Almeida *et al.*, 2000).

Plantas de batata (*S. tuberosum*) foram transformadas para a expressão de um gene que codifica para um peptídeo antimicrobiano catiônico (MsrA1) de amplo espectro de ação. As batatas transformadas exibiram resistência contra os fungos *Phytophthora cactorum* e *F. solani*, assim como contra a bactéria *Erwinia carotovora*, crescendo normalmente, sem evidência alguma de infecção (Osusky *et al.*, 2000).

2.3 - Defesa Vegetal contra o Ataque de Patógenos e Atuação das Proteínas Relacionadas à Patogênese

A todo instante os vegetais são atacados pelos mais diversos organismos gerando situações negativas e, às vezes, positivas de relação planta-hospedeiro. Para defender-se do ataque das pragas e patógenos as plantas utilizam uma combinação de dois mecanismos básicos: os mecanismos que empregam barreiras físicas e os mediados por substâncias químicas. As defesas físicas são constituídas por pêlos, tricomas, espinhos e ceras, desempenhando um papel importante na defesa da planta contra a penetração de patógenos. As defesas químicas consistem de reações bioquímicas que ocorrem nas células e tecidos vegetais produzindo substâncias que, ou são tóxicas ao patógeno ou criam condições que detêm o seu desenvolvimento na planta. Dentre essas substâncias destacam-se aminoácidos não-protéicos, alcalóides, aminas, fenóis, saponinas, glicoproteínas, lectinas, RIPs, quitinases, glucanases, inibidores de proteases e amilases, alérgenos etc. (Bowles, 1990).

Em vários sistemas planta-hospedeiro, algumas substâncias sinalizadoras agem como elicitores para que haja o reconhecimento pela planta. Alguns destes sinais de transdução são proteínas-quinases, íons cálcio, fosforilases, fosfolipases, ATPases, peróxido de hidrogênio, etileno, ácido salicílico, ácido jasmônico, sistemina e outros. Uma vez que uma molécula vegetal entra em contato e reage com o elicitor do patógeno, assume-se que o vegetal "reconheceu" este patógeno. Após o reconhecimento, ocorrerá uma série de reações bioquímicas e mudanças estruturais nas células vegetais no intuito de defender-se de enzimas, toxinas e outras substâncias liberadas pelo patógeno (Datta e Muthukrishnan, 1999).

A proteção natural das plantas contra os patógenos se dá através de um efeito combinado de barreiras constitutivas e ativação de mecanismos de proteção denominados Resposta Hipersensitiva e Resistência Sistêmica Adquirida.

A resposta hipersensitiva compreende a morte rápida de um número limitado de células em contato direto com o organismo invasor. Ocorre ruptura dos vacúolos e liberação das enzimas levando a um retardo do processo invasivo, ou até mesmo a destruição do patógeno agressor. Enquanto que a RH impede, efetivamente, a invasão do patógeno no local e ao redor da lesão, a SAR torna toda a planta mais resistente a uma grande diversidade de microorganismos causadores de doenças (Van Loon e Van Strien, 1999). O termo Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) foi introduzido na literatura por Ross (1961), sendo descrito como um aumento na resistência após um subsequente ataque de um patógeno em partes inoculadas e não inoculadas do vegetal. SAR induzida por patógenos geralmente desenvolve-se após o surgimento de uma lesão necrótica ao redor do sítio de inoculação. Este suicídio celular localizado é denominado de Resposta Hipersensitiva (RH). SAR induzida por vírus causadores de necrose é desenvolvida em tecidos não infectados dois a três dias após a inoculação, permanece por semanas e oferece proteção contra diversos fungos, bactérias patogênicas e outros vírus (Van Loon e Van Strien, 1999).

Dentre as principais alterações decorrentes da RH está a produção de um grande número de proteínas solúveis que são conhecidas como Proteínas Relacionadas à Patogênese ou PR-Proteínas. Pode-se também verificar o acúmulo de fitoalexinas, compostos fenólicos e carboidratos estruturais como a calose (Stintzi *et al.*, 1993).

Uma questão levantada pelos pesquisadores foi a de como tecidos vegetais, distantes do sítio de infecção, adquiriam resistência já que as plantas não possuem um sistema circulatório para carrear compostos, assim como o homem. Ao invés disto, as plantas contam com moléculas sinalizadoras transmissíveis que, em baixas concentrações, podem ativar mecanismos de resistência em células não invadidas diretamente pelo patógeno ou atacadas por pragas. Tais sinalizadores moleculares são o ácido salicílico, ácido jasmônico, sistemina, etileno e outros, que são responsáveis pela indução da expressão das PR-Proteínas, podendo estar nas mais diversas partes do vegetal (Van Loon e Van Strien, 1999).

Algumas PR-Proteínas de fumo foram identificadas como quitinases e β -1,3-glucanases com forte atividade antifúngica (Van Loon e Van Strien, 1999). As quitinases e β -1,3-glucanases são enzimas líticas que hidrolisam a quitina e as β -1,3-glucanas, respectivamente, encontrando-se normalmente nas plantas (flores, folhas e raízes). Estas hidrolases atuam na defesa vegetal contra fungos predadores, já que a quitina e os β -1,3-glucanos são os principais constituintes da parede celular fúngica (Cheong *et al.*, 2000).

Estudos mostraram que um gene que codifica para uma β -1,3-glucanase de soja (SGN1) foi expresso tanto no desenvolvimento normal do vegetal, como em resposta ao ataque de patógenos, injúria e tratamento com elicitador. A expressão do gene SGN1 foi induzida em todos os tecidos após 4 dias de semeadura e, também, no tratamento com os fungos *Phytophthora* spp, *Pseudomonas syringae* e com o elicitador H₂O₂, todos sinalizadores relacionados à defesa do vegetal (Cheong *et al.*, 2000).

Atividade antifúngica também foi verificada em proteínas isoladas de outras espécies. A doliquina uma quitinase-like isolada de sementes de *Dolichos lablab* exibiu elevada atividade antifúngica contra *F. oxysporum*, *Rhizoctonia solani* e *Coprinus comatus*. Em paralelo, foi detectado que a doliquina foi capaz de inibir a transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (HIV), sendo, portanto, considerada a primeira quitinase-like a exibir atividade anti-HIV (Ye *et al.*, 2000). Lam e Ng (2001) isolaram de raízes de *Panax notoginseng* uma quitinase-like de 15 kDa capaz de inibir a atividade dos fungos *C. comatus*, *F. oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola*. O estudo da seqüência NH₂-terminal desta proteína revelou 73% de similaridade com as quitinases de *Arabis parishii* e *P. vulgaris*. Cruz e colaboradores (2002) isolaram da cera da carnaúba (*Copernicia cerifera*) duas frações enzimáticas, uma glucanásica e uma quitinásica, que exibiram forte atividade inibitória sobre o crescimento dos fungos *F. oxysporum*, *Saccharomyces cerevisiae*, *C. lindemutianum* e *C. musae*.

2.4 - Toxinas de Fontes Diversas

Compostos considerados tóxicos, de ação aguda, são encontrados nos mais diferentes organismos (vegetais, animais e microorganismos) exibindo variada toxicidade, dependendo da dose administrada.

Considerando apenas o reino vegetal, ressalta-se os alcalóides de plantas "venenosas", já que seus efeitos são conhecidos há vários séculos, particularmente devido ao poder alucinógeno de substâncias tais como a atropina, escopolamina e morfina. Enquanto que a atropina é valiosamente utilizada na oftalmologia, a escopolamina é uma potente neurotoxina causadora de convulsão, paralisia e até morte por parada respiratória. A morfina, assim como a codeína e tebaína, são substâncias analgésicas/alucinogênicas utilizadas no alívio da dor, encontradas na espécie *Papaver somniferum*. Todas estas substâncias podem exibir neurotoxicidade dependendo da dose utilizada, passando de drogas ativas para tóxicas. As mais importantes cardiotoxinas vegetais conhecidas são os glicosídeos digitálicos, encontrados em várias espécies do gênero *Digitalis* e empregados com critério na terapêutica de doenças cardíacas, já que 30 µg de cardiotoxina pode ser fatal para um adulto de meia idade. Exemplos de substâncias cardioativas são a digoxina, digitoxina e a gitoxina (Habermel, 1998).

Muitas plantas produzem alérgenos tipo a primina, sintetizada por espécies do gênero *Prímula*, responsáveis pela alergia primular. O indivíduo desenvolve processo alérgico após sensibilização, apresentando inflamação na pele, coceira e formação de bolhas que desaparecem com o passar dos dias (Habermel, 1998).

Em 1994, Vasconcelos e colaboradores isolaram a soyatoxina (SYTX), uma neurotoxina protéica de sementes de soja madura, obtidas comercialmente, tóxica para camundongos por via ip (DL₅₀ 7-8 mg/Kg de peso corpóreo). A SYTX produz dispnéia, paralisia flácida e convulsões tônico-clônicas que precedem a morte do animal. Além disto, esta toxina se mostrou letal para barbeiros (*R. prolixus*), induziu agregação e secreção plaquetária e estimulou a secreção de enzimas lisossomais por macrófagos. Recentemente, Vasconcelos e colaboradores (2001)

demonstraram que, além dos inibidores de tripsina (KSTI) e da lectina (SBA) presentes em sementes de soja, a SYTX foi capaz de induzir efeitos tóxicos bastante severos sobre o pâncreas de ratos, quando presente em dieta experimental.

Uma outra neurotoxina protéica presente em sementes de soja (genótipo BR-10), distinta da SYTX, foi isolada por Siebra (1998), tendo sido denominada de toxina da soja (SBTX). Esta toxina, por via i.p. ou i.v., foi tóxica para camundongos (DL_{50} $6,0 \pm 0,41$ e $5,6 \pm 0,23$ mg/Kg de peso corpóreo, respectivamente), produzindo dispnéia, convulsões tônico-clônicas e paralisia flácida que precederam a morte do animal. A SBTX está imunologicamente relacionada a SYTX e a CNTX.

Toxinas de algas também podem exibir elevada toxicidade para organismos que delas se alimentam. Dois exemplos são a yessotoxina (YTX) e homoyessotoxina (homoYTX), isoladas das algas *Protoceratium reticulatum* e *Mytilus galloprovincialis*. As duas toxinas, YTX e homoYTX, mostraram DL_{50} de 0,512 e 0,444 mg/Kg de peso corpóreo de camundongo, respectivamente. YTX e homoYTX exerceram efeito tóxico moderado no miocárdio e mucosa gástrica de camundongos, diferente do ácido okadaico que induz forte corrosão gástrica, hiperplasia epitelial e diarreia, sendo consideradas, portanto, de menor potencial tóxico (Tubaro *et al.*, 2003).

3. OBJETIVOS



3.1 - Gerais

Realização de um estudo bioquímico comparativo de três genótipos de soja geneticamente relacionados (BR-10 Teresina, Teresina RC e Teresina RCH), dando ênfase à presença de proteínas tóxicas. Caracterização físico-química da toxina da soja (SBTX) e avaliação de seu envolvimento na defesa da planta.

3.2 - Específicos

- Investigação das possíveis modificações de parâmetros bioquímicos que justifiquem as características de resistência e susceptibilidade ao fungo *Cercospora sojina* dos genótipos melhorados BR-10 Teresina, Teresina RC e Teresina RCH.
- Validação da modificação metodológica realizada para a otimização do processo de purificação da toxina da soja (SBTX).
- Caracterização físico-química da SBTX.
- Determinação do potencial anti-fúngico da SBTX sobre o desenvolvimento do patógeno *Cercospora sojina*.
- Avaliação da atividade inseticida de SBTX sobre os fitófagos *Callosobruchus maculatus* e *Dysdercus peruvianus*.
- Avaliação temporal e localização tecidual da SBTX durante a germinação.

4. MATERIAIS



4.1 - Sementes

Sementes quiescentes de soja (*Glycine max* L. Merrill), genótipos BR-10, Teresina-RC (TRC) e Teresina-RCH (TRC-H), foram fornecidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Teresina, Piauí. Os genótipos BR-10 e TRC apresentam resistência ao fungo fitopatogênico *Cercospora sojina*, causador da mancha de olho-de-rã, diferentemente do genótipo TRC-H que é suscetível a essa doença.

4.2 - Eritrócitos

Os eritrócitos utilizados nos ensaios de hemaglutinação foram obtidos a partir de amostras de sangue de coelho albino adulto (linhagem Nova Zelândia), mantido no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará (UFC).

4.3 - Animais de Experimentação

4.3.1 - Camundongos

Camundongos Swiss (*Mus musculus*), 20 a 25 g, foram obtidos de colônias do Biotério Central da UFC.

4.3.2 - Coelho

Coelho albino da raça Nova Zelândia, com 3 meses de idade, foi utilizado para imunização e posterior obtenção dos anticorpos policlonais anti-SBTX, genótipo BR-10. O animal foi adquirido no setor de cunicultura do Departamento de Zootecnia e mantido no biotério do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, ambos da UFC.

4.3.3 - *Callosobruchus maculatus*

Gorgulhos (*Callosobruchus maculatus*; Coleoptera: Bruchidae), insetos adultos, foram provenientes de colônias desenvolvidas no Laboratório de Citogenética, do Departamento de Biologia da UFC.

4.3.4 - *Dysdercus peruvianus*

Dysdercus peruvianus (Hemiptera: Pyrrhocoridae), insetos no 2º instar, foram provenientes de colônias mantidas no insetário do Departamento de Biofísica, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

4.4 - *Cercospora sojina*

Os fungos utilizados foram provenientes da coleção do Departamento de Fitopatologia, da Universidade Federal de Lavras, e mantidos na micoteca do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Biologia da UFC.

4.5 - Reagentes Químicos

Acrilamida, *N,N'*-metileno bisacrilamida, albumina sérica bovina, anticorpo de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina, *N*- α -benzoil-L-arginina-*p*-nitroanilida, "Coomassie Brilliant Blue" G e R, *p*-dimetilaminobenzaldeído, ditioneitol, inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (tipo I-S), *N,N,N',N'*-tetrametiletanolamina, glucuronidase (Tipo HP-2, 132.000 unidades/ml), guaiacol, laminarina, aglutinina da soja, IgG anti-aglutinina da soja, *p*-nitrofenil fosfato, membranas de difluoreto polivinilideno, *N*-acetil-D-glucosamina, nitro blue tetrazolium/3-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfato, urease e marcadores de massa molecular foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA.

β -mercaptoetanol e dodecil sulfato de sódio foram obtidos da Merck, Darmstadt, Alemanha.

As matrizes cromatográficas e os reagentes para análise automática de aminoácidos foram adquiridos da Pharmacia, Uppsala, Suécia.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

5. MÉTODOS



5.1 - Preparação da Farinha dos Genótipos BR-10, TRC e TRC-H

5.1.1 - Obtenção da Farinha

Para obtenção da farinha fina, sementes quiescentes dos três genótipos de soja (BR-10, TRC e TRC-H) foram, primeiramente, trituradas em liquidificador e, em seguida, em moinho elétrico para café. As farinhas foram acondicionadas em frascos hermeticamente fechados e conservadas a 4 °C.

5.1.2 - Delipidação da Farinha

Amostras das farinhas dos diferentes genótipos foram delipidadas usando-se éter de petróleo, na proporção de 1:10 (p/v), sob exaustão de capela à temperatura ambiente (20°C), até a completa remoção dos lipídios. As farinhas delipidadas foram deixadas sobre papel de filtro, à temperatura ambiente, até a evaporação total do solvente. Uma vez delipidadas, as farinhas foram acondicionadas em frascos hermeticamente fechados e conservadas a 4 °C.

5.2 - Análise Comparativa dos Genótipos BR-10, TRC e TRC-H

5.2.1 - Composição Centesimal

Determinação do Teor de Umidade

Amostras contendo cerca de 2 g das diferentes farinhas foram pesadas em frascos secos e tarados, os quais foram colocados em estufa a 100 °C, por 24 h. Decorrido esse tempo, os pesa-filtros contendo as amostras secas foram colocados em um dessecador e deixados até que a temperatura ambiente fosse atingida, sendo, então, pesados e levados à estufa por mais 12 h. Este procedimento foi repetido sucessivamente até a obtenção de pesos constantes. O teor de umidade foi determinado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo o valor expresso em percentagem.

Determinação do Teor de Cinza

Cadinhos de porcelana previamente aquecidos a 600 °C, por 2 h, e tarados, foram utilizados na determinação do teor de cinzas. Amostras contendo cerca de 2 g das diferentes farinhas foram levadas à mufla (600 °C), por aproximadamente 4 h, para que toda a matéria orgânica fosse incinerada. Posteriormente, os cadinhos foram transferidos para um dessecador e deixados até que a temperatura ambiente fosse atingida sendo, então, pesados. O teor de cinzas foi determinado pela diferença entre os pesos inicial e final das amostras, sendo o conteúdo expresso em percentagem.

Determinação do Teor de Proteína Total

Os teores de proteína das farinhas foram determinados pelo método de Kjeldahl, adaptado para medida do nitrogênio através do ensaio colorimétrico

descrito por Baethgen e Alley (1989). Tubos de mineralização, contendo cerca de 20 mg das diferentes farinhas, 1,1 g de catalisador (K_2SO_4 , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ e selênio, na proporção de 100:10:1) e 1,5 ml de ácido sulfúrico concentrado, foram levados ao digestor, por 2 h, tempo suficiente para a completa digestão das amostras. As amostras digeridas foram diluídas para 10 ml em água grau milli-Q e alíquotas desse material foram utilizadas para determinação do teor de nitrogênio total através das leituras das absorbâncias a 650 nm. O teor de N foi calculado através de uma curva padrão obtida com sulfato de amônio. A proteína total foi determinada a partir da multiplicação do valor de nitrogênio pelo fator 6,25.

Determinação do Teor de Lipídio Total

O teor de lipídio total foi determinado segundo a metodologia descrita por Triebold (1946), usando-se n-hexana como solvente. Cartuchos de papel de filtro, contendo cerca de 2 g das diferentes farinhas, foram colocados em contato com n-hexana por 8 h, em extratores de Soxhlet acoplados a balões desengordurados, secos e tarados. Passado o tempo de extração, o solvente foi evaporado em banho-maria a 70 °C e os balões, em seguida, deixados em estufa a 100 °C, até a obtenção de pesos constantes. O lipídio total foi calculado pela diferença dos pesos inicial e final dos balões, sendo os valores expressos em percentagem.

5.2.2 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (PAGE)

Os perfis eletroforéticos das farinhas de BR-10, TRC e TRC-H foram analisados segundo Laemmli (1970), sendo a técnica adaptada para o uso de placas medindo 10,0 x 8,0 cm. O gel de aplicação encerrava 3,5% de acrilamida e 1,0% de SDS preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e o de separação

17,5% de acrilamida e 1,0% de SDS em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8. As farinhas (1 mg/ml) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1,0%, na presença de β -mercaptoetanol 1,0%, aquecidas a 100 °C por 10 minutos e centrifugadas a 10.000 x g, 5 minutos, 10 °C. Aos sobrenadantes foram acrescentados cristais de sacarose e azul de bromofenol a fim de conferir densidade e cor às amostras, respectivamente. Alíquotas encerrando 20 μ l das amostras foram aplicadas no gel, sendo este submetido a uma corrente de 20 mA, durante 1 h. As bandas protéicas foram visualizadas por coramento com "Coomassie Brilliant Blue" R-250 0,05% dissolvido em uma solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0 v/v/v), por um período de 2 h. Em seguida, foi feito o descoramento do gel com solução de metanol, ácido acético e água (1,0:3,5:8,0 v/v/v). Como marcadores de massa molecular foram usadas as proteínas albumina sérica bovina (67,0 kDa), albumina do ovo (45,0 kDa), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36,0 kDa), anidrase carbônica bovina (29,0 kDa), tripsinogênio de pâncreas bovino (24,0 kDa), inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,2 kDa).

5.2.3 - Composição em Aminoácidos

Para a análise da composição em aminoácidos, foram utilizadas farinhas delipidadas das sementes de BR-10, TRC e TRC-H em Sistema Biocrom 20 (Pharmacia-LKB). Amostras encerrando 10 mg de farinha foram hidrolisadas com 1 ml de HCl 6 N contendo fenol a 1% (p/v), em ampolas de vidro, seladas sob atmosfera de nitrogênio. As ampolas foram levadas para estufa a 100 °C, por 22 h, e, após a hidrólise, abertas para remoção do HCl e fenol sob pressão reduzida, em presença de NaOH. A seguir, os resíduos foram lavados com água, secados sob pressão reduzida em presença de P₂O₅, redissolvidos em tampão citrato de sódio, pH 2,2, filtrados em membranas "millipore" 0,22 μ m e submetidos à análise

de aminoácidos. O conteúdo aminoacídico foi determinado pelo método de Spackman *et al.* (1958), sendo este adaptado para o uso do sistema Biochrom 20.

5.2.4 - Extração e Determinação de Proteína

O esquema de extração das proteínas solúveis, presentes nas farinhas dos genótipos BR-10, TRC e TRC-H, está mostrado na FIGURA 2. A farinha delipidada dos diferentes genótipos foi posta em contato com o tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, na proporção de 1:5 (p/v), contendo ditioneitol (DTT) 5 mM, deixada sob agitação contínua por 3 h, 4 °C, sendo, em seguida, filtrada em pano de trama fina. O resíduo obtido foi re-extraído nas mesmas condições anteriores. Os filtrados foram reunidos e centrifugados a 15.000 x g, 25 minutos, 4 °C, o precipitado foi descartado e o sobrenadante obtido denominado de Extrato Total. Este foi filtrado em papel de filtro, dialisado ("cut-off" MW 12.000) contra tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e, então, adicionado DTT 5 mM.

Para determinação do teor de proteínas, foi utilizada a metodologia descrita por Bradford (1976). A 100 µl de amostra, em diferentes concentrações, foram adicionados 2,5 ml do reagente de Bradford. A mistura foi agitada e após 10 minutos em repouso foram feitas leituras de absorbância a 595 nm (espectrofotômetro tipo Novapesc II, Pharmacia). A concentração protéica foi estimada através de uma curva padrão obtida a partir de concentrações conhecidas de BSA.

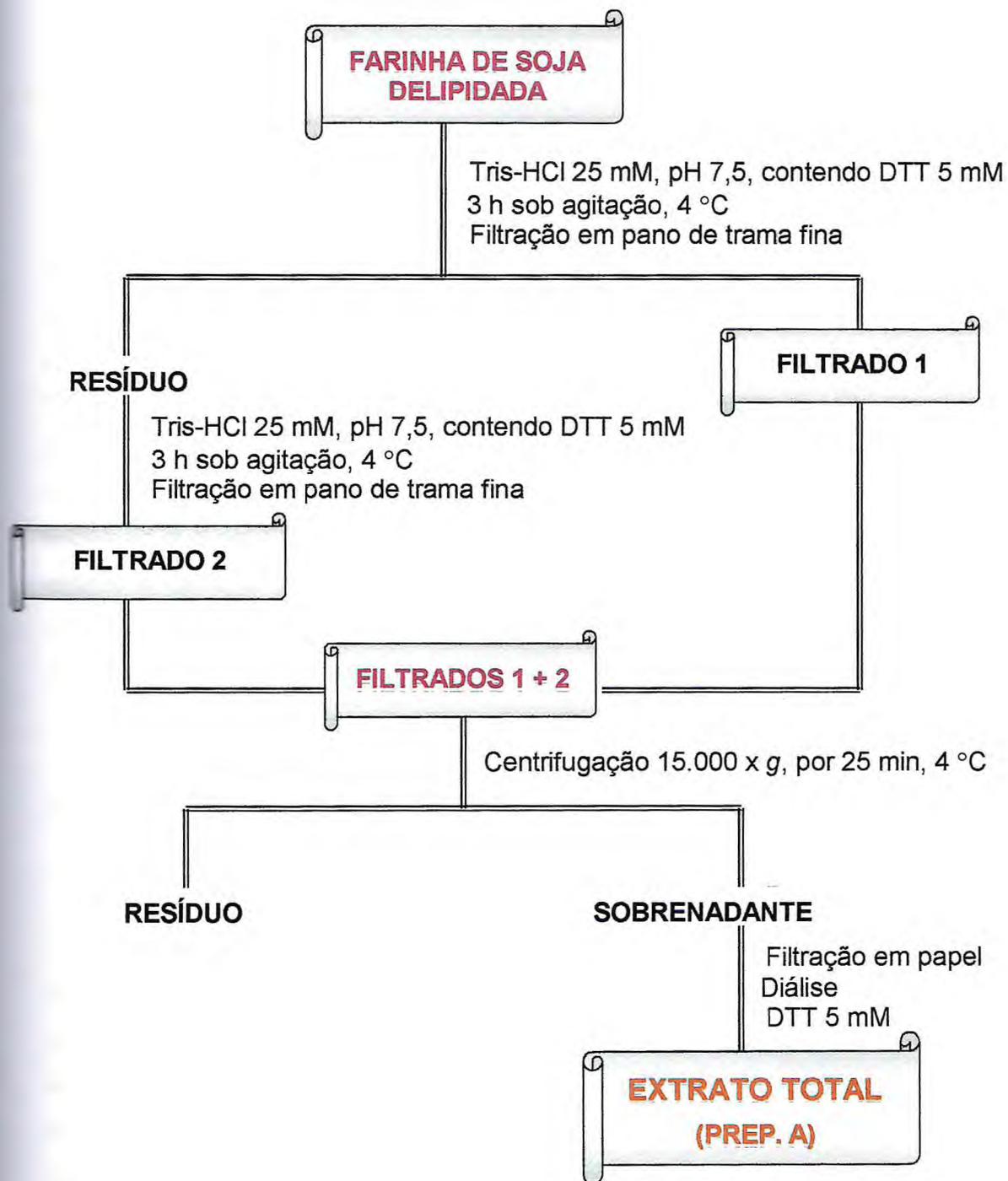


FIGURA 2 - Esquema de obtenção do extrato total.

5.2.5 - Detecção e Quantificação de Fatores Tóxicos e/ou Antinutricionais

Toxina

Para avaliação de toxicidade da SBTX, através das vias intraperitoneal (i.p.) e intravenosa (i.v.), foram usados camundongos Swiss, pesando entre 20-25 g, alimentados *ad libitum* com dieta peletizada comercial. Diferentes teores de proteína foram testados de modo a encontrar a dose máxima não letal, a dose mínima capaz de causar 100% de letalidade e doses intermediárias envolvendo percentuais de morte no intervalo de 0-100%. Para toxicidade via i.p., foram considerados válidos apenas os resultados observados no período de 24 h, enquanto que aquela avaliada por via i.v. até 1 h de administração. A toxicidade foi expressa como DL₅₀, sendo uma unidade considerada como a quantidade de proteína (mg de proteína/Kg de peso corpóreo) necessária para produzir convulsões e morte em 50% dos animais testados (Vasconcelos *et al.*, 1994).

Inibidor de Tripsina

A determinação do teor de inibidores de tripsina foi realizada conforme o método originalmente descrito por Kakade, com pequenas modificações (Hamerstrand *et al.*, 1981). As diferentes farinhas delipidadas (20 mg) foram suspensas em 1 ml de NaOH 0,01 N, mantidas sob agitação constante por 3 h à temperatura ambiente e, em seguida, em repouso por 30 min. Após isso, foram retiradas alíquotas de 0,5 ml dos sobrenadantes, e estas misturadas com 0,5 ml de NaOH 0,01N e estas soluções centrifugadas a 14.000 x g, por 5 minutos. Após centrifugação, alíquotas de 0,1 ml das diferentes amostras foram retiradas e incubadas em meio de reação que consistia de 1,6 ml Tris-HCl 0,05 M, pH 8,2,

contendo CaCl_2 0,02 M, 0,1 ml de tripsina (solução estoque de 0,4 mg em 10 ml de HCl 0,001 N) e 0,1 ml do substrato BAPNA. A mistura foi incubada a 37 °C, por 45 minutos. A reação foi interrompida com 0,2 ml de uma solução de ácido acético a 30% (v/v) e a leitura feita a 410 nm. Os resultados foram calculados considerando a curva padrão obtida com inibidor de tripsina da soja (padrão) e expressos como a quantidade em mg de tripsina inibida por g de farinha.

Urease

A determinação da atividade ureásica foi realizada segundo metodologia descrita por Kaplan (1969), com algumas modificações (Vasconcelos *et al.*, 1997). Alíquota de 0,1 ml de uma solução de uréia 0,5 M foi misturada com 0,7 ml de EDTA 2%, tamponado com fosfato de potássio 0,2 M, pH 6,5. Após adição de 0,2 ml dos diferentes extratos brutos (preparados com tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0, contendo NaCl 0,15 M, usando o mesmo protocolo previamente descrito), as misturas foram incubadas a 37 °C, por 15 minutos. A seguir, foram adicionados à mistura 1 ml da solução A (62 g de fenol + 0,25 g de nitroprussiato de sódio/l) e 1 ml da solução B (43 ml de hipoclorito de sódio 5,25% + 20 g de hidróxido de sódio/l), sendo, então, deixada a 37 °C, por mais 5 minutos. Transcorrido este tempo, 7 ml de água deionizada foram adicionados aos tubos, sendo estes cobertos com parafilme e agitados vigorosamente. As leituras das absorbâncias foram feitas a 625 nm e a atividade enzimática foi avaliada em relação à uma curva padrão obtida com urease comercial (Sigma 41H7008 - 870.000 U/g).

Lectina

Para detecção e dosagem de lectina, foi empregada a técnica de hemaglutinação segundo metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977), com algumas modificações (Vasconcelos *et al.*, 1991). As amostras a serem dosadas foram submetidas a diluições seriadas em tubos de ensaio, na presença de NaCl 0,15 M (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 etc). A 0,25 ml de cada diluição, foi adicionado igual volume de uma suspensão de hemácias (2%), tratadas ou não com enzimas proteolíticas. Os tubos foram incubados a 37 °C, 30 minutos, deixados em repouso por mais 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugados a 3.000 x g, 30 segundos, temperatura ambiente. A visualização dos aglutinados foi feita a olho nu e os resultados foram expressos em unidade de hemaglutinação (UH), definida como o inverso da maior diluição da amostra ainda capaz de aglutinar hemácias. A técnica utilizada para tratamento enzimático dos eritrócitos foi a descrita por Lis & Sharon (1972). Inicialmente, amostras contendo 1 ml de sangue foram lavadas três vezes com NaCl 0,15 M e, em seguida, as enzimas (tripsina, papaína, bromelaína ou subtilisina) adicionadas na proporção de 0,1 mg de enzima para 10 ml da suspensão de eritrócitos 2% . Essa suspensão foi incubada por 1 hora, 4 °C, sob agitação ocasional e centrifugada a 3.000 x g, 5 minutos. Os eritrócitos tratados foram novamente lavados com NaCl 0,15 M (6 vezes) e o "pellet" de células resultante suspenso em um volume de NaCl 0,15 M, suficiente para obtenção de hemácias a 2%.

5.2.6 - Detecção e Dosagem de Proteínas Relacionadas à Patogênese (PR-Proteínas)

Preparação dos Extratos Protéicos

Para as determinações das atividades enzimáticas, o extrato protéico total das diferentes farinhas foi preparado segundo a metodologia previamente descrita no item 5.2.4 e esquema de extração mostrado na FIGURA 2. Os extratos totais obtidos foram exaustivamente dialisados contra tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 1 M sendo, então, denominados extratos totais ácidos. Esses foram estocados a -20°C para as análises enzimáticas posteriores.

Atividade Quitinásica [CHI E.C. 3.2.1.14]

As atividades endo- e exoquitinolíticas foram determinadas segundo o método colorimétrico descrito por Boller (1993), usando como parâmetro a liberação de *N*-acetil-D-glucosamina a partir da ação hidrolítica das enzimas sobre a quitina coloidal. Inicialmente, a atividade quitinolítica total foi determinada por incubação de 250 µl do extrato total ácido com 250 µl da quitina coloidal (Boller, 1992), a 37 °C, durante 2 h e, em seguida, fervidos em banho-maria por 5 minutos. Os tubos, após resfriamento, foram centrifugados a 10.000 x g, 25 °C, por 10 minutos, e alíquotas de 300 µl foram retiradas e incubadas com 10 µl da solução de glucuronidase (EC 3.2.1.31), a 37 °C, por 1 h. A solução de glucuronidase usada nos ensaios foi preparada por diálise da preparação bruta de *Helix pomatia* (Tipo HP-2, 132.000 unidades/ml) com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, e diluição (10 vezes) com o mesmo tampão de reação. Nas atividades exoquitinolíticas, apenas 250 µl do extrato total foram incubados com 250 µl da quitina coloidal, a 37 °C, por 2 h e, após esse tempo, os tubos foram fervidos por 5 minutos. Para avaliar a liberação de NAG, em ambos os ensaios, 310 µl do hidrolisado foram misturados com 190 µl de acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, e 100 µl de tetraborato de sódio e potássio 0,6 M. Os tubos foram novamente

fervidos por 5 minutos, resfriados e a estes acrescentados uma solução de *p*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB), preparada dissolvendo-se 10,0 g de DMAB em 100 ml de ácido acético glacial contendo 12,5% (v/v) de ácido clorídrico 11,5 M. As leituras de absorvância foram realizadas a 585 nm. Para o cálculo da quantidade de açúcar liberado na reação foi utilizada uma curva padrão construída com concentrações variadas (100 a 500 μ M) de *N*-acetil-D-glucosamina (Reissig *et al.*, 1955). A atividade quitinolítica foi expressa em nKat/mgP, onde 1 nKat equivale a 1 mol de *N*-acetil-D-glucosamina liberado por segundo.

Atividade β -1,3-Glucanásica [GLU E.C. 3.2.1.6]

A atividade β -1,3-glucanásica foi determinada através da liberação de glucose a partir da laminarina usada como substrato (Boller, 1993). Primeiramente a solução de laminarina (2 mg/ml), diluída em tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, foi aquecida a 60 °C, por 10 minutos, e exaustivamente dialisada contra o mesmo tampão para remoção de glucose livre. Alíquotas de 100 μ l dos diferentes extratos totais ácidos foram incubadas com 900 μ l da solução de laminarina, a 50 °C, por 30 minutos. Em seguida, foi adicionado 1,0 ml da solução "D" (1,0 ml da solução "B" + 25,0 ml da solução "A") e a mistura incubada a 100 °C, por 20 minutos. As composições das soluções "A" e "B" foram, respectivamente, 25,0 g de carbonato de sódio anidro + 25,0 g de tartarato de sódio e potássio + 20,0 g de bicarbonato de sódio + 200 g de sulfato de sódio anidro + água q.s.p. 1 l e 15,0 g de sulfato de cobre hidratado + 20 μ l de ácido sulfúrico concentrado + água q.s.p. 100 ml. Após resfriamento dos tubos, foi adicionado 1,0 ml da solução "C" (3,0 g de arseniato de sódio + água grau milli-Q q.s.p. 25,0 ml), e estes agitados até a completa remoção de gases sendo, então, deixados em repouso por 5 minutos. As leituras de absorvância foram feitas a 520 nm. Para cálculo da quantidade de açúcar liberado na reação, foi utilizada uma curva padrão construída a partir de concentrações variadas de glucose (7,5 a 240 μ g/ml), preparadas em tampão

acetato de sódio, 50 mM, pH 5,2. A atividade β -1-3-glucanásica foi expressa em nKat/mgP, onde 1 nKat equivale a 1 mol de glucose liberado por segundo.

Atividade Peroxidásica [POX E.C. 1.11.1.7]

Para detecção e dosagem da atividade peroxidásica, foi empregada a metodologia descrita por Urbanek *et al.* (1991). Nesses ensaios, foram utilizados guaiacol e peróxido de hidrogênio como substratos doadores e receptores de prótons, respectivamente. O peróxido de hidrogênio participa da reação produzindo um composto colorido, 3,3'-dimetoxi-4,4'-bifenolquinona (Doerge *et al.*, 1997), mensurado por espectrofotometria. Na mistura reacional, foram utilizadas alíquotas de 25,0 μ l dos diferentes extratos totais ácidos, acrescidas de 975,0 μ l de tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, contendo NaCl 1 M, 500 μ l de guaiacol 0,02 M e 500 μ l de peróxido de hidrogênio 0,06 M. Essa mistura foi incubada a 30 °C, por 10 minutos, sendo, em seguida, feita leitura de sua absorbância a 480 nm (espectrofotômetro tipo Novaspec II da Pharmacia). A atividade peroxidásica foi expressa em UAP/mgP, onde a variação de uma unidade de absorbância por minuto foi assumida como uma unidade de atividade peroxidásica (1 UAP).

5.3 - Purificação da Toxina da Soja (SBTX)

5.3.1 - Extração e Purificação da SBTX

As etapas iniciais para a extração da SBTX, a partir de farinha delipidada de sementes do genótipo BR-10, foram similares àquelas do esquema empregado

por Siebra (1998) sendo mostradas na FIGURA 2. A partir da obtenção do extrato total, denominado PREP. A, foram feitas precipitações protéicas nas faixas de 0-20, 20-55, 55-85% de saturação com sulfato de amônio sólido. Essas frações foram exaustivamente dialisadas contra Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM, sendo verificado que, praticamente, toda a atividade tóxica estava concentrada na fração protéica 20-55% (via i.p. em camundongos). A fração tóxica 20-55% foi denominada de PREP. B, sendo, posteriormente, utilizada nas etapas subseqüentes de purificação da toxina (FIGURA 3).

5.3.2 - Cromatografias

Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de DEAE-Celulose

Alíquotas do PREP. B (600 mgP) foram aplicadas em coluna de DEAE-Celulose (38,0 x 1,6 cm), previamente equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM. Em seguida, a coluna foi percolada com o mesmo tampão de equilíbrio até que as proteínas não retidas (PREP. C-Ia e C-Ib) fossem completamente removidas. A eluição das proteínas retidas foi efetuada com o tampão de equilíbrio contendo NaCl 1 M (PREP. C-II). O fluxo utilizado foi de 40 ml/h e frações de 2,2 ml foram coletadas, a 4 °C (coletor Pharmacia LKB FRAC-100). A cromatografia foi monitorada através de leituras a 280 nm. Logo após, DTT foi adicionado a cada fração para uma concentração final de 5 mM. Ao final do processo, a toxicidade para camundongos foi avaliada pelas vias i.p. e i.v.

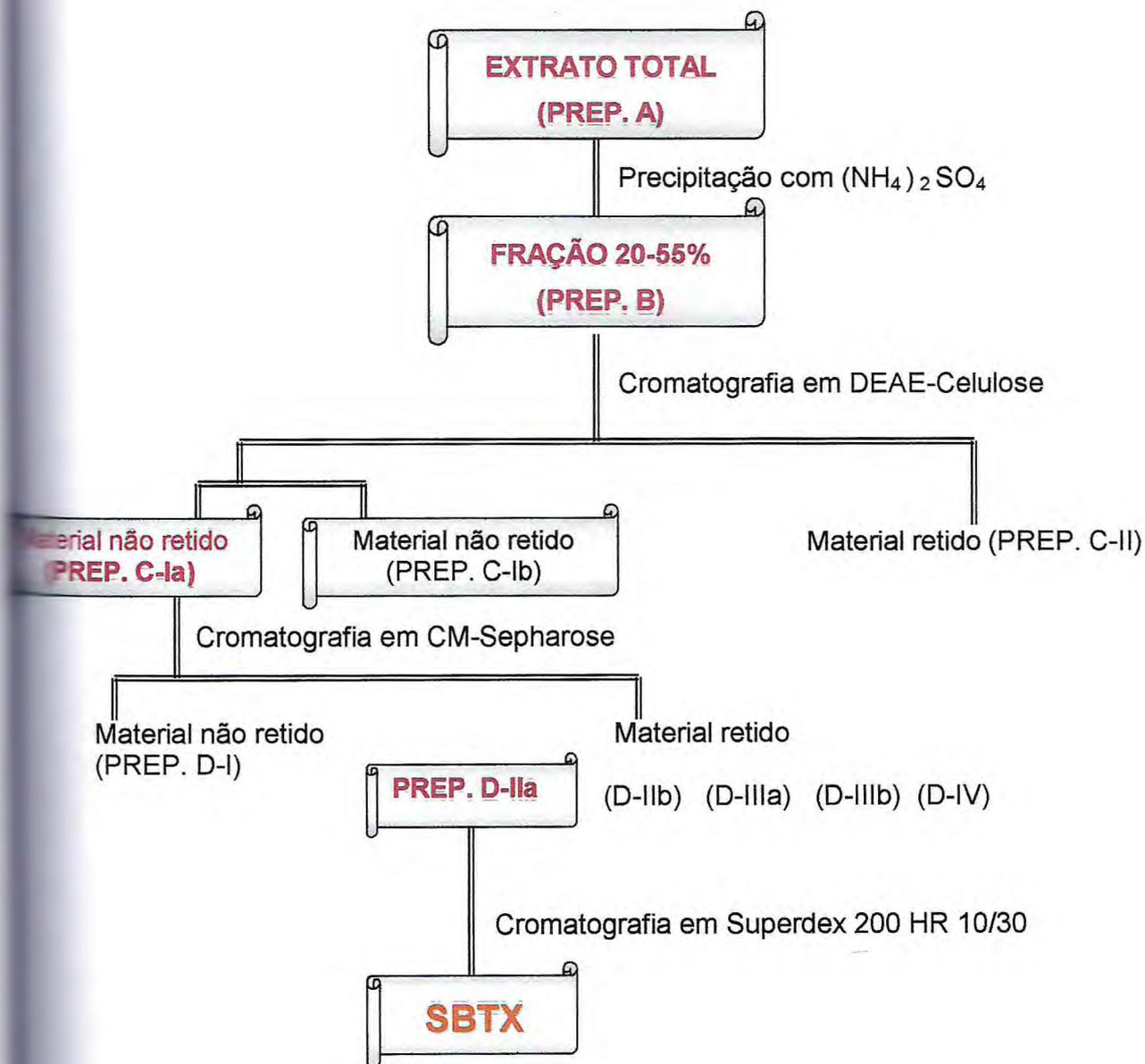


FIGURA 3 - Esquema geral de purificação da toxina da soja (SBTX).

Cromatografia de Troca Iônica em Coluna de CM-Sepharose

O material tóxico não retido (PREP. CI-a) foi concentrado com sulfato de amônio sólido a 100% de saturação e centrifugado a 15.000 x g, por 25 minutos, a 4 °C. O precipitado obtido foi ressuspendido em Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM, e dialisado exaustivamente contra o referido tampão. Alíquotas do PREP. CI-a (100 mgP) foram aplicadas em coluna de CM-Sepharose (38,0 x 1,6 cm), previamente equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM. Em seguida, a coluna foi percolada com o tampão de equilíbrio até que as proteínas não retidas (PREP. D-I) fossem completamente removidas. As proteínas retidas foram eluídas através da aplicação de concentrações crescentes de NaCl, em substituição ao uso do tampão de extração acrescido de NaCl 1M, conforme descrito por Siebra (1998). Para isso, tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo DTT 5 mM, foi aplicado contendo as seguintes concentrações de NaCl: 0,2 M (PREP. DII-a e PREP. DII-b); 0,3 M (PREP. D-IIIa e PREP. D-IIIb) e 0,5 M (PREP. D-IV). O fluxo utilizado foi de 40 ml/h e frações de 2,2 ml foram coletadas, a 4 °C (coletor Pharmacia LKB FRAC-100). As frações correspondentes ao PREP. DII-a foram reunidas, concentradas com sulfato de amônio a 100% de saturação e dialisadas contra o tampão de extração para utilização no passo cromatográfico seguinte. A cromatografia foi monitorada através de leituras a 280 nm. Logo após, DTT foi adicionado para uma concentração final de 5 mM. Ao final do processo, a toxicidade para camundongos foi avaliada pelas vias i.p. e i.v.

Cromatografia de Exclusão Molecular em Coluna de Superdex 200 HR 10/30

Alíquotas do PREP. DII-a (2 mg/ml), filtradas em membrana de 0,45 µm (Millipore), foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HR 10/30, equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5

contendo NaCl 0,5 M. O processo cromatográfico foi desenvolvido em sistema FPLC (coletor Pharmacia LKB FRAC-100), a um fluxo constante de 0,5 ml/h, sendo coletadas alíquotas de 2,0 ml/tubo. A cromatografia foi monitorada através de leituras de absorvância a 280 nm e 220 nm e, em seguida, DTT foi adicionado às frações a fim de resultar uma concentração final de 5 mM para, então, serem utilizadas nos ensaios de toxicidade.

5.4 - Caracterização Físico-Química da SBTX

5.4.1 - Determinação da Massa Molecular

Eletrforese em Gel de Poliacrilamida

O perfil eletroforético da SBTX foi analisado segundo a técnica de Laemmli (1970), adaptada para o uso de placas medindo 10,0 x 8,0 cm. O gel de aplicação continha 3,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e o de separação 17,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8. Amostras de SBTX foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1,0%, na ausência e presença de β -mercaptoetanol 1,0%. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C, por 10 minutos, e centrifugadas a 10000 x g, 5 minutos, a 10 °C. Aos sobrenadantes, foram acrescentados cristais de sacarose e azul de bromofenol a fim de conferir densidade e cor às amostras, respectivamente. Alíquotas encerrando 20 μ l das amostras de SBTX foram aplicadas no gel, o qual foi submetido a uma corrente de 20 mA, durante 1 h. As bandas protéicas foram visualizadas por revelação com Prata (Blum *et al.*, 1987). A metodologia utilizada consistiu de várias etapas e soluções: solução de fixação (metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,5

ml/l), solução de lavagem (etanol 50%), solução de pré-tratamento (tiosulfato de sódio 0,2 g/l), solução de impregnação (nitrato de prata 2 g/l e formaldeído 0,75 ml/l), solução de revelação (carbonato de sódio 60 g/l, formaldeído 0,5 ml/l e tiosulfato de sódio 0,2 g/l), solução de bloqueio da reação (metanol 50% e ácido acético 12%) e solução de enxague e acondicionamento (metanol 50%). Como marcadores de massa molecular foram usados: albumina sérica bovina (67,0 kDa), albumina do ovo (45,0 kDa), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36,0 kDa), anidrase carbônica bovina (29,0 kDa), tripsinogênio de pâncreas bovino (24,0 kDa), inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,2 kDa). Comparação das mobilidades das bandas protéicas da toxina em relação àquelas dos marcadores foi empregada para o cálculo da massa molecular aparente da proteína em análise.

Filtração em Gel

A massa molecular da SBTX foi, também, determinada por filtração em gel em coluna de Superdex 200 HR 10/30, previamente equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 contendo NaCl 0,5 M, seguindo o mesmo protocolo e condições do item 5.3.2.3. A coluna foi calibrada com os seguintes marcadores de massa molecular: albumina sérica bovina (67,0 kDa), ovalbumina (45,0 kDa), quimotripsinogênio (25,0 kDa), ribonuclease (13,7 kDa), citocromo C (12,0 kDa) e aprotinina (6,5 kDa). A massa molecular da SBTX foi calculada relacionando-se os volumes de eluição e massas moleculares dos marcadores com o volume de eluição da toxina.

Eletroforese Bidimensional

Para determinação do ponto isoelétrico, a toxina da soja foi submetida à eletroforese bidimensional utilizando um aparelho Multiphor II (Amersham Pharmacia Biotech), seguindo as instruções do fabricante e modificações feitas por Görg *et al* (2000). Na primeira parte do experimento, uma tira de gel do tipo "immobiline dry strip" (13 cm, pH 3-10) foi reidratada com 200 µl de uma solução de reidratação contendo a toxina (0,02 mgP/ml). A focalização isoelétrica (corrida de primeira dimensão) foi realizada de acordo com o seguinte programa: 1 h a 200 V, 1 h a 500 V, 1 h a 1000 V, 1 h a 2500 V e 3,5 h a 3500 V. Na segunda parte do experimento foi realizada a eletroforese em presença de SDS. Para a corrida em segunda dimensão foram utilizadas placas medindo 18,0 x 16,0 cm e gel de separação encerrando 12,5% de acrilamida. Depois de corrida a primeira dimensão, a tira de gel foi colocada em contato com o gel, sendo a segunda corrida realizada a uma corrente constante de 50 mA, por 6 h. Como marcadores de massa molecular foram usados: albumina sérica bovina (67,0 kDa), albumina do ovo (45,0 kDa), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (36,0 kDa), anidrase carbônica bovina (29,0 kDa), tripsinogênio de pâncreas bovino (24,0 kDa), inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz (20,1 kDa) e α -lactalbumina (14,2 kDa). O gel foi, então, revelado com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987) e os "spots" foram quantitativamente analisados através de medições segundo variação de pH da tira utilizada.

Espectrometria de Massa

A massa molecular da toxina da soja foi determinada pelo método de MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) em um aparelho BRUKER REFLEX™ TOF (Shimadzu). usando ácido α -ciano-cinâmico saturado como

matriz. A amostra (1 μ l), encerrando 5-25 pmol de proteína, foi misturada com igual volume de ácido 2,5-diidroxibenzoico 10 mg/ml (em etanol 10%), seca à temperatura ambiente e analisada por espectrometria de massa. O espectro de massa foi determinado sob uma voltagem de 20 kV.

5.4.2 - Determinação do Ponto Isoelétrico

Os experimentos de eletrofocalização foram desenvolvidos em um aparelho "Phast System" (Pharmacia-LKB Biotechnology), utilizando-se um gel pré-fabricado de poliacrilamida (*Phast gel*, Pharmacia), enriquecido com anfólitos formando um gradiente de pH com valores de 3,0 a 9,0. Foram aplicados cerca de 25 μ g da proteína tóxica solubilizada em NaCl 150 mM. A focalização isoeletrica foi realizada a 2000 V, 2,5 mA, a 20 °C, por 30 min. O gel foi revelado com nitrato de prata. O ponto isoeletrico (pI) da proteína tóxica foi determinado a partir de uma curva padrão obtida com os Rfs de marcadores de pI conhecidos.

Alternativamente, o pI da proteína tóxica foi determinado através da técnica de eletroforese bidimensional, como descrita anteriormente.

5.4.3 - Análise da Composição de Aminoácidos

A análise da composição de aminoácidos da SBTX foi conduzida em Sistema Biocrom 20 (Pharmacia-LKB). A amostra (1 mg) foi hidrolisada com HCl 6 N, em ampolas de vidro seladas, sob atmosfera de nitrogênio, a 100 °C, 24 h. O conteúdo de aminoácidos foi determinado pelo método de Spackman *et al.* (1958), sendo este adaptado para o uso do sistema Biochrom 20.

5.4.4 - Determinação da Seqüência de Aminoácidos NH₂-Terminal

A seqüência de aminoácidos NH₂-Terminal da toxina da soja foi determinada em seqüenciador automático de proteínas (Shimadzu PPSQ-10), no CENARGEN. Para tanto, uma amostra da toxina (2 mg/ml) foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (Laemmli, 1970) e, em seguida, eletrotransferida (sistema "trans blot", Multiphor II Pharmacia-LKB) para membrana de PVDF. A eletrotransferência foi conduzida a 70 V, 200 mA, 4 °C, por 1 h e 30 minutos. Ao término, a membrana foi corada com vermelho de Ponceau, para verificar a eficiência da transferência, lavada com água grau milli-Q e secada. A amostra foi recortada da membrana e submetida ao seqüenciamento. A seqüência obtida foi submetida ao alinhamento automático através do sistema NCBI-BLAST.

5.4.5 - Determinação do Espectro de Absorção

O espectro de absorção da SBTX foi determinado em espectrofotômetro Spectronic 7 (Pharmacia-LKB), usando cubeta de quartz de 1cm de caminho óptico. A SBTX (1mg) foi dissolvida em água grau milli-Q (1 ml), na presença e ausência de DTT 5mM, e a absorção verificada na região de 220 a 350 nm. O aparelho foi zerado com água nos diferentes comprimentos de onda analisados.

5.4.6 - Dosagem de Carboidratos

O conteúdo de carboidratos totais neutros da SBTX foi determinado pelo método fenol-sulfúrico descrito por Dubois *et al.* (1956), tendo glucose como açúcar padrão.

A natureza glicoprotéica da toxina foi confirmada por coloração pelo ácido periódico de Schiff, segundo protocolo do kit de detecção de glicoproteínas, fornecido pela Sigma Chemical Co., após a SBTX ter sido submetida à corrida eletroforética, seguindo o mesmo protocolo e condições utilizadas anteriormente (item 5.4.1). A visualização das bandas glicoprotéicas foi feita a olho nu, após a realização das etapas de coloração determinadas no procedimento de coloração.

5.5 - Caracterização Biológica da SBTX

5.5.1 - Detecção de Atividades Relacionadas à Defesa Vegetal

O ensaio de atividade hemaglutinante foi realizado seguindo a metodologia descrita por Moreira e Perrone (1977), com algumas modificações (Vasconcelos *et al.*, 1991).

A determinação de atividade inibidora de tripsina foi realizada seguindo-se o método originalmente descrito por Kakade, com pequenas modificações (Hamerstrand *et al.*, 1981).

A determinação da atividade ureásica foi realizada conforme descrito por Kaplan (1969), com algumas modificações (Vasconcelos *et al.*, 1997).

A detecção das atividades endo- e exoquitinásicas e β -1,3-glucanásica foram determinadas seguindo o mesmo protocolo e condições utilizados para as farinhas dos genótipos, de acordo com a metodologia descrita por Boller (1993).

A determinação de atividade peroxidásica foi realizada seguindo a mesma metodologia de Urbanek *et al.* (1991).

5.5.2 - Avaliação da Atividade Antifúngica

Ensaio em Placa e Discos Estéreis

O ensaio de atividade antifúngica das frações obtidas durante a purificação da SBTX contra *Cercospora sojina* foi realizado conforme metodologia descrita por Roberts e Selitrennikoff (1998) (FIGURA 5). No centro das placas de Petri (90 mm de diâmetro), contendo meio sólido ágar-batata, foram colocados *pellets* do fungo *C. sojina*. Em seguida, as placas foram incubadas à temperatura ambiente a fim de que o crescimento se efetuasse. Assim que a colônia atingiu 40 mm de diâmetro, discos de papel de filtro estéreis, de 6,0 mm de diâmetro, foram embebidos com 30 μ l dos diferentes preparados obtidos durante as etapas de purificação (10,0 mgP/ml) e com a SBTX (0,5 mgP/ml), sendo as amostras-testes esterilizadas em membrana de 0,22 μ m (Millipore). Os discos embebidos foram dispostos sobre o meio de cultura, com uma pinça estéril, e as placas novamente incubadas para que os fungos completassem o crescimento. A visualização de um "corte" na região de crescimento foi tomada como indicativo de inibição do desenvolvimento do fungo diante da amostras-teste.

Ensaio em Placa em Meio Sólido Perfurado

A detecção de atividade antifúngica das frações obtidas durante a purificação da SBTX contra *Cercospora sojina* foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Roberts e Selitrennikoff (1998) descrita anteriormente, salvo algumas modificações (FIGURA 5). No centro de placas de Petri (90 mm de diâmetro), contendo meio sólido ágar-batata, foram colocados *pellets* do fungo *C. sojina*. O meio solidificado foi circular e poços foram distribuídos na placa de forma

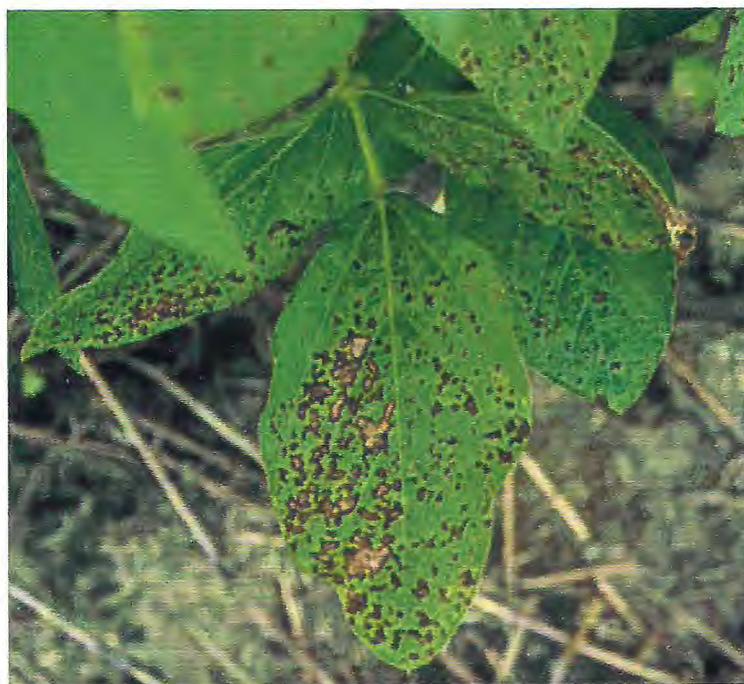
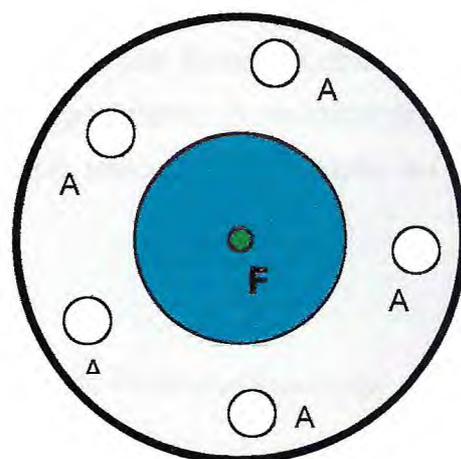
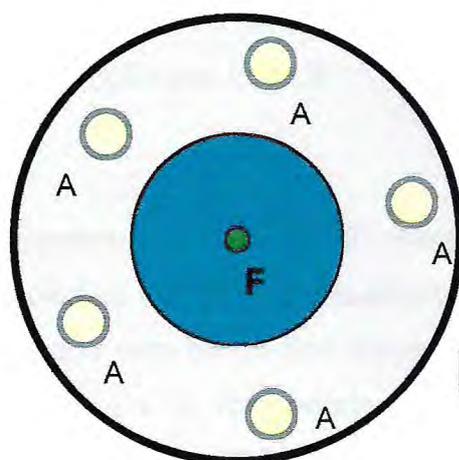
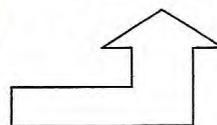


FIGURA 4 - Folhas de soja infectadas com *Cercospora soja* apresentando a doença mancha de olho-de-rã.



1 - Ensaio em placa de Petri com discos estéreis

- * F – fungo “pellet”
- * A – amostras em discos



2 - Ensaio em placa de Petri com meio sólido perfurado

- * F – fungo “pellet”
- * A – amostras nos poços

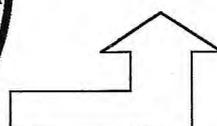


FIGURA 5 - Desenhos esquemáticos dos ensaios de avaliação da atividade antifúngica da SBTX contra o fungo *Cercospora sojina*.

eqüidistante. As placas foram incubadas à temperatura ambiente de modo que o crescimento do fungo se procedesse. Assim que a colônia atingiu 40 mm de diâmetro, alíquotas de 50 µl das amostras-testes (frações obtidas durante as diferentes etapas de purificação e SBTX) foram dispostas nos poços enumerados. Em seguida, as placas foram incubadas à temperatura ambiente para que se completasse o crescimento. A visualização de um "corte" na zona de crescimento foi tomada como indicativo de inibição do desenvolvimento do fungo diante da amostra teste.

5.5.3 - Avaliação do Potencial Inseticida

Dysdercus peruvianus (FIGURA 6)

Origem e Manutenção dos Insetos

D. peruvianus, insetos de 2º instar, utilizados nos experimentos foram obtidos de colônias mantidas em sementes de algodão, conservadas em potes plásticos vedados com tecido fino poroso. Os frascos foram acondicionados em insetário, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro e umidade relativa do ar em torno de 70-80%.

Preparação das Dietas

Sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.), livres de injúrias mecânicas e/ou contaminações microbianas, foram selecionadas, trituradas em liquidificador



FIGURA 6 - *Disdercus peruvianus*.

e, em seguida, em moinho elétrico para café, para obtenção de uma farinha fina (dieta padrão). SBTX, em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, foi misturada e homogeneizada à dieta padrão em tubos "eppendorf" nas concentrações de 0,02, 0,20 e 1,0%. As amostras foram secadas em "speed vacuum" a 10.000 x g, - 20 °C. Sementes artificiais foram preparadas em cápsulas de gelatina (100 mg) contendo as amostras mecanicamente prensadas. Cápsulas contendo apenas a farinha das sementes de algodão foram utilizadas como controle.

Ensaio Biológico

Para avaliação do potencial tóxico da SBTX (PREP. D-IIa) para *D. peruvianus* no 2º instar foram utilizados três grupos experimentais e um controle. Para cada grupo foram feitas 4 repetições, cada uma delas envolvendo 20 insetos e 3 sementes artificiais contendo a SBTX em diferentes concentrações ou apenas a farinha de algodão. Os insetos foram pesados durante o decorrer do período experimental. Ao final de 10 dias foram comparados o ganho de peso médio e o percentual de sobrevivência dos insetos. O teste de Tukey ($p < 0,05$) foi empregado para análise de variância e significância das médias.

Callosobruchus maculatus (FIGURA 7)

Origem e Manutenção dos Insetos

C. maculatus, insetos adultos, foram obtidos de genótipos comerciais de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], adquiridos em Fortaleza-CE. Os insetos foram mantidos em recipientes de vidro, contendo feijão-de-corda, e



FIGURA 7 - *Callosobruchus maculatus*.

vedados com tecido fino poroso. Os recipientes foram armazenados em câmara de crescimento tipo BOD, a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro e umidade relativa do ar em torno de 70-80% (FIGURA 8).

Preparação das Dietas

Sementes de feijão-de-corda foram trituradas em liquidificador e, em seguida, em moinho elétrico para café, para obtenção de uma farinha fina (dieta padrão). Para preparação das sementes artificiais foram utilizadas cápsulas de gelatina, contendo cerca de 800 mg de farinha prensada de feijão-de-corda. As dietas experimentais encerravam amostras liofilizadas dos PREP. A, B e CI-a, em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, misturadas à farinha de feijão-de-corda fina nas concentrações de 0,05, 0,25, 0,1, 0,5 e 1,0%. Sementes artificiais contendo somente a farinha de sementes de feijão-de-corda foram utilizadas como controle.

Ensaio Biológico

A avaliação da atividade inseticida do extrato total e das frações ricas em SBTX, em bioensaios com *Callosobruchus maculatus*, foi realizada através do uso de sementes artificiais preparadas com as dietas experimentais e com a dieta controle. O experimento teve início com a fecundação dos insetos fêmea pelos machos em recipientes de vidro contendo sementes de feijão-de-corda, nas condições ambientais já descritas. As fêmeas férteis foram colocadas em potes plásticos, em contato com as sementes artificiais para que ovopositassem sobre as cápsulas. Para cada grupo foram feitas 5 repetições, cada uma com 10 sementes artificiais. Após isso, os ovos de cada cápsula foram contados e os insetos emergidos das cápsulas diariamente contados e pesados. Ao final de 33

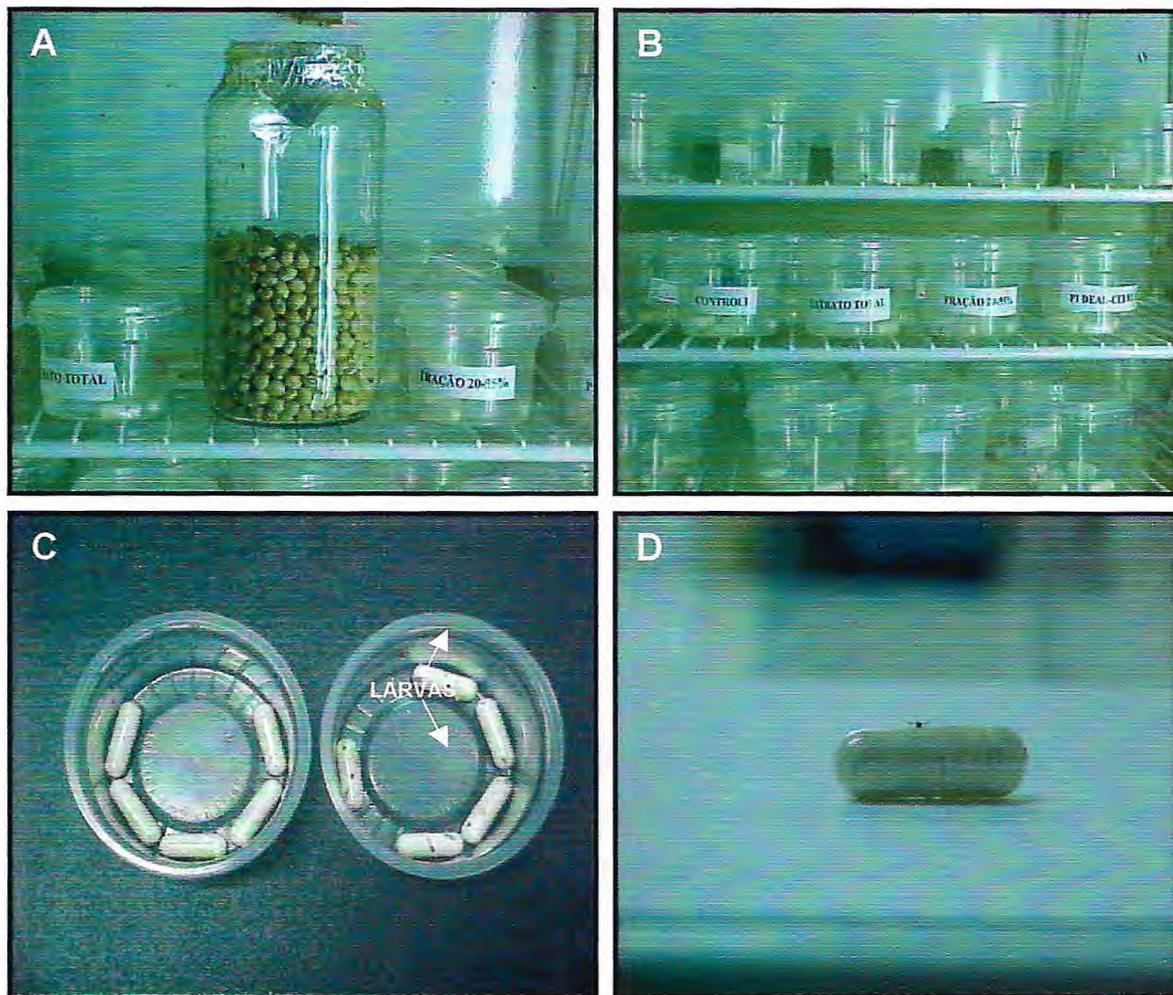


FIGURA 8 - Avaliação da atividade inseticida das diferentes frações protéicas obtidas durante o processo de purificação da SBTX para *Callosobruchus maculatus* (gorgulho). A) Fecundação das fêmeas; B) Acondicionamento e infestação das sementes artificiais; C) Cápsulas sem larvas (controle) e infestadas com larvas e D) Inseto adulto emergindo da cápsula infestada.

dias de experimento, os seguintes parâmetros foram avaliados: média de peso, percentual de emergência e tempo médio de desenvolvimento dos insetos. O teste de Tukey ($p < 0,05$) foi empregado para análise de variância e significância das médias.

5.6 - Avaliação Temporal e Localização Tecidual da SBTX Durante a Germinação

5.6.1 - Germinação das Sementes do Genótipo BR-10

Tratamento das Sementes

Sementes do genótipo BR-10, livres de injúrias mecânicas e/ou contaminações microbianas, foram selecionadas e tratadas com hipoclorito de sódio a 5%, por 5 minutos, e lavadas com água grau milli-Q, em 5 ciclos de 2 minutos.

Semeadura

O cultivo das plântulas de BR-10 foi realizado em câmara de fluxo laminar, através de semeadura das sementes em papel de germinação (germitest, 28,0 x 38,0 cm), pH neutro, previamente esterilizado em autoclave a $9,807 \times 10^4$ Pascal. 121°C . por 20 minutos (FIGURA 9). Todo o material utilizado (papéis, água, vidrarias) foi autoclavado sob as mesmas condições citadas e a câmara de fluxo laminar desinfetada com etanol 70% e incidência de luz U.V., por 15 minutos. Sobre três folhas de papel sobrepostas foram dispostas 12 sementes enfileiradas, a uma distância média de 5 cm do ápice da folha e 2 cm das bordas laterais. O

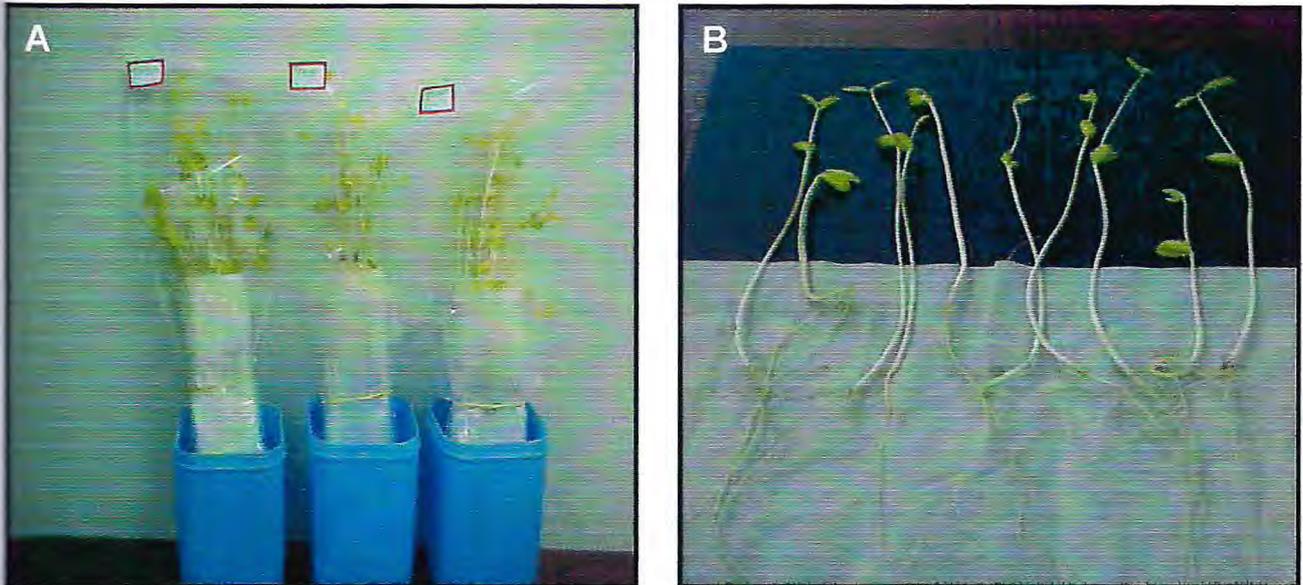


FIGURA 9 - Localização tecidual da toxina da soja em plântulas do genótipo BR-10, germinadas por 12 dias em câmara escura, a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. A) Acondicionamento das plântulas nos sacos e depósitos plásticos e B) Plântulas ao final dos 12 dias de experimento.

grupo de três folhas sobrepostas foi enrolado em forma de cartucho e, subseqüentemente, envolto por uma folha para dar sustentação ao rolo de papel. O conjunto (sementes e papel de filtro) foi umedecido com água grau milli-Q num volume correspondente a 2,5 vezes o seu peso seco, segundo recomendado pelo Ministério da Agricultura e Reforma Agrária (Brasil, 1991). Em seguida, o conjunto foi verticalmente acondicionado em sacos plásticos transparentes a fim de que fosse mantida a umidade, sendo esse procedimento realizado para um total de 10 conjuntos. Esses foram levados para câmara de crescimento, escura, com temperatura média de $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Coleta das Plântulas e Separação dos Tecidos Vegetais

O experimento de germinação das sementes do genótipo BR-10 foi conduzido por 12 dias, tempo necessário para que as plântulas ainda se encontrassem íntegras, livres de danos causados por estiolação e/ou decomposição. A coleta das plântulas foi feita a cada 2 dias (3°, 5°, 8°, 10° e 12° dia), sendo que em cada dia de coleta, 2 rolos foram abertos e as plântulas tiveram seus tecidos vegetais separados em raízes, caules, folhas e cotilédones. As diferentes partes foram individualmente pesadas, ensacadas e congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises posteriores.

5.6.2 - Preparação dos Extratos Vegetais

Para extração de proteínas dos diferentes tecidos vegetais, amostras foram maceradas em almofariz de porcelana, juntamente com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5 (1:5; p/v), sob banho de gelo. Após maceração, a suspensão foi

centrifugada a 15.000 x g, 4 °C, 10 minutos, sendo o precipitado descartado e o sobrenadante congelado a - 20 °C, para utilização nos ensaios posteriores.

5.6.3 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida dos Tecidos Vegetais

Eletroforese em gel de poliacrilamida dos tecidos vegetais foi realizada segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970), adaptada para placas medindo 10,0 x 8,0 cm. O gel de aplicação encerrou 3,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, preparados em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, e o de separação 12,5% de acrilamida e 1,0% de SDS, em tampão Tris-HCl 3,0 M, pH 8,8. Amostras dos diferentes extratos vegetais, encerrando cerca de 0,5 mgP/ml, foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8, contendo SDS 1,0%, na presença β -mercaptoetanol 1,0%. O restante do procedimento foi similar àquele descrito no item 5.4.1.

5.6.4 - Atividade Hemaglutinante

Para detecção da atividade hemaglutinante nos tecidos vegetais foi seguido o mesmo procedimento descrito no item 5.2.5.

5.6.5 - Atividade Inibidora de Tripsina

A avaliação da atividade inibidora de tripsina presente nos diferentes tecidos vegetais foi realizada de acordo com o procedimento já descrito no item 5.2.5.

5.6.6 – Ensaio Imunológico

Obtenção de Anticorpos Policlonais Anti-SBTX

Para a produção e obtenção da fração imune IgG anti-SBTX foi seguida a metodologia originalmente descrita por Harboe & Inglid (1973), salvo algumas modificações feitas por Barcellos *et al.* (1993). O soro imune contra a SBTX foi obtido a partir de coelhos da raça Nova Zelândia branca. Os animais foram, inicialmente, inoculados via intramuscular com emulsão contendo 0,5 mg de SBTX, 0,5 ml NaCl 0,15 M e 0,5 ml de adjuvante completo de Freund. Esse processo foi repetido após 21 dias, mas através de injeção subcutânea, no dorso, e sem a adição de adjuvante de Freund. Após 7 dias do reforço foi feita a 1ª sangria, através de pequena incisão longitudinal na veia marginal da orelha e aplicada uma outra dose de reforço preparada de forma idêntica à anterior. Esse procedimento foi realizado semanalmente até a obtenção de quantidade suficiente de soro imune. A colheita do sangue foi efetuada em tubos de ensaio, seguida de incubação a 37 °C, durante 1 h, após a qual o material foi mantido em geladeira (4 °C) por cerca de 12 h, para melhor retração do coágulo. Quando necessário, o soro foi centrifugado a 3.000 x g, 10 minutos, para separação de pequenos fragmentos de coágulo que, eventualmente, permaneciam em suspensão.

As imunoglobulinas foram obtidas por precipitação do soro imune com sulfato de amônio a 33% de saturação. Procedeu-se, então, a três diálises alternadas com água e tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0, durante 6 dias. A última diálise foi feita com água, após a qual foi seguida por centrifugação a 15.000 x g, 20 minutos, 4 °C. O sobrenadante foi submetido à cromatografia em coluna de DEAE-Sephadex A-50, equilibrada com tampão acetato de sódio 0,05 M, pH 5,0. O material não retido, rico em IgG policlonal anti-SBTX, foi dialisado contra água grau milli-Q, concentrado por liofilização e armazenado a 2 °C.

Western Blotting

A presença da toxina da soja nos diferentes tecidos vegetais, obtidos durante os 12 dias de germinação de sementes do genótipo BR-10, foi investigada por "Western blotting" seguindo a metodologia descrita por Towbin *et al.* (1979). Após eletroforese em gel de poliacrilamida [17,5%], conforme descrita no item 5.4.1, as proteínas foram transferidas para membranas de PVDF em uma unidade de transferência (multiphor II, Pharmacia), usando tampão Tris 25 mM/glicina 192 mM/metanol 20%, SDS 0,01%, pH 8,3. A eletrotransferência foi realizada a 70 V, 200 mA, 4 °C, por 1 h e 30 minutos. Após a transferência das proteínas, a membrana de PVDF foi bloqueada com tampão Tris 0,05 M, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M, Tween 20 0,05% e leite em pó desnatado 5% (m/v), cujo tempo de contato foi 1 h. Decorrido esse tempo, a solução bloqueadora foi descartada e a membrana incubada com o anticorpo anti-SBTX (1:100), "overnight", a 4 °C. Após a incubação, membrana foi colocada no tampão de lavagem por cinco vezes consecutivas, cada uma com duração de 10 minutos e, então, incubada com IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:1.000), por 1 h, a 37 °C. Após lavagem da membrana sob as mesmas condições, foi seguido o procedimento de revelação colocando-a em contato com o substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/nitro blue tetrazolium (BCIP/NBT). A membrana de PVDF foi deixada em contato com a solução do substrato e monitorada até que as bandas alcançassem a intensidade desejada quando, então, foi lavada com sucessivas trocas de água. Em seguida, a membrana foi seca à temperatura ambiente e guardada ao abrigo da luz.

ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)

Para a determinação quantitativa de SBTX nos tecidos vegetais foi empregada a técnica de ELISA descrita por Rowhani & Falk (1995). Inicialmente, os extratos vegetais (antígenos) foram diluídos em tampão de acoplamento (carbonato/ bicarbonato de sódio 0,05 M, pH 9,6) para uma concentração final de 100 µgP/ml. 50 µl dos diferentes antígenos foram aplicados em poços na placa de microtitulação para impregnação, por um período de 16 h, a 4 °C. Em seguida, a placa foi lavada com tampão PBST (fosfato de sódio 100 mM, fosfato de potássio 10 mM, pH 7,4, contendo NaCl 0,15 M e Tween 20 0,05%), por 60 minutos, e, posteriormente, com tampão PBST contendo leite em pó desnatado a 5%, por mais 60 minutos. Feito isso, a placa foi lavada com PBST por mais 60 minutos e, então, incubada com 50 µl de IgG anti-SBTX (diluído 1:100 em PBST), por 1 h, a 37 °C. A placa foi novamente lavada com tampão PBST (4 vezes, 10 minutos, cada) e incubada por 1 h a 37 °C com 50 µl de IgG de cabra anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina (1:1000 em PBST). Após lavagem da placa sob as mesmas condições, 50 µl da solução de revelação, contendo o substrato *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP) presente na forma de tablete e dissolvido em água grau milli-Q seguindo as especificações do fabricante (Sigma), foram aplicados aos poços. A reação foi parada com 50 µl de NaOH 3 N, após intervalo de 16 h, e as leituras realizadas em leitor de ELISA (BIO-TEK ELX 800), a uma absorvância de 450 nm. O controle negativo consistiu da substituição do anticorpo IgG anti-SBTX pelo soro pré-imune (1:100 em PBST). Os teores de SBTX presentes nos diferentes tecidos foram estimados a partir de uma curva padrão obtida com amostras encerrando concentrações crescentes de SBTX (10 a 100 µg/ml).

5.7 - Análise Estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância e a significância das diferenças entre as médias, determinada por teste de Tukey ($p > 0,05$), através do programa MSTATC.

6. RESULTADOS e DISCUSSÃO



Os resultados obtidos neste trabalho versam, inicialmente, sobre estudos bioquímicos comparativos de três genótipos de soja [*Glycine Max* (L.) Merrill], BR-10 Teresina (BR-10), Teresina RC (TRC) e Teresina RCH (TRC-H), melhorados a partir de BR-10 Teresina, pertencendo, portanto, à mesma linhagem genética. É importante salientar que o genótipo BR-10 que foi aqui estudado se tratou de um novo lote, diferente daquele pesquisado na dissertação de mestrado de Siebra (1998). O principal foco desta etapa foi investigar se os genótipos citados apresentavam diferenças em relação às suas proteínas, considerando aspectos quantitativos e qualitativos, e avaliar que proteínas poderiam estar relacionadas com a resistência dos genótipos BR-10 e TRC ao fungo fitopatogênico *Cercospora sojina*, causador da mancha de olho-de-rã. Um outro objetivo foi selecionar dentre os três genótipos estudados o que apresentava maior toxicidade por via intraperitoneal (i.p.) ou intravenosa (i.v.) para camundongos, de modo a ser utilizado nas etapas subsequentes para isolamento e caracterização da toxina da soja (SBTX) e avaliação de seu papel fisiológico.

A segunda etapa dá seqüência ao trabalho já iniciado e apresentado na dissertação de mestrado de Siebra (1998), cujos objetivos foram centrados no aprimoramento da purificação e caracterização físico-química da SBTX.

A terceira etapa compreende ensaios biológicos utilizando a SBTX, de modo a avaliar a participação desta toxina na defesa da soja. Para isto, foram conduzidos ensaios voltados para a investigação da ação antifúngica e inseticida da SBTX, assim como da sua localização tecidual e de seu comportamento temporal durante a germinação da semente.

PARTE 1 - Análise Comparativa de Genótipos de Soja, BR-10, TRC e TRC-H

6.1 - Composição Centesimal

Na TABELA 2 estão mostrados os teores de umidade, cinza, proteína, lipídio e carboidrato presentes nas farinhas dos genótipos BR-10, TRC e TRC-H. Os teores de umidade e cinza dos três genótipos variaram de 8,00 a 8,10 g/100 g de farinha e de 5,72 a 5,82 g/100 g de farinha, respectivamente, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre eles. Quanto aos teores de lipídio, os valores encontrados foram de 22,21 a 23,49 g/100 g de farinha, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) entre BR-10 e os outros dois genótipos, TRC e TRC-H. Os três genótipos apresentam elevados teores de lipídios, se comparados à média de 17,2 g/100 g de farinha encontrada em genótipos oriundos da China (Grieshop e Fahey, Jr., 2001), e conteúdos semelhantes aos encontrados para outros genótipos brasileiros, 20,0-23,0 g/100 g de farinha (Campello, 2003). Os três genótipos estudados apresentaram elevados teores protéicos (41,24 a 51,09 g/100 g de farinha), os quais diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$). Os conteúdos protéicos de BR-10, TRC e TRC-H se equiparam aos encontrados por Vasconcelos *et al.* (1997) e Sousa (2001), sendo, portanto, superiores à média (40,9 g/100 g de farinha) dos genótipos brasileiros avaliados por Grieshop e Fahey, Jr. (2001). De maneira geral, o melhoramento genético do genótipo BR-10, originando os genótipos TRC e TRC-H, não causou grandes modificações na composição química, exceto para os teores protéicos. Porém, tal parâmetro não pode justificar, de forma isolada, as características de resistência e suscetibilidade dos genótipos em análise ao *C. sojina*.

TABELA 2 - Composição centesimal (g/100 de farinha) de sementes de soja, genótipos BR-10, TRC e TRC-H, expressa em percentual do peso seco

Constituinte	Genótipos		
	BR-10	TRC	TRC-H
Umidade	8,00 ± 0,14 ^a	8,10 ± 0,20 ^a	8,00 ± 0,16 ^a
Cinza	5,82 ± 0,05 ^a	5,72 ± 0,07 ^a	5,77 ± 0,01 ^a
Proteína*	47,82 ± 0,59 ^a	41,24 ± 0,45 ^b	51,09 ± 1,09 ^c
Lipídio	23,49 ± 0,20 ^b	22,90 ± 0,34 ^a	22,21 ± 0,01 ^a
Carboidrato**	22,87 ± 0,24 ^a	31,10 ± 0,47 ^b	20,38 ± 0,02 ^a

Médias de determinações em triplicata. Letras iguais na horizontal representam valores que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

* N x 6,25.

** Determinado por diferença.

6.2 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida Sob Condições Desnaturantes

Os perfis eletroforéticos encontrados para as farinhas dos genótipos BR-10, TRC e TRC-H estão mostrados na FIGURA 10. Eletroforese na presença de SDS e β -mercaptoetanol revelou elevada similaridade entre os genótipos estudados, no que diz respeito à distribuição de bandas protéicas. Todavia, a intensidade das bandas protéicas foi maior no genótipo BR-10 seguido pelo TRC, a despeito de quantidades iguais de proteína terem sido aplicadas. Semelhanças nos perfis eletroforéticos foram também observadas para outros nove genótipos de soja adaptados ao plantio em regiões de baixa latitude (Campello, 2003). Os resultados aqui obtidos mostraram que, nos três genótipos, ocorreu predominância de bandas protéicas na faixa de massa molecular relativa às proteínas de reserva glicínina e β -conglícinina, fato semelhante àqueles observados por Sousa (2001) e Brasil (2002). Tais proteínas de reserva de soja consistem de uma mistura de α - β - e γ -conglícininas e glicíninas, de massas moleculares variando de 35,0 a 83,0 kDa, com diferentes propriedades físico-químicas (Kilara e Harwalker, 1996).

6.3 - Composição em Aminoácidos

A TABELA 3 apresenta a composição em aminoácidos das farinhas de soja dos genótipos BR-10, TRC e TRC-H. Os resultados da composição aminoacídica para os três genótipos revelaram que a presença dos caracteres de resistência não induziu grandes diferenças no conteúdo dos aminoácidos. Ácido glutâmico/glutamina e ácido aspártico/asparagina foram os aminoácidos presentes em maiores quantidades. Como esperado, os teores de aminoácidos sulfurados foram baixos. Todavia, todos os outros aminoácidos essenciais estiveram presentes em quantidades consideráveis, inclusive, superiores aos requerimentos para crianças de 2-5 e de 10-12 anos (FAO/WHO/UNU, 1985), reforçando a

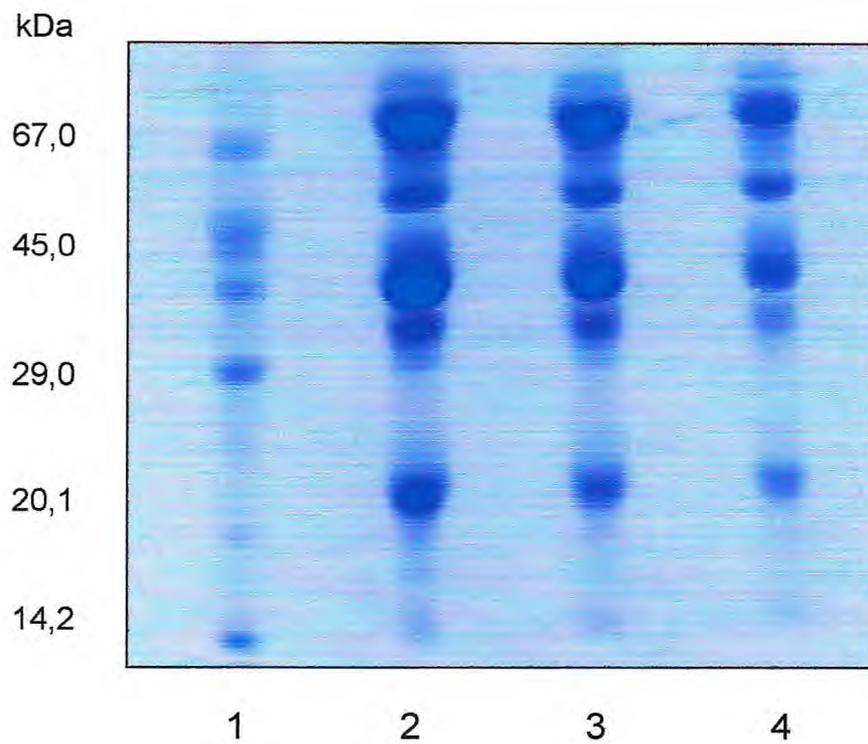


FIGURA 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida [17,5%] na presença de SDS e β -mercaptoetanol das farinhas de sementes de soja, corada com "Coomassie Brilliant Blue" R-250. 1) Marcadores de massa molecular; 2) genótipo BR-10; 3) genótipo TRC e 4) genótipo TRC-H.

TABELA 3 - Composição em aminoácidos (g/100 gP) das farinhas de sementes de soja, genótipos BR-10, TRC e TRC-H

Aminoácido	Genótipos		
	BR-10	TRC	TRC-H
Não essenciais			
Asx	10,74	11,43	10,93
Glx	18,15	19,19	18,71
Ser	5,44	5,73	5,63
Gly	7,48	7,35	7,30
Ala	7,27	6,36	6,28
His	2,40	2,13	2,49
Arg	7,12	7,29	8,00
Pro	5,91	5,96	6,03
Essenciais			
Cys	0,56	0,26	0,31
Met	0,79	0,56	0,55
Thr	3,97	4,19	4,07
Val	5,60	4,86	4,77
Ile	4,85	4,62	4,66
Leu	7,40	7,59	7,53
Lys	5,67	5,40	5,73
Tyr	2,63	2,88	2,84
Phe	4,03	4,20	4,17
Trp*	-	-	-
Total	100,0	100,0	100,0

* Não determinado.

elevada qualidade nutricional de sementes de soja. Os valores aqui detectados foram semelhantes àqueles encontrados para outros genótipos de soja (Vasconcelos *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 1999).

6.4 - Detecção e Quantificação de Fatores Tóxicos e/ou Antinutricionais

Toxina

Os extratos brutos obtidos a partir dos genótipos BR-10, TRC e TRC-H exibiram toxicidade quando injetados por vias i.p. ou i.v. em camundongos, no intervalo de 1-24 h (TABELA 4). Os animais apresentaram sintomas típicos de comprometimento do sistema nervoso, tais como piloereção, taquicardia, convulsão, estiramento da cauda e patas, culminando com a morte. Os valores de DL₅₀ calculados para os genótipos BR-10, TRC e TRC-H foram 155,0, 200,0 e 275,0 mgP/Kg de peso corpóreo, respectivamente, mostrando ser o primeiro destes o mais tóxico. Os valores de DL₅₀ foram significativamente ($p < 0,05$) diferentes, muito embora os genótipos estudados pertençam à mesma linhagem genética. É bastante provável que a toxicidade aguda observada nos extratos tenha sido oriunda da presença das toxinas da soja, SYTX e SBTX, desde que as amostras permaneceram tóxicas mesmo após diálise. Além disso, o tratamento térmico (92 °C, 5 minutos) dessas amostras foi capaz de abolir toda a atividade tóxica. Presença de neurotoxinas em genótipos de soja já tinha sido reportada anteriormente (Carlini *et al.*, 1988; Vasconcelos *et al.*, 1994). Além da soja, várias outras espécies vegetais têm se mostrado neurotóxicas quando injetadas por vias i.p. ou i.v. (Carlini e Guimarães, 1981; Carlini *et al.*, 1988; Santos, 2001).

TABELA 4 - Fatores tóxicos e/ou antinutricionais presentes nos extratos brutos dos genótipos BR-10, TRC e TRC-H

Componentes	BR-10	TRC	TRC-H
Toxina*	155,0 ± 2,3 ^a	200,0 ± 3,1 ^b	275,0 ± 4,2 ^c
Inibidores de tripsina [#]	79,1 ± 0,4 ^a	77,2 ± 1,4 ^{ab}	74,7 ± 1,9 ^b
Urease [¶]	746,4 ± 24,1 ^a	716,8 ± 18,2 ^a	643,2 ± 27,3 ^b

Letras iguais no sentido horizontal representam valores que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média de três determinações.

* A atividade tóxica foi expressa como DL₅₀. Uma LD₅₀ representa a quantidade de proteína em mgP/Kg de peso corpóreo de camundongo capaz de produzir convulsão e morte em 50% dos animais injetados por via intraperitoneal.

A atividade inibidora de tripsina foi expressa em mg de tripsina inibida por g de farinha.

¶ A atividade ureásica foi expressa como unidades de urease por g de farinha. No padrão utilizado, 1 g de urease pura contém 870.000 unidades (Sigma).

Inibidor de Tripsina

Na TABELA 4 estão mostrados os teores de inibidores de tripsina presentes nos extratos brutos dos genótipos estudados. Todos os extratos foram capazes de inibir a enzima tripsina apresentando valores que variaram de 74,7 a 79,1 UI (Unidades de Inibição), que representam a quantidade em mg de tripsina inibida por Kg de farinha. O maior valor foi detectado no genótipo BR-10, que diferiu significativamente ($p < 0,05$) daquele encontrado para o genótipo TRC-H. Os valores encontrados para os três genótipos estudados foram superiores àqueles analisados por Vasconcelos e colaboradores (1997), que variaram de 28,5 a 62,5 UI. Os inibidores interferem com as funções da tripsina que são a ativação de proenzimas e a hidrólise de proteínas dietéticas e endógenas no intestino (Hopfer, 1998). No aspecto nutricional, a presença de inibidores de tripsina afeta negativamente o valor biológico das proteínas, devido a uma série de efeitos deletérios causados quando consumidos a curto ou longo prazo. Danos como hiperplasia e hipertrofia pancreáticas foram verificados em galinhas e porcos quando alimentados com farinha de soja rica em inibidores de tripsina (Hasdai *et al.*, 1989). O tratamento térmico empregado durante o processamento da soja inativa, em parte, os efeitos danosos dos inibidores, conservando uma atividade residual correspondente de 5 a 20% (Friedman e Brandon, 2001). Genótipos mutantes de soja com níveis reduzidos de inibidores de tripsina têm sido desenvolvidos. Um exemplo é o mutante P.I. 196168 que exibe 58% a menos de atividade inibitória de tripsina quando comparado com o genótipo Amsoy 71 (Krishnan, 2001). Por outro lado, sabe-se que os inibidores de tripsina são proteínas ricas em aminoácidos sulfurados e, desse modo, têm efetiva contribuição no conteúdo de metionina da soja (Clarke e Wiseman, 2000). Como estas sementes são geralmente consumidas após algum tratamento térmico, que ocasiona, pelo menos parcialmente, a desnaturação e a inativação destas proteínas, a presença dos inibidores pode até mesmo representar um papel positivo sob ponto de vista nutricional (Duranti e Gius, 1997).

Urease

Os extratos brutos dos três genótipos estudados exibiram também atividade ureásica (TABELA 4), com valores variando de 643,2 a 746,4 U/KgF. Os genótipos BR-10 e TRC exibiram valores mais elevados que diferiram significativamente ($p < 0,05$) daquele encontrado para TRC-H. As atividades ureásicas detectadas nos genótipos de soja analisados foram inferiores quando comparados com os valores mostrados por Campello (2003), sendo semelhante ao do genótipo Seridó-RCH analisado por Sousa (2001).

A urease é uma enzima que catalisa a hidrólise da uréia produzindo dióxido de carbono e amônia, que são importantes para o crescimento das plantas (Gerendas *et al.*, 1999). A urease de origem bacteriana parece estar associada à ocorrência de ulcerações na mucosa gástrica de animais vertebrados, lesões estas induzidas, possivelmente, pela toxicidade direta da amônia ou, alternativamente, pela prevenção do fluxo de prótons a partir das glândulas gástricas para a luz estomacal, resultando em uma retro-difusão destes prótons (Cussac *et al.*, 1992). Em decorrência da alta homologia verificada entre a seqüência de aminoácidos da urease microbiana e a urease presente em sementes de plantas, Pollaco e Holland (1993) sugeriram que estas últimas poderiam exercer uma função de defesa química contra predadores, função esta talvez mais importante do que a sua ação promotora da assimilação do nitrogênio da uréia.

Follmer e colaboradores (2001) verificaram que a urease obtida comercialmente é capaz de induzir a agregação de plaquetas, a aglutinação de eritrócitos de coelhos e pode apresentar atividade inseticida. Segundo os mesmos autores, a canatoxina, uma isoforma da urease presente de *Canavalia ensiformis*, possuindo 30 a 40% da atividade ureolítica da urease "clássica" e com alto grau de identidade estrutural com esta, constitui uma potente neurotoxina. Vasconcelos *et al.* (2001) verificaram que a urease presente em sementes de soja foi capaz de influenciar negativamente no consumo voluntário de alimentos e no ganho de peso

de ratos, afetando ainda, de forma significativa, a Utilização Líquida de Proteína (NPU), a digestibilidade e o peso relativo de órgãos internos dos animais experimentais.

Lectina

A presença de lectinas, detectada através da atividade hemaglutinante do extrato bruto frente a eritrócitos de coelho, tratados ou não com enzimas proteolíticas, pode ser observada na TABELA 5. Em geral, o genótipo BR-10 foi que apresentou a maior atividade específica. O tratamento enzimático dos eritrócitos aumentou a atividade hemaglutinante de todos os extratos. Pequenas diferenças foram observadas quanto ao favorecimento da aglutinação das células. Aparentemente, tripsina foi a enzima que mais promoveu aumento da atividade hemaglutinante, notavelmente nas amostras de sangue submetidas à ação dos extratos brutos de sementes pertencentes ao genótipo BR-10. Com exceção dos resultados obtidos com o genótipo TRC-H, o tratamento com papaína dos eritrócitos foi o menos eficiente. Os valores encontrados de atividade específica para os genótipos analisados são da mesma ordem daqueles verificados para outros genótipos de soja cultivados sob as mesmas condições de plantio (Vasconcelos *et al.*, 1997; Sousa, 2001; Campello, 2003). O tratamento com enzimas proteolíticas das células aumentou a atividade hemaglutinante de todos os extratos, provavelmente em decorrência do aumento na exposição de resíduos de carboidratos presentes na membrana celular, pelos quais a lectina possui maior afinidade específica. Lectinas estão presentes em sementes de diversas leguminosas, compreendendo uma classe de proteínas que interagem com carboidratos, livres ou conjugados, incluindo aqueles presentes em glicoproteínas e glicolipídios das superfícies celulares (Peumans e Van Damme, 1996). Elas constituem importantes fatores antinutricionais pelo fato de serem, em sua maioria, resistentes à degradação por enzimas proteolíticas e, desse modo,

TABELA 5 - Atividade hemaglutinante* (UH/mgP) presente nos extratos brutos dos genótipos BR-10, TRC e TRC-H frente a eritrócitos de coelho tratados e não tratados com enzimas proteolíticas

Genótipos	Eritrócitos	Eritrócitos tratados com enzimas			
		Não-tratados	Tripsina	Bromelaína	Subtilisina
BR-10	21,9	175,8	87,9	87,9	43,9
TRC	4,8	76,4	76,4	76,0	38,2
TRC-H	5,1	81,3	81,3	81,3	81,3

* Uma UH corresponde ao valor recíproco da maior diluição capaz de provocar aglutinação visível a olho nu.

quando presentes na dieta, podem causar alterações na mucosa intestinal e no metabolismo em geral (Pusztai *et al.*, 1995; Grant, 1999).

6.5 - Deteccção e Quantificação de PR-Proteínas

Quitinases

Os extratos protéicos dos três genótipos analisados apresentaram atividade quitinásica total (TABELA 6). Quantitativamente, esta atividade variou de 0,26 a 0,44 nKat/mgP. O menor teor de quitinases foi detectado no genótipo BR-10, sendo quase duas vezes menor do que aqueles verificados nos genótipos TRC e TRC-H. Comparados com os resultados de análises realizadas por Sousa (2001), os valores das atividades quitinásicas exibidos no presente trabalho são bem menores. Quando confrontados, ainda, com valores obtidos para outros feijões (Paula, 2003), as atividades quitinásicas aqui detectadas são consideradas também inferiores. É provável que os baixos valores encontrados sejam devidos a dosagem de apenas da atividade quitinásica total, e não das atividades endo- e exoquitinásica, o que poderia vir a mascarar os resultados. Essa família de enzimas é capaz de hidrolisar ligações β -1,4-*N*-acetilglucosamídicas presentes nos polímeros de quitina, atuando na defesa, principalmente, contra fungos patogênicos (Wurms *et al.*, 1997).

TABELA 6 - Atividades quitinásica, β -1,3-glucanásica e peroxidásica presente nos extratos brutos dos genótipos BR-10, TRC e TRC-H

Atividades Enzimáticas	BR-10	TRC	TRC-H
Quitinases*	0,26 \pm 0,02 ^a	0,44 \pm 0,01 ^b	0,44 \pm 0,02 ^b
β -1,3-glucanases [#]	5,67 \pm 0,28 ^a	5,58 \pm 0,30 ^a	5,44 \pm 0,09 ^a
Peroxidasas [¶]	4,71 \pm 0,21 ^a	5,49 \pm 0,16 ^b	4,75 \pm 0,05 ^a

Letras iguais no sentido horizontal representam valores que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey. Cada valor representa a média de três determinações.

* A atividade quitinásica está expressa em nKat/mgP, onde 1 nKat representa 1 nmol de *N*-acetil-D-glucosamina liberado por segundo.

[#] A atividade β -1,3-glucanásica está expressa em nKat/mgP, onde 1 nKat equivale a 1 nmol de glucose liberado por segundo.

[¶] A atividade peroxidásica está expressa como UAP/mgP, onde a variação de 1 (uma) unidade de absorbância por minuto foi assumida como sendo 1 UAP (Unidade de Atividade Peroxidásica).

β -1,3-Glucanases

Os extratos protéicos dos genótipos estudados exibiram também atividade β -1,3-glucanásica (TABELA 6), com valores variando de 5,44 a 5,67 nKat/mgP. Apesar desta variação, as diferenças não foram significativas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As atividades β -1,3-glucanásicas detectadas nos genótipos estudados foram bem inferiores quando comparadas com os valores mostrados por Sousa (2001), que encontrou atividades equivalentes a 9,84 e 12,06 nKat/mgP para os genótipos Seridó e Seridó-RCH, respectivamente. Postula-se que as β -1,3-glucanases possam interagir com estruturas glucanas, degenerando a parede celular de alguns tipos de fungos fitopatogênicos (Fry, 1987; Nissum *et al.*, 1998). Acredita-se que a importância dessa família de proteínas como defesa vegetal advém da capacidade que elas possuem de catalisar a quebra hidrolítica de ligações β -1,3-glucosídicas presentes nos β -1,3-glucanos, considerados os principais componentes da parede celular dos fungos (Means *et al.*, 1992).

Peroxidases

Atividade peroxidásica também foi detectada nos extratos protéicos dos genótipos analisados (TABELA 6). A atividade variou de 4,71 a 5,49 UAP/mgP. O genótipo TRC foi que apresentou a maior atividade peroxidásica, sendo significativamente superior àquelas detectadas nos genótipos BR-10 e TRC-H, cujos resultados não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$). Os valores de atividade peroxidásica verificados neste trabalho foram bastante superiores aos observados por Sousa (2001), que variaram de 0,29 a 3,92 UAP/mgP. As peroxidases além de auxiliarem no fortalecimento da parede celular reduzem a susceptibilidade a enzimas microbianas que degradam a parede, possivelmente restringindo a difusão de toxinas derivadas do patógeno e, em casos de patógenos fúngicos,

agindo como uma barreira mecânica à penetração física no protoplasto (Bestwick *et al.*, 1998).

PARTE 2 - Purificação e Caracterização Físico-Química da Toxina da Soja (SBTX)

A existência de atividade tóxica nos extratos dos genótipos analisados, oriunda de componentes protéicos, foi comprovada nos testes de toxicidade conforme resultados apresentados na TABELA 4. Dentre os três genótipos analisados, o BR-10 foi o que apresentou a menor DL₅₀, sendo, portanto, o mais tóxico. Assim sendo, este genótipo foi selecionado para dar prosseguimento ao isolamento e caracterização da toxina da soja.

6.6 - Extração e Purificação da Toxina da Soja

Esta etapa descreve a purificação e caracterização físico-química da toxina da soja isolada de sementes de *Glycine max*. A sigla SBTX ("soybean toxin") foi arbitrariamente adotada para designar a toxina da soja e será doravante empregada neste trabalho.

A estratégia de purificação utilizada está sumarizada na FIGURA 3, mostrada em *Métodos*. O extrato bruto e a fração 20-55% (F₂₀₋₅₅), obtida por fracionamento do extrato bruto com sulfato de amônio, apresentaram toxicidade e rendimentos equivalentes aos descritos por Siebra (1998). A F₂₀₋₅₅, também denominada de PREP.B, concentrou a maior parte da atividade tóxica, sendo, também, capaz de aglutinar eritrócitos de coelho e de inibir, ainda que fracamente, a tripsina. A estabilidade da SBTX durante todo processo de purificação,

monitorada através de testes de toxicidade para camundongos, foi mantida pela adição do agente redutor ditioneitol (DTT) a 5 mM e manutenção da temperatura a 4 °C.

Após a obtenção do PREP.B, este foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose, que foi de fundamental importância na separação das duas toxinas da soja (FIGURA 11). A aplicação do PREP.B à coluna resultou na obtenção de duas frações protéicas não retidas (PREP.C-Ia e C-Ib), retiradas unicamente com o tampão de equilíbrio, Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, e uma fração retida, que foi eluída com o mesmo tampão acrescido de NaCl 1 M (PREP. C-II). O PREP.C-Ia foi bastante tóxico pelas vias i.p. e i.v., diferenciando do PREP.C-Ib que apresentou uma inconstante e baixa toxicidade. A fração retida à coluna (PREP.C-II), sabidamente rica em SYTX e em inibidor de tripsina tipo Kunitz (KSTI) conforme Vasconcelos *et al.* (1994), foi letal para camundongos e capaz de inibir a tripsina.

A próxima etapa empregada para purificação da SBTX foi uma cromatografia de troca iônica em coluna de CM-sepharose (FIGURA 12). A aplicação do PREP.C-Ia resultou num material não retido à coluna (PREP. D-I), obtido por percolação da coluna com o tampão de equilíbrio, e de proteínas retidas eluídas com o mesmo tampão acrescido de NaCl em diferentes concentrações (0,2 M, 0,3 M e 0,5 M). A aplicação do NaCl resultou em quatro picos, sendo denominados de PREP.D-IIa, D-IIb, D-III e D-IV. O PREP.D-IIa concentrou toda a atividade tóxica quando injetado i.p. ou i.v. em camundongos. Resultados negativos de ensaios de atividades hemaglutinante e inibidora de tripsina confirmaram a não contaminação do PREP. D-IIa (SBTX) pela lectina (SBA) e inibidor de tripsina (KSTI), compostos sabidamente não retidos à matriz de CM-sepharose. A aplicação do gradiente salino no lugar da eluição com NaCl 1 M melhorou a resolução do pico contendo atividade tóxica e, ainda, quase dobrou a recuperação desta atividade que era 14,1% para 24,7% (TABELA 7). Esta alteração foi considerada de grande valia, já que o conteúdo da toxina, aproximadamente 30 mg por 100 g de farinha das sementes, é relativamente

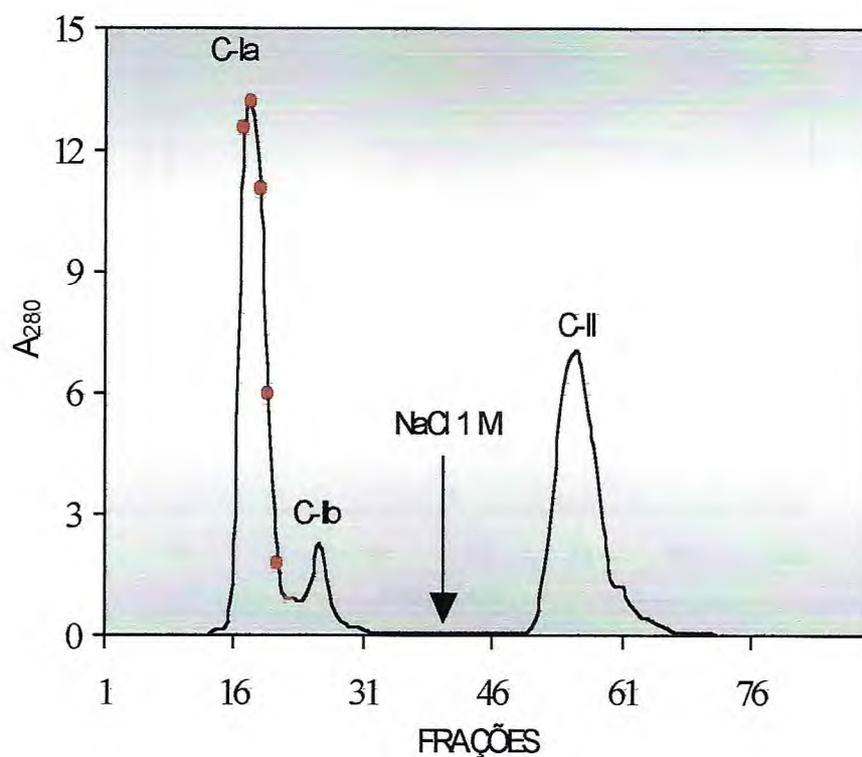


FIGURA 11 - Cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-celulose. Amostra do PREP.B (700 mg), obtida por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio (20-55%), foi aplicada numa coluna de DEAE-celulose (38,0 x 1,6 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. As proteínas retidas foram eluídas com o tampão de equilíbrio contendo NaCl 1 M. Fluxo: 40 ml/h; Frações: 2,2 ml. O símbolo (-•-) indica frações exibindo toxicidade para camundongos.

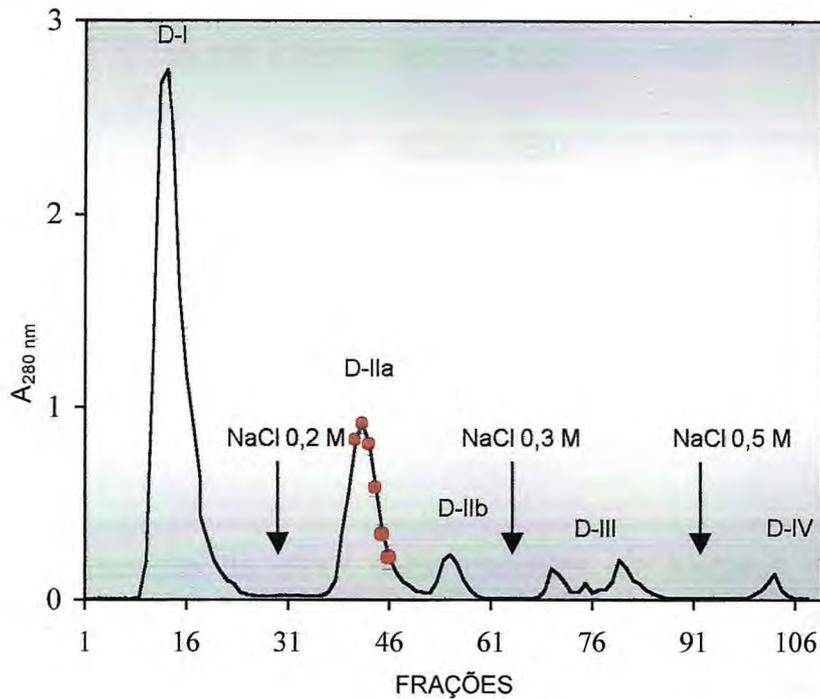


FIGURA 12 - Cromatografia de troca iônica em coluna de CM-sepharose. Amostra do PREP.C-Ia (90 mg) foi aplicada numa coluna de CM-sepharose (38,0 x 1,6 cm), equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5. As proteínas retidas foram eluídas com tampão de equilíbrio contendo concentrações crescentes de NaCl: 0,2 M, 0,3 M e 0,5 M. Fluxo: 40 ml/h; Frações: 2,2 ml. O símbolo (-●-) indica frações exibindo toxicidade para camundongos.

TABELA 7 – Purificação da toxina da soja (SBTX)

Etapa ^a	mgP/100 gF ^b	DL ₅₀ ^c	Índice de Purificação ^d	Rendimento ^e (%)
PREP.A (Extrato bruto)	13.300 ± 76,0	563,0 ± 22,5	1,0	100,0
PREP.BII (F ₂₀₋₅₅)	9.100 ± 89,0	422,0 ± 16,0	1,3	91,3
PREP.C-Ia (DEAE-celulose)	140,0 ± 10,0	21,2 ± 2,2	26,6	28,0
PREP.D-IIa (CM-sepharose)	35,0 ± 1,0	6,0 ± 0,1	93,8	24,7
SBTX (Superdex 200 10/30)	30,0 ± 1,0	5,6 ± 0,1	100,5	22,7

^a Etapas de purificação da SBTX como descritas em *Métodos*. Os resultados representam a média e o desvio padrão de seis experimentos similares.

^b Quantidade total de proteína recuperada (mg), em cada etapa de purificação, a partir de 100 g de farinha de soja.

^c Uma DL₅₀ representa a quantidade de proteína em mg/Kg de peso corpóreo de camundongo, capaz de produzir convulsão e morte, dentro de 24 h, em 50% dos animais testados, quando injetados por via intraperitoneal.

^d Índice de purificação calculado através da relação da DL₅₀ de cada etapa de purificação e àquela do extrato bruto considerada como 1.0.

^e Recuperação da atividade tóxica em cada etapa de purificação (extrato bruto, 100%).

baixo, sendo, portanto, interessante que a toxina se mantenha ativa permitindo assim, uma avaliação de suas atividades biológicas e o seu papel fisiológico.

Na tentativa de obter um material mais puro, as frações ativas obtidas na etapa anterior, foram reunidas (PREP.D-IIa), concentradas por liofilização e submetidas à cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HR 10/30 acoplada à um sistema FPLC (FIGURA 13). O processo cromatográfico resultou na obtenção de um único pico de elevada pureza e detentor de toxicidade aguda para camundongos, quando injetado por vias i.p. e i.v. Constatada a toxicidade do material obtido nesta etapa, várias corridas cromatográficas foram realizadas com a finalidade de acumular SBTX para ser utilizada nas etapas posteriores.

6.7 - Caracterização da Toxina da Soja

6.7.1 - Massa Molecular

SBTX foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, na presença ou ausência de β -mercaptoetanol (FIGURA 14). Na ausência do agente redutor, SBTX apresentou uma banda principal de massa molecular aparente de 44,0 kDa, e duas outras bandas de massas moleculares em torno de 78 e 30 kDa (FIGURA 14, Raia 2). Todavia, na presença de β -mercaptoetanol 1%, a SBTX apresentou duas subunidades de massas moleculares aparentes de 27,0 e 17,0 kDa (FIGURA 14, Raia 3). Os resultados obtidos por PAGE-SDS sugerem ser a SBTX uma proteína dimérica, de massa molecular aparente de 44 kDa, composta por duas subunidades distintas, unidas por pontes dissulfeto. Provavelmente, a banda discreta de 78 kDa, que aparece em PAGE-SDS, quando a amostra é submetida à corrida sem β -mercaptoethanol, corresponde ao agregado da proteína dimérica, enquanto a banda protéica de 30

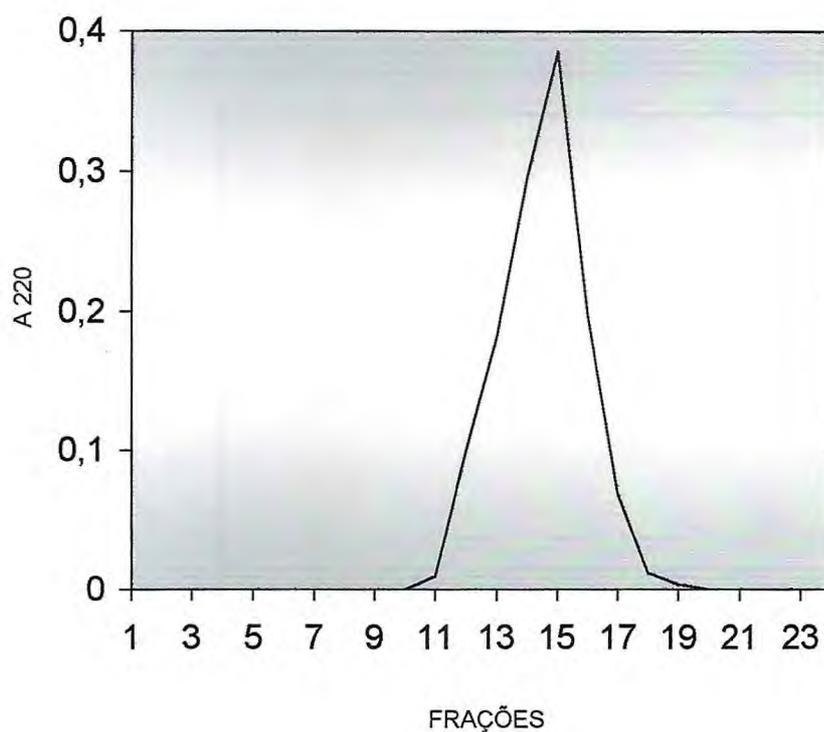


FIGURA 13 - Cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HR 10/30. Amostra do PREP.D-IIa (2 mg) foi aplicada numa coluna de Superdex 200 HR 10/30 (30,0 x 1,0 cm), acoplada à um sistema FPLC, equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,5 M. Fluxo: 0,5 ml/h; Frações: 2,0 ml.

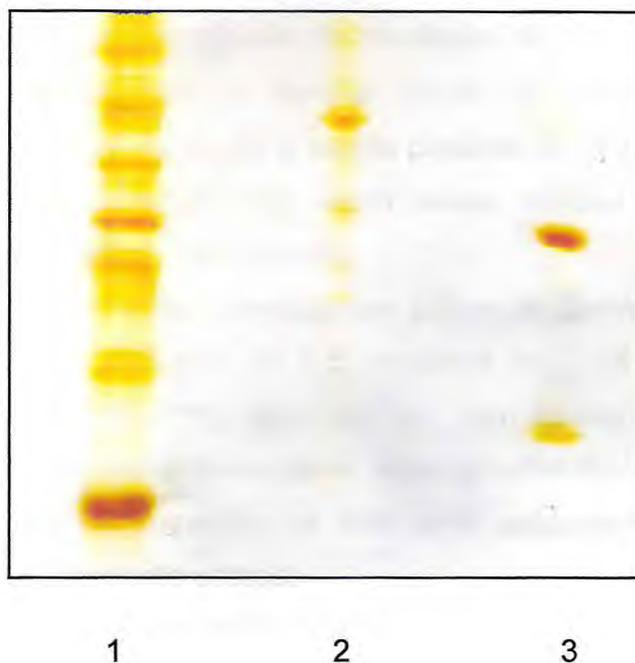


FIGURA 14 - Eletroforese em gel de poliacrilamida [17,5%] sob condições desnaturantes, cuja amostra foi tratada ou não com β -mercaptoetanol, da toxina da soja (SBTX). A eletroforese foi revelada com prata. Raia 1 – Marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina, 66,0 kDa; albumina do ovo, 45,0 kDa; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, 36,0 kDa; anidrase carbônica, 29,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz, 20,1 kDa e α -lactoalbumina, 14,2 kDa); Raia 2 – SBTX na ausência de β -mercaptoetanol; Raia 3 – SBTX na presença de β -mercaptoetanol.

kDa resulta de uma dissociação espontânea da proteína de 44,0 kDa, desde que ambas foram reveladas por "Western blotting", usando anticorpo anti-SBTX. Por outro lado, a banda de 17 kDa não foi visualizada na ausência do agente redutor, como foi detectada quando β -mercaptoetanol foi utilizado (FIGURA 14, Raia 2). Aparentemente esta dissociação espontânea da proteína de 44,0 kDa que está sendo sugerida tenha ocorrido apenas com uma pequena fração da proteína na sua forma dimérica e, assim, a intensidade de revelação da banda de 27 kDa tenha sido fraca, comparada com a mesma banda na presença de β -mercaptoethanol (FIGURA 14, Raia 3). Já a banda protéica de 17,0 kDa não foi revelada devido à sua concentração ser muito baixa, mesmo usando um procedimento envolvendo revelação com a prata.

Por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HR 10/30, equilibrada com Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,5 M, SBTX foi resolvida num único pico (FIGURA 12), bem definido, com massa molecular de 43,0 kDa (FIGURA 15). Esta massa molecular é muito próxima àquela verificada em PAGE-SDS, reforçando a sugestão de que uma preparação de SBTX altamente pura foi obtida no presente estudo.

Eletroforese bidimensional da SBTX (FIGURA 16), por revelação do gel com nitrato de prata, permitiu a visualização de dois "spots" correspondentes às massas moleculares aparentes em torno de 29,0 e 17,0 kDa, com valores de pontos isoelétricos correspondentes a 5,3 e 8,0, respectivamente. Estes resultados confirmam a presença de duas subunidades, uma ácida e outra básica, formadoras de uma proteína de estrutura dimérica.

Uma estimativa mais acurada da massa molecular foi obtida por espectrometria de massa (FIGURA 17), que revelou a presença de moléculas de 43,0, 21,0 e 17,0 kDa. Em adição a estas moléculas, um pequeno pico com massa correspondente a 34,0 kDa foi detectado. Provavelmente, a massa molecular de 43,0 kDa se refere à proteína na sua forma intacta, cuja massa molecular aparente em PAGE-SDS foi 44,0 kDa. As outras massas moleculares de 21,0 e 17,0 kDa se relacionam às subunidades da toxina, conforme já verificado por PAGE-SDS, cujas massas moleculares aparentes foram 27,0 e 17,0 kDa. Tanto é que o pico

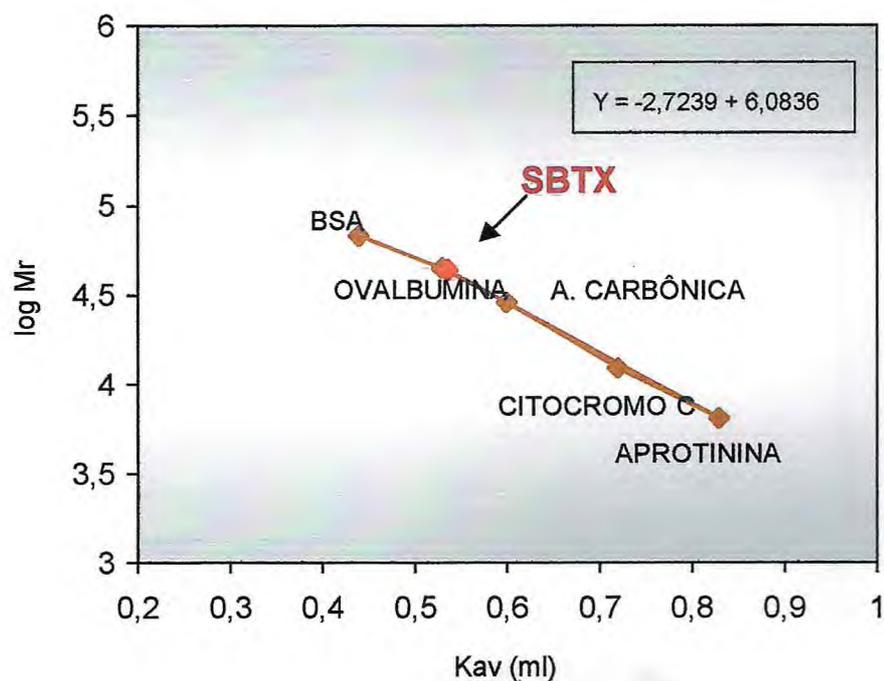


FIGURA 15 - Estimativa da massa molecular da toxina da soja (SBTX) por cromatografia de exclusão molecular em coluna de Superdex 200 HR 10/30, equilibrada com tampão Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, contendo NaCl 0,5 M. Fluxo: 0,5 ml/h; Frações: 2,0 ml.

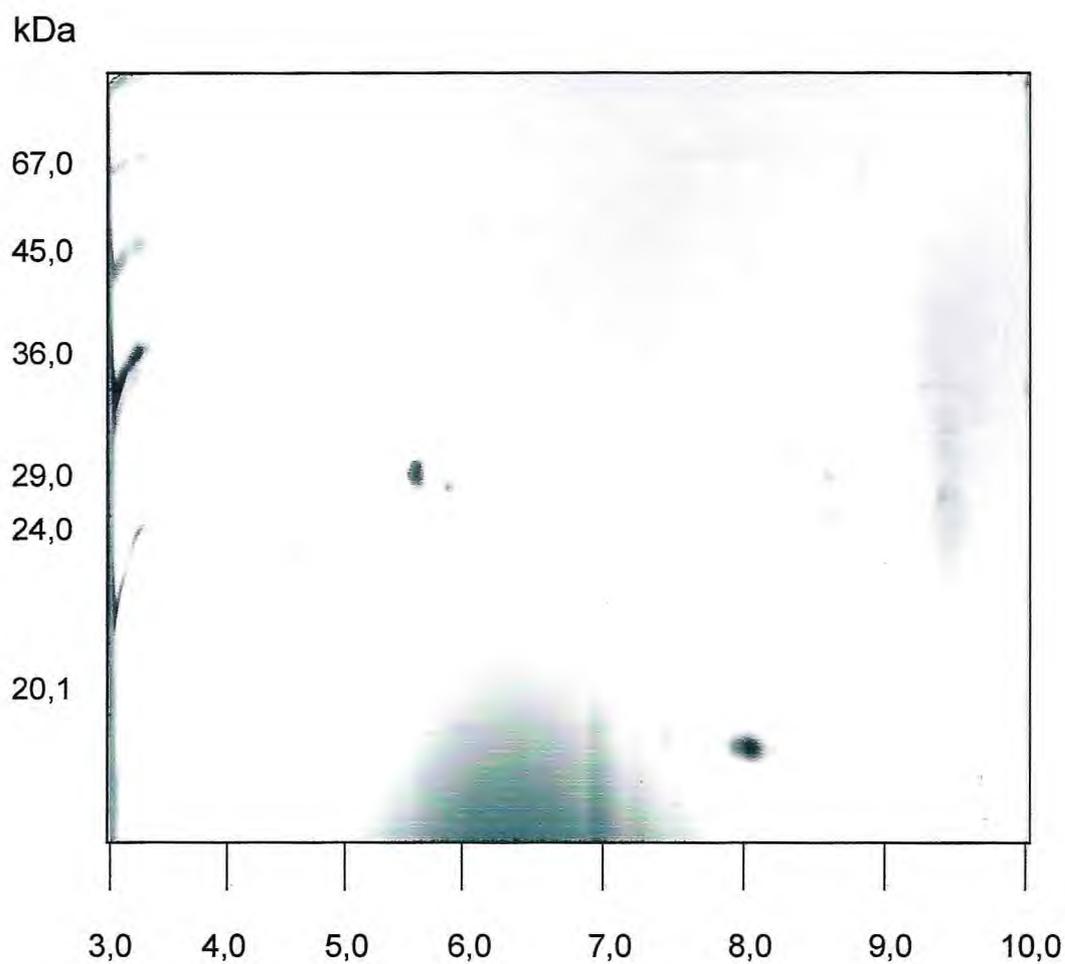


FIGURA 16 - Eletroforese bidimensional da toxina da soja (SBTX) revelada com nitrato de prata. "Immobiline dry strip" (13 cm, pH 3-10). Focalização isoelétrica (1ª dimensão): 1 h a 200 V, 1 h a 500 V, 1 h a 1000 V, 1h a 2500 V e 3,5 h a 3500 V, 4 °C, 7,5 h. PAGE-SDS [12,5%] (2ª dimensão): 50 mA, 4 °C, 6 h.

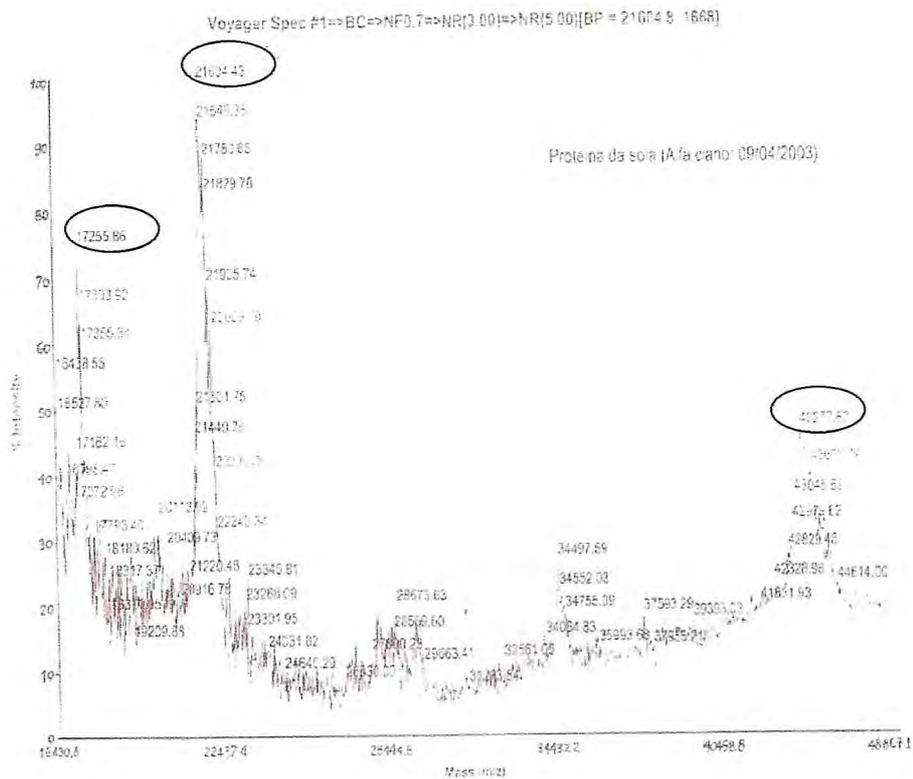


FIGURA 17 - Espectrometria de massa (MALDI-TOF) da toxina da soja (SBTX).

majoritário obtido por espectrometria de massa foi o de 21,0 kDa, que, possivelmente, corresponde à banda protéica mais intensa evidenciada em PAGE-SDS, que é de 27,0 kDa (FIGURA 14, Raia 3). O pequeno pico de 34,0 kDa pode ser apenas um produto da associação da subunidade de 17,0 kDa. Esta interpretação está baseada, particularmente, no fato de ter sido obtida apenas uma seqüência NH₂-terminal para a mesma amostra que foi analisada por espectrometria de massa, como mostrada no decorrer deste trabalho.

6.7.2 - Ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico (pI) da SBTX nativa foi estimado, experimentalmente, como sendo 8,4, indicando ser esta proteína de natureza básica. Uma propriedade desta toxina que confirma o seu pI básico, é a sua não interação com a resina de DEAE-celulose a pH 7,5. Ademais, SBTX tamponada com 25 mM de Tris-HCl, pH 7,5, e aplicada à matriz de CM-sepharose, foi completamente adsorvida, sendo eluída com NaCl 0,2 M. Todavia, por eletroforese bidimensional, esta toxina apresentou mais de um ponto isoelétrico, cujos valores foram em torno de 5,3 e 8,0, mostrando ser esta proteína formada por subunidades distintas. Uma ligeiramente ácida e outra básica. É bastante provável que estes dois pIs sejam resultantes do tratamento da SBTX com DTT antes desta ser submetida à corrida por eletroforese 2D, fato este não ocorrido quando o pI foi determinado pela técnica anterior, conforme descrito em *Métodos*. Estes resultados vêm, de certa forma, reforçar aqueles obtidos por PAGE-SDS, mostrando ser a SBTX uma proteína dimérica formada por subunidades distintas.

6.7.3 - Composição de Aminoácidos e Seqüência NH₂-terminal

SBTX contém elevados teores dos aminoácidos glutâmico/glutamina (14,98%), alanina (11,12%), lisina (10,05%) e aspártico/asparagina (9,09%), sendo, entretanto, pobre em aminoácidos sulfurados (TABELA 8). Este perfil de aminoácidos é característico da maioria das proteínas de leguminosas (Oliveira *et al.*, 2002).

A análise da seqüência de aminoácidos NH₂-terminal da SBTX revelou a seguinte seqüência ILKEPVHGV. Esta seqüência exibe uma similaridade de 83% com a proteinase aspártica I de soja (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

6.7.4 - Espectro de Absorção e determinação do coeficiente de extinção

O espectro de absorção de uma solução aquosa de SBTX encerrando 1 mg/ml revelou absorção máxima a 280 nm (FIGURA 18). O coeficiente de extinção, $\epsilon^{1\%}_{1\text{ cm}}$, calculado foi de 6,3. A SBTX na presença de DTT, reagente capaz de manter a toxina ativa por um período de quatro meses, não apresentou alteração de seu $\epsilon^{1\%}_{1\text{ cm}}$. Absorção ligeiramente maior foi verificada em todos os comprimentos de onda quando a SBTX se encontrava na presença de 5 mM de DTT. Entretanto, esta absorção adicional foi do próprio agente redutor, e não de um efeito resultante da interação deste com a toxina. De fato, como o DTT trata-se de um agente redutor de pontes dissulfeto, não se esperaria que ele interferisse com a absorção dos resíduos de triptofano e/ou da tirosina, a menos que ele deixasse tais aminoácidos mais expostos. O valor de $\epsilon^{1\%}_{1\text{ cm}} = 6,3$ da SBTX foi superior ao encontrado para a neurotoxina da salsa (*Ipomoea asarifolia*), denominada de LTS, com $\epsilon^{1\%}_{1\text{ cm}} = 4,8$ (Santos, 2001).

TABELA 8 - Composição em aminoácidos da toxina da soja (SBTX)

Aminoácidos (g/100 gP)	SBTX
Asx	9,09
Thr	7,60
Ser	7,62
Glx	14,98
Pro	3,41
Gly	9,23
Ala	11,12
Cys	0,44
Met	0,97
Val	4,57
Ile	3,23
Leu	4,53
Tyr	3,11
Phe	2,53
His	2,25
Lys	10,05
Arg	5,17
Trp	ND*

*Não determinado.

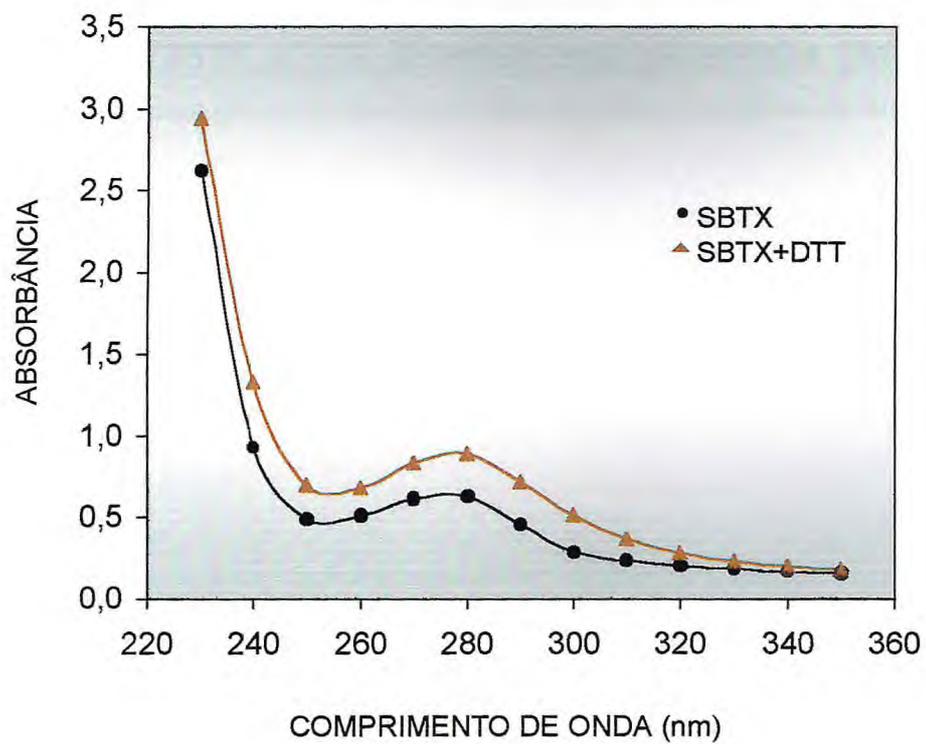


FIGURA 18 - Espectro de absorção da toxina da soja (SBTX). As absorbâncias da proteína (1 mg/ml) foram registradas na faixa de 220 a 350 nm.

6.7.5 - Dosagem de Açúcar Total

SBTX é uma glicoproteína como revelado por coloração com o ácido periódico de Schiff (FIGURA 19) e contém 5,0% de carboidratos (Dubois *et al.*, 1956). Como a SBTX, a LTS é também uma glicoproteína (Santos, 2001), apresentando cadeia glicídica ligada covalentemente a resíduos de aminoácidos.

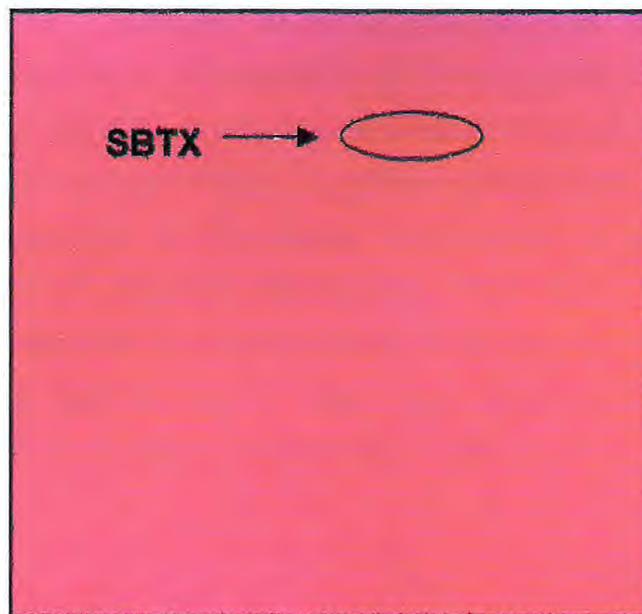


FIGURA 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida [17,5%] da toxina da soja (SBTX) corada com ácido periódico de Schiff.

PARTE 3 - Participação da Toxina da Soja (SBTX) na Defesa da Planta

Tendo em vista a detecção de compostos bioativos, tais como fatores tóxicos e/ou antinutricionais e PR-proteínas no extrato bruto, obtido a partir de sementes do genótipo BR-10, os estudos prosseguiram no sentido de investigar que atividades eram inerentes à SBTX. Os efeitos deletérios da SBTX a fitófagos (*Callosobruchus maculatus* e *Dysdercus peruvianus*) e ao fitopatógeno, *Cercospora sojina*, foram, também, investigados. Além disso, estudos voltados para a localização tecidual e comportamento temporal desta proteína foram conduzidos, visando detectar algum dado que pudesse sinalizar sobre a participação da SBTX na resposta de defesa da planta.

6.8 - Determinação de Atividades Biológicas da SBTX Relacionadas à Defesa

A SBTX (2 mg/ml) não foi capaz de aglutinar eritrócitos de coelho a 2% e nem de inibir a tripsina. Esta toxina, também, não exibiu atividade ureásica. Quando avaliadas as atividades relacionadas às PR-proteínas, não foram detectadas atividades quitinásica, β -1,3-glucanásica e peroxidásica. Estes resultados excluem qualquer participação de lectina, inibidores de tripsina, ureases, quitinases, β -1,3-glucanases e peroxidases nas atividades doravante descritas para a SBTX.

6.8.1 - Atividade Antifúngica contra *Cercospora sojina*

O próximo passo foi a realização de ensaios *in vitro* para verificar se a SBTX possuía atividade antifúngica. Os resultados encontrados para atividade antifúngica da SBTX, assim como das frações protéicas obtidas no curso da purificação desta toxina, contra *Cercospora sojina*, estão mostrados na FIGURA 20. O controle utilizado, Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, não foi capaz de inibir o desenvolvimento do fungo *Cercospora sojina*. Já o extrato total (PREP.A), a F_{20-55%} (PREP.B), a fração protéica não retida em coluna de DEAE-celulose (PREP.C-la) e a SBTX pura foram capazes de inibir o desenvolvimento do fungo em ambos ensaios (disco e meio perfurado). A SBTX (30-50 µg), em sua forma mais pura, inibiu fortemente o desenvolvimento do fungo, sugerindo uma atuação desta proteína na defesa da soja contra este patógeno. O fungo *Cercospora sojina*, causador da doença foliar mancha de olho de rã, é uma das principais pragas de plantações de soja em todo o mundo. Germoplasmas de soja de 32 países foram investigados quanto à resistência ao ataque do fungo *C. sojina*. Os resultados mostraram que 12 acessos continuaram completamente resistentes a doença depois de repetidas inoculações, sendo considerados plantas imunes (Yang e Weaver, 2001). Tais acessos são fontes potenciais de novos genes de resistência e candidatos ao desenvolvimento de genótipos resistentes à mancha de olho de rã. Os dados de inibição do desenvolvimento de *C. sojina*, obtidos com o genótipo BR-10, são bastante promissores em relação à resistência a este fungo. Proteínas e peptídeos vegetais com atividade antifúngica já foram isolados das mais diversas espécies vegetais. Exemplos são as defensinas Psd1 e Psd2 de *Pisum sativum*, ativas contra *Aspergillus niger*, e a proteína antifúngica de *Panax notoginseng* contra *Coprinus comatus*, *Fusarium oxysporum* e *Mycosphaerella arachidicola* (Almeida *et al.*, 2000; Lam e Ng, 2001). Pesquisas recentes demonstraram que durante o processo de germinação das sementes de *Malva parviflora*, *Catalpa speciosa* e *Triticum durum* são sintetizados peptídeos e/ou proteínas com acentuada atividade antifúngica contra *F. gramineum* e *Phytophthora*

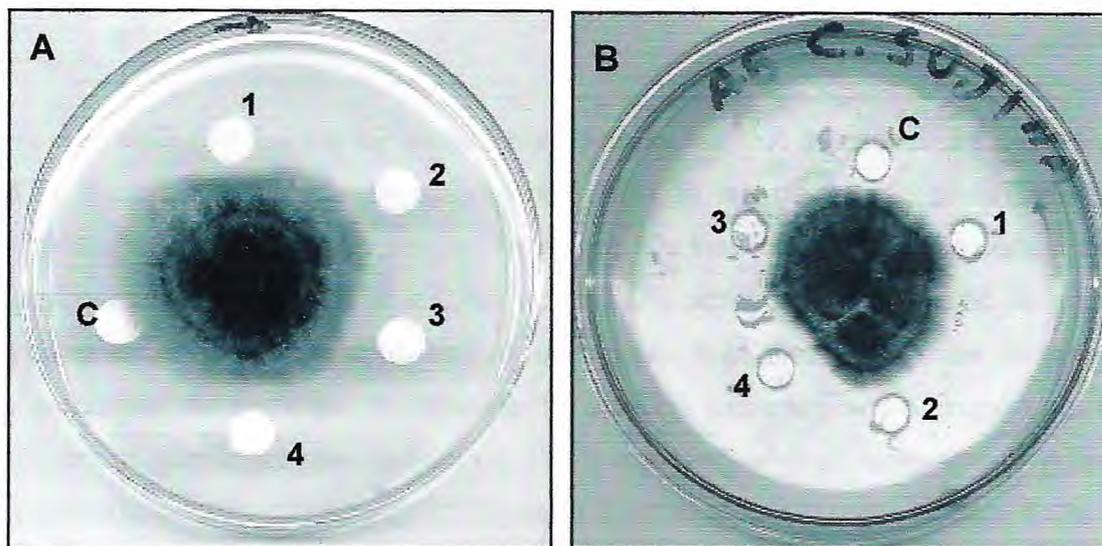


FIGURA 20 - Avaliação da atividade antifúngica de frações protéicas obtidas durante a purificação da SBTX contra o fungo *Cercospora soja*. A: Ensaio em placa e discos estéreis ([30 μ l - 500 μ g] para amostras 1, 2 e 3; [30 μ l - 25 μ g] para amostra 4); B: Ensaio em placa e meio sólido perfurado ([50 μ l - 500 μ g] para amostras 1, 2 e 3; [50 μ l - 25 μ g] para amostra 4). Amostra 1 - Extrato total (PREP.A); Amostra 2 - Fração 20-55% (PREP.B), obtida por precipitação do extrato bruto com sulfato de amônio; Amostra 3 - Fração protéica não retida em coluna de DEAE-celulose (PREP.C-Ia) e Amostra 4 - SBTX.

infestans (Wang *et al.*, 2002).

6.8.2 - Atividade Inseticida contra *Dysdercus peruvianus*

As FIGURAS 21 e 22 mostram os resultados dos testes de toxicidade da SBTX para ninfas de *D. peruvianus* em relação ao ganho de peso médio e percentual de sobrevivência, respectivamente. Os insetos alimentados com a dieta experimental contendo SBTX a 0,02; 0,2 e 1,0% apresentaram valores de ganho de peso reduzidos em relação ao grupo controle, cuja dieta foi à base de farinha de sementes de algodão. Ao final de 10 dias de experimento, o grupo controle apresentou ganho de peso médio de 12,30 mg, enquanto os valores dos grupos experimentais foram 10,60 mg, 10,27 mg e 8,39 mg, para 0,02%, 0,2% e 1,0% de SBTX. A redução mais acentuada no ganho de peso foi verificada para o grupo experimental que recebeu uma dieta composta de 1,0% de SBTX, cujo peso médio final foi significativamente diferente daquele do grupo controle ($p < 0,05$). Na avaliação do percentual de sobrevivência, foi observada uma discreta redução no número de insetos vivos ao final dos 10 dias de experimento, particularmente para o grupo experimental submetido a 1,0% de SBTX, cuja taxa de sobrevivência foi de 82,6% em relação ao controle, que foi considerada de 100%. Quando analisado os grupos de insetos alimentados com as dietas teste, em relação ao grupo controle, foram verificadas as taxas de 84,9%, 88,7% e 82,6% para dietas contendo 0,02%, 0,2% e 1,0% de SBTX, respectivamente. Apesar de ter havido uma redução no número de insetos vivos, quando submetidos a dietas teste, tais valores não foram significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$). Embora os dados obtidos sejam preliminares, requerendo uma repetição e alteração de algumas condições, tais como um período experimental mais longo, os resultados obtidos são promissores, já que um dos objetivos centrais da pesquisa biotecnológica vegetal é o desenvolvimento de genótipos que reduzam a predação excessiva e não o extermínio das espécies. Assim sendo, o genótipo BR-10 pode

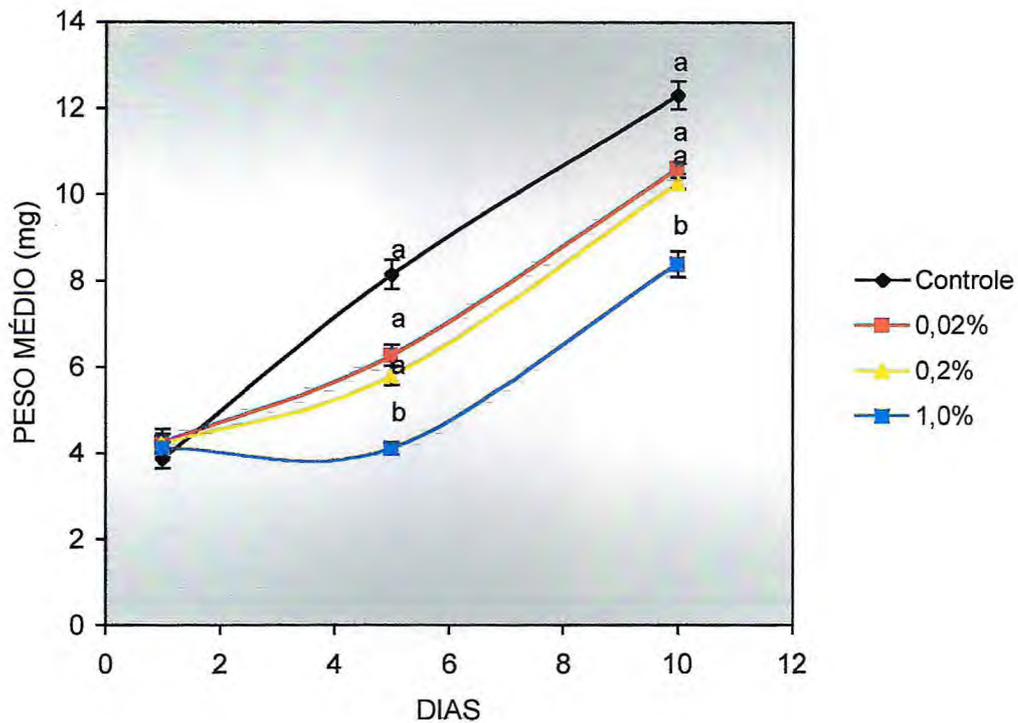


FIGURA 21 - Avaliação do efeito da toxina da soja (SBTX) sobre o ganho de peso médio (mg) de *Dysdercus peruvianus*, alimentados por 10 dias com dietas experimentais (0,02; 0,2 e 1,0% SBTX) e dieta controle (farinha de sementes de algodão).

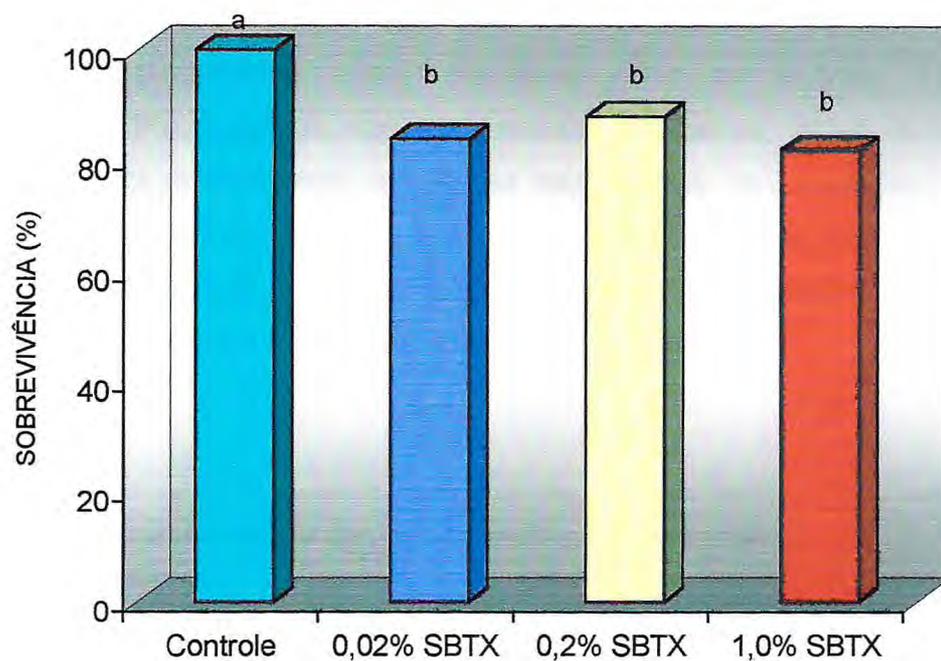


FIGURA 22 - Avaliação do efeito da toxina da soja (SBTX) sobre a sobrevivência de *Dysdercus peruvianus*, alimentados por 10 dias com dietas experimentais (0,02; 0,2 e 1,0% SBTX) e dieta controle (farinha de sementes de algodão).

ser considerado como uma fonte promissora de genes codificadores de uma proteína tóxica atuante no ataque do hemíptero sugador *D. peruvianus*.

Toxinas, sinais bioquímicos e barreiras físicas são recursos que foram desenvolvidos pelas plantas para garantirem sua proteção contra o ataque de predadores (Gatehouse, 2002). Proteínas como as lectinas, inibidores de proteases, RIPs, arcelinas, toxinas vegetais, Bt toxinas estão envolvidas nos mais variados mecanismos de defesa das plantas. A canatoxina (CNTX) de *Canavalia ensiformis*, oferecida em dieta artificial, exerceu efeito entomotóxico sobre *Nezara viridula* e *D. peruvianus*, reduzindo o percentual de sobrevivência destes insetos (Carlini e Grossi-de-Sá, 2002).

6.8.3 - Atividade Inseticida contra *Callosobruchus maculatus*

Neste bioensaio foi utilizada uma fração rica em SBTX (PREP.C-Ia), ao invés da SBTX pura, tendo em vista o grande consumo de dieta pelo *C. maculatus*. Os resultados obtidos com os testes de toxicidade do PREP.C-Ia para *C. maculatus* estão mostrados nas FIGURAS 23, 24 e 25.

As dietas experimentais contendo extrato total, F_{20-55%} e PREP.C-Ia diminuíram a emergência de insetos adultos quando comparados com o grupo controle, cuja dieta foi à base de feijão-de-corda (FIGURA 23). Dentre as frações protéicas analisadas, o PREP.C-Ia foi que causou a maior redução na emergência dos insetos, quando presente nos teores de 0,5 e 1,0%, sendo este efeito dose-dependente. Apesar de ter sido avaliada a toxicidade da SBTX usando-se apenas uma fração rica nesta proteína, e não a SBTX pura, os resultados sugerem a participação ativa da SBTX sobre este parâmetro analisado, uma vez que o PREP.C-Ia, contendo a toxina numa forma já bem purificada conforme evidenciada por PAGE-SDS, causou menores taxas de emergência dos insetos do que àquelas verificadas com os grupos que receberam extrato total e F_{20-55%} a 1,0%.

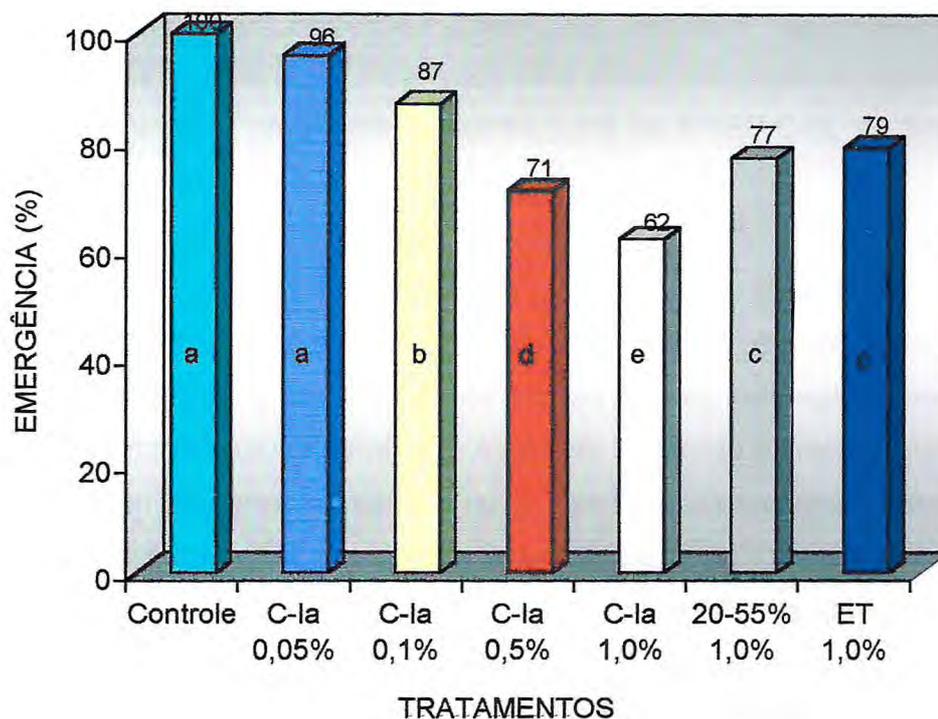


FIGURA 23 - Avaliação do efeito do extrato total (ET), da fração obtida por precipitação do ET com sulfato de amônio ($F_{20-55\%}$) e de uma fração rica em SBTX obtida em cromatografia em coluna de DEAE-celulose (PREP.C-la) sobre a emergência de *Callosobruchus maculatus*, alimentados por 33 dias com dietas experimentais (0,05; 0,1; 0,5 e 1,0% PREP.C-la) e controle (farinha de sementes de feijão-de-corda). Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

Em relação ao peso médio dos insetos adultos, todas dietas experimentais (extrato total, F_{20-55%} e PREP.C-Ia) induziram perda de peso dos insetos, quando comparados com aqueles do grupo controle (FIGURA 24). Quando comparadas as diferentes dietas teste, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Todavia, foi observada uma tendência maior de perda de peso no grupo submetido a uma dieta contendo 1,0% do PREP.C-Ia, ao final dos 33 dias de experimento.

Um outro parâmetro analisado foi o tempo médio de desenvolvimento dos insetos. Mais uma vez, foi observado que as dietas teste (extrato total, F_{20-55%} e PREP.C-Ia) retardaram o desenvolvimento dos insetos em relação ao grupo controle (FIGURA 25). O PREP.C-Ia novamente influenciou negativamente neste parâmetro de forma dose-dependente. As dietas contendo extrato total e F_{20-55%} a 1,0% exerceram menores influências no tempo de desenvolvimento dos insetos do que o PREP.C-Ia 1,0%, sugerindo a interferência da SBTX neste processo. Os dados apresentados mostram o efeito inseticida do PREP.C-Ia, desde que efeitos negativos foram observados sobre a emergência, ganho de peso e tempo de desenvolvimento do *C. maculatus*. Como o PREP.C-Ia corresponde a uma fração rica em SBTX, é provável que os efeitos detectados sejam oriundos da toxina. Particularmente, por ter sido observada uma maior influência negativa do PREP.C-Ia, em comparação com o extrato total e a F_{20-55%}, e, ainda, pelos efeitos terem sido dose-dependentes. Estes resultados corroboram com a hipótese de que a SBTX atua no mecanismo de defesa da soja contra fitófagos. Todavia, para que isto seja comprovado é necessária a utilização da toxina numa forma pura.

Resultados semelhantes foram observados para *C. maculatus* submetidos a dietas contendo a lectina tóxica da salsa (LTS), onde uma fração semi-purificada induziu maior toxicidade do que as frações prévias obtidas na purificação da LTS (Santos, 2001). A CNTX pode ser apresentada como exemplo de uma outra proteína com ação sobre este gorgulho, desde que ela foi capaz de inibir o crescimento larval de *C. maculatus* alimentados com dietas artificiais (Carlini *et al.*, 1997). Mais uma vez, os resultados aqui obtidos sugerem ser o genótipo BR-10 uma fonte promissora de genes codificadores de uma proteína tóxica atuante no

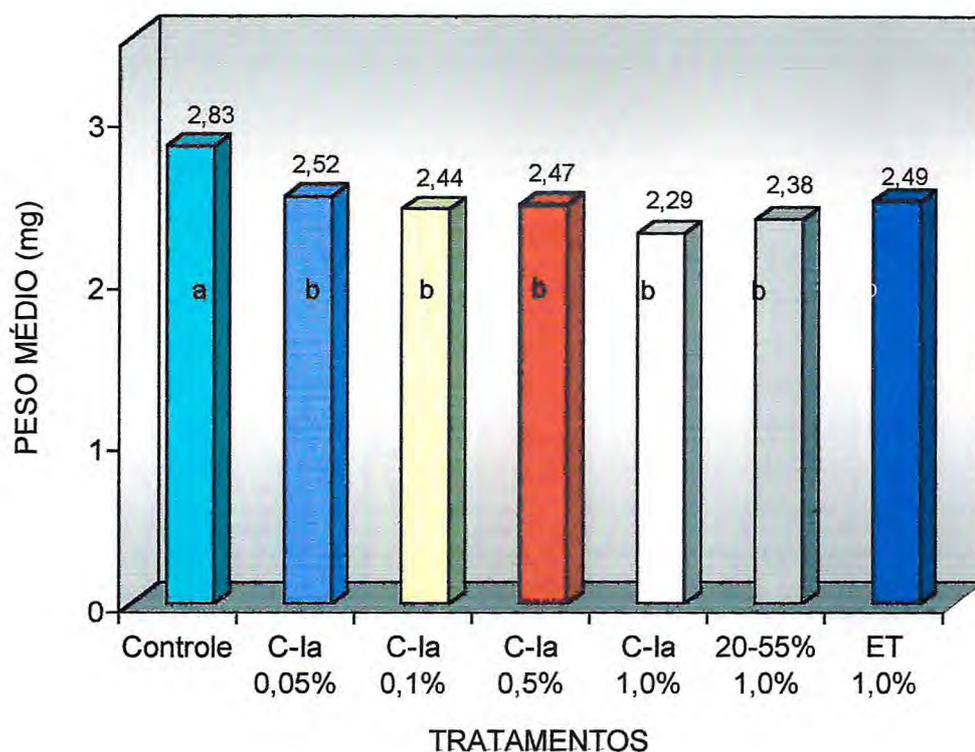


FIGURA 24 - Avaliação do efeito do extrato total (ET), da fração obtida por precipitação do ET com sulfato de amônio ($F_{20-55\%}$) e de uma fração rica em SBTX obtida em cromatografia em coluna de DEAE-celulose (PREP.C-la) sobre o peso médio de *Callosobruchus maculatus*, alimentados por 33 dias com dietas experimentais (0,05; 0,1; 0,5 e 1,0% PREP.Cla) e controle (farinha de sementes de feijão-de-corda). Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

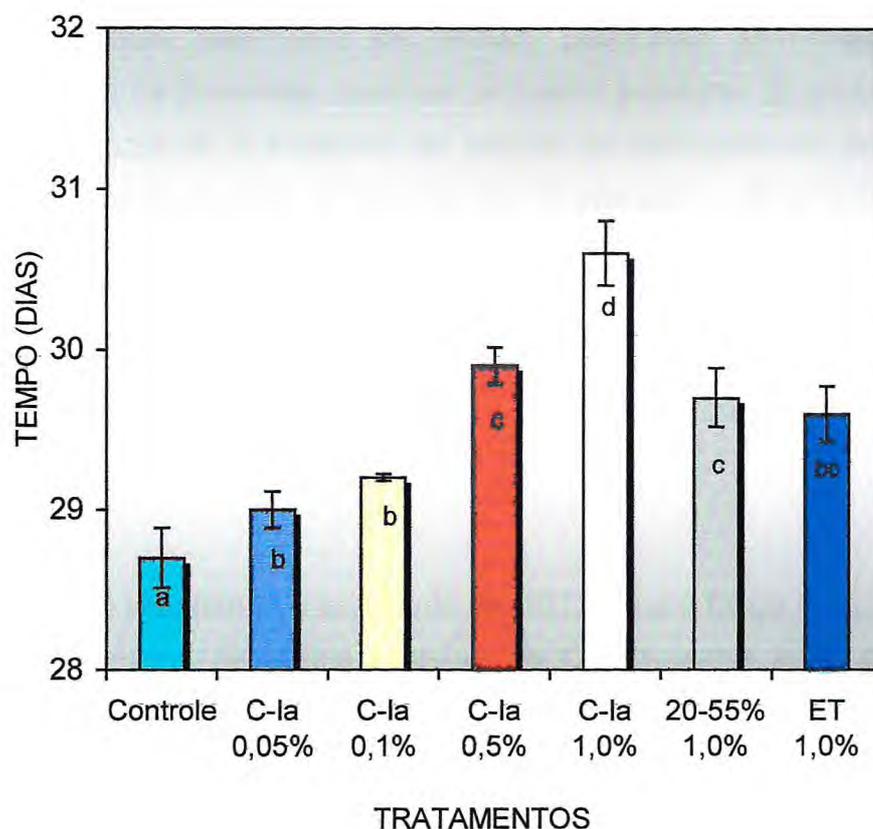


FIGURA 25 - Avaliação do efeito do extrato total (ET), da fração obtida por precipitação do ET com sulfato de amônio ($F_{20-55\%}$) e de uma fração rica em SBTX obtida em cromatografia em coluna de DEAE-celulose (PREP.C-la) sobre o tempo médio de desenvolvimento *Callosobruchus maculatus*, alimentados por 33 dias com dietas experimentais (0,05; 0,1; 0,5 e 1,0% PREP.Cla) e controle (farinha de sementes de feijão-de-corda). Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

ataque do coleóptero *C. maculatus*. Pesquisas focalizando o campo das toxinas vegetais constitutivas têm sido desenvolvidas com grande afinco por diversos grupos (Wittstock e Gershenzon, 2002). O gorgulho do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*) tem sido alvo de muitas pesquisas envolvendo atividades entomotóxicas de proteínas, como as lectinas e inibidores de proteases. Lectina de *Talysia esculenta* e inibidores de tripsina de *Dimorphandra mollis* induziram aumento no percentual de mortalidade de *C. maculatus* alimentados com dietas artificiais (Macedo *et al.*, 2002a; 2002b).

6.9 - Localização Tecidual da SBTX

Uma vez constatada a toxicidade de SBTX para o fungo *C. sojina* e sugerida atividade inseticida para esta proteína ao *C. maculatus* e *D. peruvianus*, foi resolvido analisar a distribuição desta toxina em plântulas germinadas, a partir de sementes do genótipo BR-10. Para isto, foram realizados ensaios qualitativos (PAGE-SDS e *Western blotting*) e quantitativos (ELISA), com o objetivo de encontrar dados que sinalizassem a participação da SBTX nos processos de defesa planta. Em paralelo, foram determinadas atividades inerentes a lectina (SBA) e aos inibidores de tripsina (SBTI) nos diferentes tecidos para, dentre outras finalidades, especular sobre uma possível ação protetora sinérgica destes compostos junto a SBTX. Sabe-se que, de maneira geral, nos primeiros dias de germinação da soja ocorre uma redução na concentração de fatores antinutricionais como SBA, SBTI e ácido fítico e, ainda, um aumento da viabilidade de minerais e vitaminas (Bau *et al.*, 1997).

6.9.1 - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida dos Tecidos Vegetais

Os perfis eletroforéticos das amostras de tecidos vegetais obtidos da germinação de BR-10 estão mostrados na FIGURA 26. Provavelmente, a banda protéica que aparece logo abaixo daquela de 29,0 kDa, característica da SBA, se refere a SBTX. Assim sendo, a SBTX parece estar presente em todos os tecidos vegetais, particularmente nas raízes e folhas, onde a visualização da banda protéica de 27,0 kDa foi mais evidente. Estes resultados sugerem a ocorrência de um acúmulo de SBTX nos diferentes tecidos vegetais durante os 12 dias do experimento, sugerindo a participação da SBTX na defesa da planta, já que estes tecidos são mais suscetíveis ao ataque por fitopatógenos e fitófagos.

6.9.2 - Atividade Hemaglutinante

Extratos vegetais preparados a partir de caules, raízes e folhas, coletados durante os diferentes dias de germinação não foram capazes de aglutinar eritrócitos de coelho, diferentemente dos cotilédones, cujos resultados estão mostrados na TABELA 9. Os resultados mostram que, embora a concentração de proteínas tenha diminuído com o passar dos dias, a atividade específica da lectina foi aumentando (de 8,30 para 42,10 UH/mgP), significando que esta proteína foi, de certa forma, preservada durante o decorrer da germinação (12 dias). Por outro lado, os dados correspondentes a UH/g de cotilédone mostram ter havido uma queda no teor de lectina nos cotilédones. Todavia, torna-se muito difícil fazer tal afirmativa, tendo em vista que o próprio ensaio utilizado na detecção da atividade hemaglutinante permite um erro de 50%. Além disso, foi tomado como base o peso fresco do cotilédone, podendo o teor de água ter influenciado na relação UH/g de cotilédone. Também, não se pode descartar a hipótese de que tenha havido, de fato, uma redução no teor de lectina nos cotilédones. Se isto foi o caso,

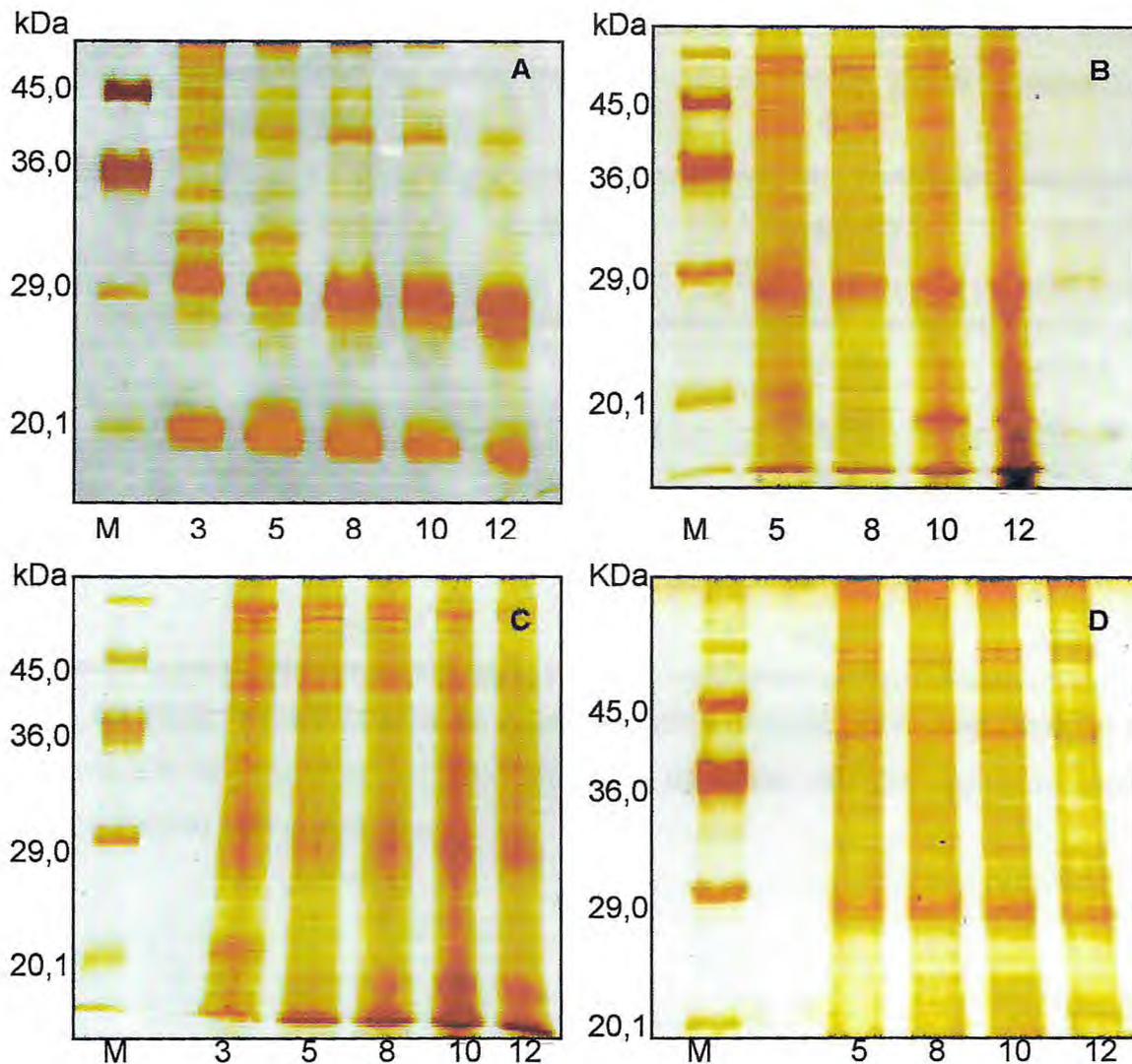


FIGURA 26 - Eletroforese em gel de poliacrilamida [17,5%] sob condições desnaturantes, na presença de β -mercaptoetanol, de tecidos vegetais obtidos durante a germinação de sementes do genótipo BR-10, revelada com prata. A, B, C, D - Cotilédones, caules, raízes e folhas, respectivamente. Raia 1 - Marcadores de massa molecular (albumina sérica bovina, 66,0 kDa; albumina do ovo, 45,0 kDa; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, 36,0 kDa; anidrase carbônica, 29,0 kDa; inibidor de tripsina de soja tipo Kunitz, 20,1 kDa e α -lactoalbumina, 14,2 kDa); Raias subseqüentes - dias de germinação.

TABELA 9 - Atividade hemaglutinante* de extrato de cotilédones obtidos durante a germinação de sementes do genótipo BR-10, frente a eritrócitos de coelho (2%)

Dia de germinação	UH/ml	mgP/ml	UH/mgP	UH/g cotilédone
3	256	30,85	8,30	459,5
5	256	25,53	10,00	261,7
8	256	14,78	17,30	421,7
10	256	18,80	13,60	368,8
12	256	6,08	42,10	279,7

* A atividade hemaglutinante foi expressa como unidade de hemaglutinação (UH). Uma UH corresponde ao valor recíproco da maior diluição capaz de provocar aglutinação visível a olho nu.

a utilização da lectina se deu em menor velocidade do que a das outras proteínas, uma vez que a atividade específica foi aumentando durante a germinação, como já mencionado anteriormente. Estudos mostraram que nos estágios iniciais de desenvolvimento, as lectinas estão localizadas nos corpos protéicos cotiledonares (Clarke e Wiseman, 2000). Bau e colaboradores (1997) demonstraram que sementes de soja após 4 dias de germinação exibiram somente 3,7% da atividade hemaglutinante induzida pelas mesmas sementes não germinadas.

6.9.3 - Atividade Inibidora de Tripsina

Extratos brutos obtidos a partir de cotilédones, raízes, caules e folhas durante a germinação do genótipo BR-10 foram capazes de inibir a tripsina, conforme mostrado na TABELA 10. Os teores mais elevados de inibidores de tripsina foram detectados nos cotilédones, particularmente nos primeiros dias após a germinação. Com exceção das folhas, os demais tecidos apresentaram redução nos teores de inibidores de tripsina durante o curso da germinação. A redução gradativa observada foi de 175,6 para 80,1 nos cotilédones; 72,2 para 1,7 nas raízes e 106,6 para 29,8 nos caules.

Diferentes papéis fisiológicos já foram propostos para os inibidores de proteases, como proteínas de reserva, reguladores de atividade proteolítica endógena envolvendo a maturação e germinação de sementes e participação na morte celular programada (Ryan, 1990; Solomon *et al.*, 1999). O processo de germinação degrada vagarosamente os inibidores de tripsina nos primeiros dias de desenvolvimento da plântula. Wilson e colaboradores (1988) observaram que o conteúdo total de inibidor de tripsina tipo Kunitz da variedade de soja Amsoy 71 sofreu declínio após 8 dias de germinação, sendo ainda detectado nos cotilédones após 14 dias. Os resultados obtidos com os ensaios de atividade inibidora de tripsina nos tecidos germinados de BR-10 revelaram que, durante os 12 dias de experimento, os inibidores estiveram presentes em níveis detectáveis e

TABELA 10 - Atividade inibidora de tripsina* presente em extrato bruto de cotilédone, raiz, caule e folha, obtidos durante a germinação de sementes do genótipo BR-10

Dia de germinação	Cotilédones	Raízes	Caules	Folhas
3	175,36 ± 1,41	72,29 ± 0,59	-	-
5	103,86 ± 0,71	17,20 ± 1,64	106,58 ± 0,69	8,60 ± 1,50
8	141,68 ± 1,38	7,94 ± 0,69	67,70 ± 3,40	5,90 ± 0,13
10	81,77 ± 0,47	3,86 ± 0,08	28,14 ± 1,80	6,47 ± 0,53
12	80,12 ± 0,50	1,63 ± 0,33	29,80 ± 2,03	19,07 ± 0,49

* A atividade inibidora de tripsina foi expressa como mg tripsina inibida por g de tecido vegetal (UI/gT).

concentrações variadas nos diferentes tecidos. Os níveis decrescentes de inibidores nos cotilédones, caules e raízes confirmaram a hipótese de degradação nos estágios iniciais de desenvolvimento. Porém, nas folhas, os inibidores tiveram seus teores aumentados com o passar dos 12 dias, sugerindo relevância de sua presença nesta parte do vegetal. Diferentemente da SBA, neste genótipo em particular, pode ser que o SBTI exerça efeito protetor sinérgico ao da SBTX contra o ataque de predadores, principalmente da parte aérea da planta.

6.9.4 - Detecção de SBTX nos Tecidos Vegetais por *Western Blotting*

A FIGURA 27 mostra os resultados obtidos por *Western blotting* de extratos de cotilédones, raízes, caules e folhas, obtidos a partir da germinação de sementes do genótipo BR-10, usando o anticorpo IgG anti-SBTX. O anticorpo policlonal anti-SBTX reconheceu uma banda de proteína presente nos extratos dos tecidos vegetais analisados, correspondente a SBTX. Nos cotilédones, a intensidade de revelação das bandas protéicas referentes a SBTX parece diminuir com o passar dos dias. Nas raízes e folhas, as intensidades das bandas protéicas relacionadas a SBTX foram mais fortes, principalmente nos tecidos foliares. A distribuição de uma dada proteína em diferentes partes da planta é, geralmente, usada como argumento a favor de uma função importante atribuída a esta proteína. Principalmente, se a localização se dá em partes da planta mais suscetíveis ao ataque de fitófagos e fitopatógenos, onde é atribuída uma função de defesa à proteína (Peumans e Van Damme, 1995). Assim, a presença da SBTX em diferentes partes da planta, corrobora com a hipótese de que esta toxina é uma proteína de defesa. Barcellos e colaboradores (1993) estudaram a distribuição de três diferentes proteínas, CNTX, Con A e canavalina, em *Canavalia ensiformis* durante a maturação de sementes, num período de 90 dias. Pela técnica de *Western blotting*, os autores observaram que as três proteínas em

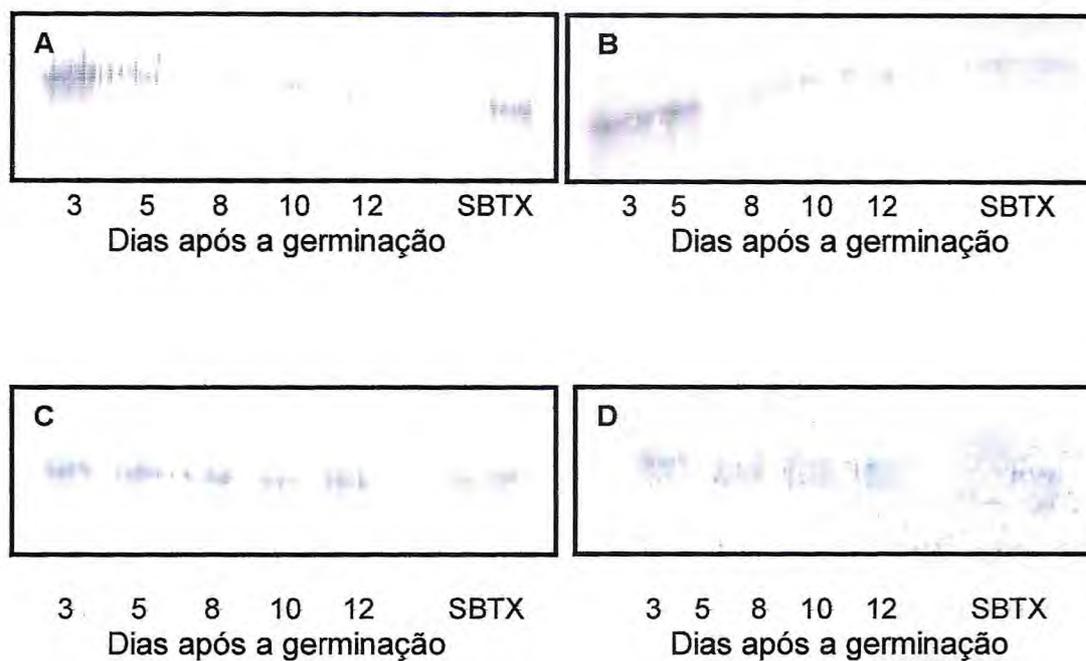


FIGURA 27 - *Western blotting* de tecidos vegetais obtidos durante a germinação de sementes do genótipo BR-10, revelados com substrato para fosfatase alcalina BCIP/NBT. A, B, C, D - Cotilédones, caules, raízes e folhas, respectivamente.

questão puderam ser detectadas nas sementes somente 30 dias após a germinação. Entretanto, traços de CNTX foram encontrados nos extratos de folhas de plantas com menos de 25 dias após antese. Os dados apontam para uma aparente relevância da presença de CNTX em tecidos foliares nos estágios iniciais de desenvolvimento da planta, semelhante ao ocorrido para SBTX. De maneira geral, os métodos imunquímicos têm sido de grande valia na investigação do papel fisiológico de vários compostos presentes nos vegetais (Brandom e Friedman, 2002).

6.9.5 - Quantificação de SBTX nos Tecidos Vegetais por ELISA

A FIGURA 28 apresenta os teores protéicos de SBTX obtidos a partir de cotilédones, raízes, caules e folhas de BR-10, detectados por ELISA, usando IgG anti-SBTX. As concentrações protéicas detectadas através da reação com IgG anti-SBTX nos cotilédones, raízes e caules foram gradativamente reduzidas com o passar dos dias. Por outro lado, nas folhas foi detectado um aumento na concentração de proteínas reconhecidas pelo anticorpo. Os resultados sugerem ter havido um acúmulo de SBTX nas folhas. Este dado reforça a função de defesa que tem sido sugerida para a SBTX, tendo em vista que a soja tem a sua parte aérea agredida pelos mais diversos organismos, tais como insetos, vírus, bactérias e fungos. O fungo *C. sojina*, por exemplo, possui como alvo os tecidos foliares (Yang e Weaver, 2001). Não se pode deixar de ressaltar que o anticorpo IgG anti-SBTX foi, também, capaz de reconhecer a SBA e o SBTI, ambos de fonte comercial, em testes realizados por ELISA, revelando a existência de reações cruzadas. Entretanto, estas reações foram consideradas de baixa intensidade. Reações estas não detectadas por Western blotting. Anticorpos produzidos contra alérgenos de soja e amendoim também geraram reações cruzadas significativas com compostos vegetais de diversas fontes (Eigenmann et al., 1996). Gonzalez e colaboradores (2000) utilizaram a técnica do

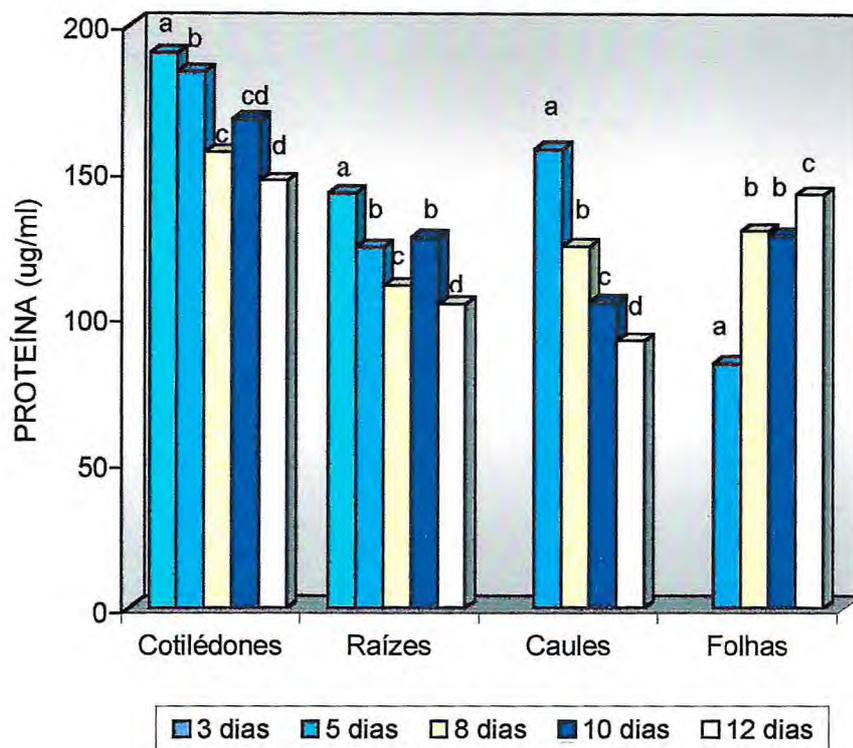


FIGURA 28 - Teores de toxina da soja (SBTX) nos tecidos vegetais obtidos durante a germinação de sementes do genótipo BR-10, detectados por ELISA, usando IgG anti-SBTX. Letras iguais representam valores que não diferiram significativamente ($p > 0,05$) pelo teste de Tukey.

ELISA para detectar e quantificar um alérgeno de sementes de soja em amostras sob suspeita de contaminação. A tecnologia empregada nos ensaios de ELISA permitiu uma rápida detecção quantitativa de compostos protéicos, assim como facilitou a investigação dos papéis fisiológicos destes na planta como um todo.

7. CONCLUSÕES



Em geral, o melhoramento genético realizado em sementes de soja [*Glycine Max* (L.) Merrill], de modo a combater o ataque por fitopatógenos, em particular o fungo *Cercospora sojina*, causador da mancha de olho-de-rã, não causou alterações significativas nos parâmetros bioquímicos analisados. Contudo, os conteúdos de toxinas detectados nos genótipos resistentes ao *C. sojina* foram mais elevados, especificamente no genótipo BR-10, o qual foi selecionado como fonte de obtenção da toxina da soja (SBTX).

A modificação feita na metodologia para purificação da SBTX resultou no maior rendimento da atividade tóxica e na obtenção da toxina numa forma pura, o que permitiu sua caracterização físico-química detalhada. De um modo geral, os dados obtidos resultaram na conclusão de que a SBTX trata-se de uma proteína distinta de todas as outras proteínas da soja já descritas. Esta toxina apresenta-se numa forma heterodimérica com massa molecular aparente de 44 kDa, composta por duas subunidades distintas, unidas por pontes dissulfeto. A natureza básica e glicoprotéica da SBTX foram comprovadas através de várias técnicas utilizadas.

A SBTX provavelmente é uma proteína de defesa. Os dados a favor desta hipótese são: 1. A capacidade da SBTX de inibir o desenvolvimento do fungo *Cercospora sojina*; 2. A toxicidade da SBTX para ninfas de *Dysdercus peruvianus*, induzindo além de redução dos percentuais de sobrevivência, redução no ganho de peso médio dos insetos; 3. Os efeitos tóxicos negativos sobre a emergência, ganho de peso e tempo de desenvolvimento de *Callosobruchus maculatus*, oriundos do consumo de uma fração rica em SBTX; 4) A localização tecidual da SBTX em várias partes da planta, tais como cotilédone, caule, folha e raiz e 5) O acúmulo de SBTX nas folhas, uma vez que a soja tem a sua parte aérea agredida pelos mais diversos organismos, tais como insetos, vírus, bactérias e fungos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. ALMEIDA, S. M., CABRAL, K. M. S., ZINGALI, R. B., KURTENBACH, E. Characterization of two novel defense peptides from pea (*Pisum sativum*) seeds. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, p. 278-286, 2000.
2. BAETHGEN, W. E., ALLEY, M. M. A manual colorimetric procedure for measuring ammonium nitrogen in soil and plant Kjeldhal digests. **Soil Science**, v. 20, p. 961-969, 1989.
3. BANDYOPADHYAY, S., ROY, A., DAS, S. Binding of garlic (*Allium sativum*) leaf lectin to the gut receptors of homoptera pests is correlated to its insecticidal activity. **Plant Science**, v. 161, p. 1025-1033, 2001.
4. BARCELLOS, G. B. S., ALMEIDA, L. A., MOREIRA, R. A., CAVADA, S.B., OLIVEIRA, J. T. A., CARLINI, C. R. Canatoxin, concanavalin A and canavalin-cross-reactive materials during maturation of *Canavalia brasiliensis* (Mart.) seeds. **Planta**, v. 189, p. 397-402, 1993.
5. BARKAI-GOLAN, R., MIRELMAN, D., SHARON, N. Studies on growth inhibition by lectins of *Penicillia* and *Aspergilli*. **Archives of Microbiology**, v. 116, p. 119-124, 1978.
6. BAU, H., VILLAUME, C., NICOLAS, J., MÉJEAN, L. Effect of germination on chemical composition, biochemical constituents and antinutritional factors of soya bean (*Glycine max*) seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 73, p. 1-9, 1997.
7. BESTWICK, C. S., BROWN, I. R., MANSFIELD, J. W. Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in Lettuce. **Plant Physiology**, v. 188, p. 1067-1078, 1998.

8. BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.
9. BOBROWSKI, V. L., PASQUALI, G., BODANESE-ZANETTINI, M. H., PINTO, L. M. N., FIUZA, L. M. Characterization of two *Bacillus thuringiensis* isolates from South Brazil and their toxicity against *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biological Control**, v. 25, p. 129-135, 2002.
10. BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and β -1,3-glucanase. In: **Molecular Plant Pathology: A Practical Approach**. Edited by S. J. GURR, M. J. Mc PHERSON, and D. J. BOWLES. Vol. II, 1992.
11. BOLLER, T. Biochemical analysis of chitinases and β -1,3-glucanase. In: **Molecular Plant Pathology**, S. J. GURR, M. J. Mc PHERSON, and D. J. BOWLES eds. IRL Press, New York, p. 23-29, 1993.
12. BOWLES, D. J. Defense-related proteins in higher plants. **Annual Review of Biochemistry**, v. 59, p. 873-907, 1990.
13. BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities for proteins utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
14. BRANDOM, D. L., FRIEDMAN, M. Immunoassays of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6635-6642, 2002.
15. BRASIL, I. C. F. Avaliação Bioquímica e Nutricional da Soja Comercial Submetida a Diferentes Processamentos. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 108 p., 2002.

16. BROADWAY, R. M., CALVIN, A. A. The influence of cabbage protease inhibitors, *in situ*, on the growth of larval *Tricoplusia ni* and *Pieris rapae*. **Journal of Chemistry and Ecology**, v. 18, p. 1009-1024, 1994.
17. CAMPELLO, C. C. Proteínas Antinutricionais e/ou Tóxicas de Genótipos de Soja [*Glycine max* (L.) Merr.] e sua Correlação com a Performance Nutricional de Frangos de Corte. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 198 p., 2003.
18. CARDONA, C., KORNEGAY, J., POSSO, C. E., MORALES, F., RAMIREZ, H. Comparative value of 4 arcelin variants in the development of dry bean lines resistant to the mexican bean weevil. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 56, p. 197-206, 1990.
19. CARLINI, C. R., GUIMARÃES, J. A. Isolation and characterization of a toxic protein from *Canavalia ensiformis* (jack bean) seeds, distinct from concanavalin A. **Toxicon**, v. 19, p. 667-676, 1981.
20. CARLINI, C. R., GROSSI-DE-SÁ, M. F. Plant toxic proteins with insecticidal properties. A review on their potentialities as bioinsecticides. **Toxicon**, v. 40, p. 1515-1539, 2002.
21. CARLINI, C. R., BARCELLOS, G. B. S., BAETA-NEVES, A. D. V., GUIMARÃES, J. A. Immunoreactivity for canatoxin and concanavalin A among proteins from leguminous seeds. **Phytochemistry**, v. 27, p. 25-30, 1988.
22. CARLINI, C. R., OLIVEIRA, A. E. A., AZAMBUJA, P., XAVIER-FILHO, J., WELLS, M. A. Biological effects of canatoxin in different insect models: evidence for a proteolytic activation of the toxin by insect cathepsin-like enzymes. **Journal of Economic Entomology**, v. 90, p. 72-80, 1997.

23. CHEONG, Y. H., KIM, C. Y., CHUN, H. J., MOON, B. C., PARK, H. C., KIM, J. K., LEE, S-H., HAN, C-D., LEE, S. Y., CHO, M. J. Molecular cloning of a soybean class III β -1,3-glucanase gene that is regulated both developmentally and in response to pathogen infection. **Plant Science**, v. 154, p. 71-81, 2000.
24. CHRISPEELS, M. J., GROSSI DE SA, M. F., HIGGINS, T. J. V. Genetic engineering with alpha-amylase inhibitors makes seeds resistant to bruchids. **Seed Science Research**, v. 8, p. 257-263, 1998.
25. CIOPRAGA, J., GOZIA, O., TUDOR, R., BREZUICA, L., DOYLE, R. *Fusarium* sp. Growth inhibition by wheat germ agglutinin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1428, p. 424-432, 1999.
26. CLARKE, E. J., WISEMAN, J. Developments in plant breeding for improved nutritional quality of soya beans II. Anti-nutritional factors. **Journal of Agricultural Science**, v. 134, p. 125-136, 2000.
27. CRUZ, M. A. L., GOMES, V.M., FERNANDES, K. V. S., MACHADO, O. L. T., XAVIER-FILHO, J. Identification and partial characterization of a chitinase and β -1,3-glucanase from *Copemicia cerifera* wax. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p.11-16, 2002.
28. CUSSAC, V., FERRERO, R. L., LABIGNE, A. Expression of *Helicobacter pylori* urease genes in *Escherichia coli* grown under nitrogen-limiting conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 174, p. 2466-2473, 1992.
29. DALY, H. V., DOYEN, J. T., EHRLICH, P. **Introduction to insect biology and diversity**, New York, McGraw-Hill Book Co., 1978.

30. DASHIELL, K. E., AKEM, C. N. Yield losses in soybeans from frogeye leaf spot caused by *Cercospora sojina*. **Crop Protection**, v. 30, p. 465-468, 1991.
31. DATTA, S. K., MUTHUKRISHNAN, S. **Pathogenesis-Related Proteins in Plants**, Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida. 1999.
32. DOERGE, D. R., DIVI, R. L., CHUCHWELL, M. I. Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases. **Analytical Biochemistry**, v. 250, p. 10-17, 1997.
33. DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350-356, 1956.
34. DURANTI, M., GIUS, C. Legume seeds: protein content and nutritional value. **Field Crops Research**, v. 53, p. 31-45, 1997.
35. EIGENMANN, P. A., BURKS, A. W., BANNON, G. A., SAMPSOM, H. A. Identification of unique peanut and soy allergens in sera adsorbed with cross-reacting antibodies. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 98, p. 969-978, 1996.
36. ESTRUCH, J. J., CAROZZI, N. B., DESAI, N., DUCK, N. B., WARREN, G. W., KOZIEL, M. G. Transgenic plants: an emerging approach to pest control. **Natural Biotechnology**, v. 15, p. 137-141, 1997.
37. FAO/WHO/UNU. Energy and protein requirements. Report of a joint FAO/WHO/UNU. **Technical Report Series 724**. WHO, Geneva, 1985.

38. FERREIRA-da-SILVA, C. T., GOMBAROVITS, M. E. C., MASUDA, H., OLIVEIRA, C. M., CARLINI, C. R. Proteolytic activation of canatoxin, a plant toxic protein, by insect cathepsin-like enzymes. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 44 (4), p. 162-171, 2000.
39. FERRERAS, J. M., BARBIERI, L., GIRBÉS, T., BATTELLI, M. G., ROJO, M. A., ARIAS, F. J., ASSUNCIÓN, R. M., SORIANO, F., MENDEZ, E., STIRPE, F. Distribution and properties of major ribosome-inactivating proteins (28S rRNA N-glycosidases) of the plant *Saponaria officinalis* L. (Caryophyllaceae). **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1216, p. 31-42, 1993.
40. FITCHES, E., GATEHOUSE, J. A. A comparison of the short and long-term effects of insecticidal lectins on the activities of soluble and brush border enzymes of tomato moth larvae (*Lacanobia oleracea*). **Journal of Insect Physiology**, v. 44, p. 1213-1224, 1998.
41. FOLLMER, C., BARCELLOS, G. B. S., ZINGALI, R. B., MACHADO, O. L. T., ALVES, E. W., BARJA-FIDALGO, C., GUIMARÃES, J. A., CARLINI, C. R. Canatoxin, a toxic protein from jack beans (*Canavalia ensiformis*), is a variant form of urease (EC 3.5.1.5): biological effects of urease independent of its ureolytic activity. **Biochemical Journal**, v. 360, p. 217-224, 2001.
42. FRANCO, O. L., RIGDEN, D. J., MELO, F. R., BLOCH, C. JR, SILVA, C. P., GROSSI DE SA, M. F. Activity of wheat alpha-amylase inhibitors towards bruchid alpha-amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal of Biochemistry**, v. 267(8), p. 2166-73, 2000.
43. FRIEDMAM, M., BRANDON, D. L. Nutritional and health benefits of soy proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1069-1086, 2001.

44. FRY, S. C. Formation of isodityrosine by peroxidases isozymes. **Journal of Experimental Botany**, v. 38, p. 3669-3675, 1987.
45. GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R. P. L., BATISTA, G. C., BERTI FILHO, E., PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A., ALVES, S. B., VENDRAMINI, J. D. **Manual de Entomologia Agrícola**. São Paulo, Editora Agronômica Ceres, 2ª Edição, 1988.
46. GATEHOUSE, J. A. Plant Resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytologist**, v. 156, p. 145-169, 2002.
47. GATEHOUSE, A. M. R., BOULTER, D. Assessment on the antimetabolic effects of trypsin inhibitors from cowpea (*Vigna unguiculata*) and other legumes on development of the bruchid beetle *Callosobruchus maculatus*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 34, p. 345-350, 1983.
48. GATEHOUSE, A. M. R., GATEHOUSE, J. A. Identifying proteins with insecticidal activity: Use of encoding genes to produce insect-resistant transgenic crops. **Pesticide Science**, v. 52, p. 165-175, 1998.
49. GATEHOUSE, A. M. R., GATEHOUSE, J. A., DOBIE, P., KILMINSTER, A. M., BOULTER, D. J. Biochemical basis of insect resistance in *Vigna unguiculata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 30, p. 948-958, 1979.
50. GATEHOUSE, A. M. R., BARBIERI, L., STIRPE, F., CROY, R. R. D. Effects of ribosome-inactivating proteins on insect development - differences between Lepidoptera and Coleoptera. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 54, p. 43-51, 1990.

51. GATEHOUSE, A. M. R., DAVIDSON, G. M., STEWART, J. N., GATEHOUSE, L. N., KUMAR, A., GEOGHEGAN, I. E., BIRCH, N. E., GATEHOUSE, J. A. Concanavalin A inhibits development of tomato moth (*Lacanobia oleracea*) and peach-potato aphid (*Myzus persicae*) when expressed in transgenic potato plants. **Molecular Breeding**, v. 5, p.153-166, 1999.
52. GERENDAS, J., POLACCO, J. C., FREYERMUTH, S. K., SATELMACHER, B. Significance of nickel for plant growth and metabolism. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 162 (3), p. 241-256, 1999.
53. GONZALEZ, R., DUFFORT, O., CALABOZO, B., BARBER, D., CARREIRA, J., POLO, F. Monoclonal antibody-based method to quantify Gly m 1. Its application to assess environmental exposure to soybean dust. **Allergy**, v. 55, p. 59-64, 2000.
54. GÖRG, A., OBERMAIER, O., BOGUTH, G., HARDER, A., SCHEIBE, B., WILDGRUBER, R., WEISS, W. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 21(6), p. 1037-1053, 2000.
55. GRANT, G. Plant lectins. In: **Secondary Plant Products: Antinutritional and beneficial actions in animal feeding**. CAYGILL, J. C., MUELLER-HARVEY, I (Ed.). Nottingham University Press, Nottingham, UK., p. 87-110, 1999.
56. GRIESHOP, C. M., FAHEY, Jr., G. C. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2669-2673, 2001.

57. GROSSI DE SA, M. F., CHRISPEELS, M. J. Molecular cloning of bruchid (*Zabrotes subfasciatus*) alpha- amylase cDNA and interactions of the expressed enzyme with bean amylase inhibitors. **Planta**, v. 207, p. 271-281, 1997.
58. HABERMEL, G. G. Secondary and tertiary metabolites as plant toxins. **Toxicon**, v. 36 (11), p. 1707-1719, 1998.
59. HAMERSTRAND, G. E., BLACK, L. T., GLOVER, J. D. Trypsin inhibitors in soy products: modification of the standard analytical procedure. **Cereal Chemistry**, v. 58, p. 42-45, 1981.
60. HARBOE, N., INGLID, A. Immunization, isolation of immunoglobulins, estimation of antibody titre. In: **A Manual Quantitative Immunoelectrophoresis**. AXELSEN, N. H. (Ed.). Blackwell Scientific Publications, London, p. 161-164, 1973.
61. HARPER, S. M., HOPKINS, T. L., CZAPLA, T. H. Effect of wheat germ agglutinin on formation and structure of peritrophic membrane in European corn borer (*Ostrinia nubilais*) larvae. **Tissue and Cell**, v. 30, p. 166-176, 1998.
62. HASDAI, A., NITSAN, Z., VOLCÁN, R., BIRK, Y. Growth, digestibility, and enzyme activities in the pancreas and intestines of guinea-pigs fed on raw and heated soya bean flour. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 62, p. 529-537, 1989.
63. HILDER, V. A., GATEHOUSE, A. M.R., POWELL, K. S., BOULTER, D. Proteins with insecticidal properties against homopteran insects and their use in plant protection. **World Intellectual Patent Organization Application No. WO 93/04177**, 1993.

64. HOPFER, U. Digestão e Absorção de Constituintes Nutricionais Básicos. In: **Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas**. DEVLIN, T. M. (Ed.) São Paulo. Ed. Edgard Blücher Ltda., p. 888-915, 1998.
65. ISHIMOTO M, CHRISPEELS M. J. Protective mechanism of the Mexican bean weevil against high levels of alpha-amylase inhibitor in the common bean. **Plant Physiology**, v. 111, p. 393-401, 1996.
66. KAPLAN, A. The determination of urea, ammonia and urease. In: GLICK D. (ed.), **Methods of Biochemical Analysis**. New York, John Wiley & Sons, p. 311-324, 1969.
67. KILARA, A., HARWALKER, V. R. Denaturation. In: **Food Proteins – Properties and Characterization**; NAKAI, S., MODLER, H. W. (Eds.). VCH Publishers, New York, p. 71-165, 1996.
68. KILEN, T. C., LAMBERT, L. Genetic control of insect resistance in soybean germplasm PI 417061. **Crop Science**, v. 38, p. 652-654, 1998.
69. KIM, H. S, YOON H, MINN I, PARK CB, LEE WT, ZASLOFF M, KIM SC. Pepsin mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to the strong antimicrobial peptide Buforin I. **Journal of Immunology**, v. 165, p. 3268-3274, 2000.
70. KIM, H. S., SNELLER, C. H., DIERS, B. W. Evaluation of soybean cultivars for resistance to Sclerotinia stem rot in field environment. **Crop Science**, v. 39, p. 64-68, 1999.
71. KOIWA, H., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M. Regulation of protease inhibitors and plant defense. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 379-384, 1997.

72. KRISHNAN, H. B. Characterization of a soybean [*Glycine max* (L.) Merr] mutant with reduced levels of kunitz trypsin inhibitor. **Plant Science**, v. 160, p. 979-986, 2001.
73. LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 679-685, 1970.
74. LAM, S. K., NG, T. B. Isolation of a small chitinase-like antifungal protein from *Panax notoginseng* (sanchi ginseng) roots. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 33, p. 287-292, 2001.
75. LECARDONNEL, A., CHAUVIN, L., JOUANIN, L., BEAUJEAN, A., PREVOST, G., SANGWAN-NORREEL, B. Effects of rice cystatin I expression in transgenic potato on Colorado potato beetle larvae. **Plant Science**, v. 140, p. 71-79, 1999.
76. LIENER, I. E. The intraperitoneal toxicity of concentrates of the soybean trypsin inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 183-188, 1951.
77. LIENER, I. E. Implications of antinutritional components in soyabean foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 34, p. 31-67, 1994.
78. LIENER, I. E., KAKADE, M. L. Protease inhibitors. In: LIENER, I. E. (ed.). **Toxic Constituents of Plant Foodstuff**. New York, Academic Press, 2nd ed., chapter 2, p. 7-71, 1980.
79. LIENER, I. E., PALLANSCH, M. J. Purification of a toxic substance from defatted soybean flour. **Journal of Biological Chemistry**, v. 197, p. 29-36, 1952.

80. MACEDO, M. L. R., FREIRE, M. G. M., NOVELLO, J. C., MARANGONI, S. *Talisia esculenta* lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1571, p. 83-88, 2002a.
81. MACEDO, M. L. R., MELLO, G. C., FREIRE, M. G. M., NOVELLO, J. C., MARANGONI, S., MATOS, D. G. G. Effect of a trypsin inhibitor from *Dimorphandra mollis* seeds on the development of *Callosobruchus maculatus*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 891-898, 2002b.
82. MEANS, F. J., NEUHAUS, J.M., SEPERISEN, C., RYALS, J. The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes. In BOLLER, T., MEINS, F., JR. (Eds.). **Genes Involved in Plant Defense**. Vienna, Springer-Verlag, New York, p. 245, 1992.
83. MELO, V. M. M. Lectina de cotilédones de *Luetzelburgia auriculata* DUCKE e seu papel na defesa da planta. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 164 p., 2001.
84. MENEZES, M., OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos Fitopatogênicos**. UFRPE, Imprensa Universitária, 277 p., 1993.
85. MERZ-DEMLOW, B. E., DUNCAN, A. M., WANGEN, K. E., XU, X., CARR. T. P., PHIPPS, W. R., KURZER, M. S. Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1462-1469, 2000.

86. MINNEY, B. H. P., GATEHOUSE, A. M. R., DOBIE, P., DENDY, J., CARDONA, C., GATEHOUSE, J. A. Biochemical-Bases Of Seed Resistance To *Zabrotes-Subfasciatus* (Bean Weevil) In *Phaseolus vulgaris* (Common Bean) - A Mechanism For Arcelin Toxicity. **Journal of Insect Physiology**, v. 36, p. 757, 1990.
87. MOREIRA, R. A., PERRONE, J. C. Purification and parcial characterization of a lectin from *Phaseolus vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 59, p. 783-787, 1977.
88. MORTON, R. L., SCHROEDER, H. E, BATEMAN, K. S, CHRISPPEELS, M. J, ARMSTRONG, E., HIGGINS, T. Bean alpha-amylase inhibitor 1 in transgenic peas (*Pisum sativum*) provides complete protection from pea weevil (*Bruchus pisorum*) under field conditions. **Proceedings in National Academy of Science of U.S.A.**, v. 97, p. 3820-25, 2000.
89. MURDOCK, L. L., SHADE, R. E. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6605-6611, 2002.
90. MURDOCK, L. L., BROOKHART, G., DUNN, P. E., FOARD, D. E., KELLEY, S., KITCH, L., SHADE, R. E., SHUKLE, R. H., WOLFSON, J. L. Cysteine digestive proteinases in Coleoptera. **Comp. Biochemistry Physiology**, v. 87B, p. 783-787, 1987.
91. NISSUM, M., FEIS, A., SMULEVICH, G. Characterization of soybean seed coat peroxidase: resonance Raman evidence for a structure-based classification of plant peroxidases. **Biospectroscopy**, v. 4, p. 355-364, 1998.

92. OLIVEIRA, J. T. A., MELO, V. M. M., CÂMARA, M. F. L., VASCONCELOS, I. M., BELTRAMINI, L. M., MACHADO, O. L. T., GOMES, V. M., PEREIRA, S. P., FERNANDES, C. F., NUNES, E. P., CAPISTRANO, G. G. G., MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O. Purification and physicochemical characterization of a cotyledonary lectin from *Luetzelburgia auriculata*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 301-310, 2002.
93. OSBORN, T. C., ALEXANDER, D. C., SUN, S. S. M., CARDONA, C., BLISS, F. A. Insecticidal activity and lectin homology of arcelin seed protein. *Science*, v. 240, p. 207-210, 1988.
94. OSUSKY, M., ZHOU, G., OSUSKA, L., HANCOCK, R. E., KAY, W. W., MISRA, S. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad spectrum resistance to phytopathogens. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 1162-1166, 2000.
95. PAULA, S. M. A. Análise comparativa das proteínas antinutricionais e/ou tóxicas em genótipos de feijão-de-corda susceptível e resistente ao *allsoybruchus maculatus* (FABR., 1972). **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)**, 128 p., 2003.
96. PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v. 109, p. 347-352, 1995.
97. PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. M. Prevalence, biological activity and genetic manipulation of lectins in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 132-138, 1996.
98. POLLACO, J. C., HOLLAND, M. A. Roles of urease in plant cells. **International Review of Cytology**, v. 145, p. 65-103, 1993.

99. PUSZTAI, A., BARDOCZ, S. Physiological role(s) of lectins in plants and the effects of their inclusion in the diet on the gut and metabolism of mammals. In: GUSTINE, D. L., FLORES, H. E. (eds.). **Phytochemicals and Health**, Rockville, American Society of Plant Physiologists Series, p. 179-191, 1995.
100. RABHÉ, Y., FERRASSON, E., RABESONA, H., QUILLIEN, L. Toxicity to the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* of antichymotrypsin isoforms and fragments of Bowman–Birk protease inhibitors from pea seeds. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 33, p. 299-306, 2003.
101. RAO, K. V., RATHORE, K. S., HODGES, T. K., FU, X., STOGER, E., SUDHAKAR, D., WILLIAMS, S., CHRISTOU, P., BHARANTHI, M., BOWN, D. P., POWELL, K. S., SPENCE, J., GATEHOUSE, A. M. R., GATEHOUSE, J. A. Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. **Plant Journal**, v. 15, p. 469-477, 1998.
102. RAO ARELLI, A. P., WILCOX, J. A., MYERS, O, GIBSON, P.T. Soybean germplasm resistant to races 1 and 2 of *Heterodera glycines*. **Crop Science**, v. 37, p. 1367-1369, 1997.
103. RICHARDSON, M. Seed storage proteins – The enzyme inhibitors. In: **Methods in Plant Biochemistry**. Academic Press, New York, p. 259-305, 1991.
104. REISSIG, J. L., SROMENGER, J. L., LELOIR, L. F. A modified colorimetric method for estimation of N-acetylamino sugars. **Biological Chemistry**, v. 217, p. 959-966, 1955.
105. ROBERTS, W. K., SELITRENNIKOFF, C. P. Plant cell and bacterial chitinase differ in antifungal activity. **Journal of Genetic Microbiology**, v. 134, p. 169-176, 1988.

106. ROSS, A. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plant. **Virology**, v. 13, p. 340-358, 1961. In: DATTA, S. K., MUTHUKRISHNAN, S. **Pathogenesis-Related Proteins in Plants**, Ed. CRC Press. Boca Raton, Florida. 1999.
107. ROWHANI, A., FALK, B. W. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). In: **Methods to certify pathogen (Virus)-free plants**. GAMBORG. O. L., PHILLIPS, G. C. (Eds.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, p. 266-280, 1995.
108. RYAN, C.A. Proteinase inhibitor gene families: strategies for transformation to improve plant defenses against herbivores. **Bioassays**, v. 10, p. 20-24, 1989.
109. RYAN, C. A. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, v. 28, p. 425-449, 1990.
110. SANTOS, L. F. L. Toxina da Salsa (*Ipomea asarifolia* R. et Schult.): Aspectos Bioquímicos, Estruturais, Funcionais e Potencial Biotecnológico, **Tese (Doutorado em Bioquímica)**, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza – Ceará, 142 p., 2001.
111. SANTOS, J. H. R., QUINDERÉ, M. A. W. Distribuição, importância e manejo das pragas do caupi no Brasil. In: ARAÚJO, J. P. P., WATT, E. E. (Eds.) **O caupi no Brasil**. Brasília: IITA/EMBRAPA, c. 21, p. 607-658, 1988.
112. SCHROEDER, H. E., GOLLASCH, S., MOORE, A. Bean alpha-amylase inhibitor confers resistance to the pea weevil (*bruchus-pisorum*) in transgenic peas (*Pisum-sativum* l). **Plant Physiology**, v. 107, p. 1233-1239, 1995.

113. SIEBRA, E. A. SBTX, Uma Nova Toxina Protéica das Sementes de Soja [*Glycine max* (L.) merr.] cv. BR-10. Isolamento e Caracterização. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)**. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza – Ce, 109 p. 1998.
114. SINGH, S. R., ALLEN, D. J. Pest, diseases, resistance and protection in cowpeas. In: SUMMERFIELD, R. J., BUTING, A. H. (Eds). **Advances in legume science**, 419 p., 1980.
115. SIQUEIRA, J. O., FRANCO A. A. **Biotecnologia do Solo: Fundamentos e Perspectivas**. Nagy Ltda., São Paulo, 236 p., 1988.
116. SOLOMON, M., BELENGHI, B., DELLEDONNE, M., MENACHEM, E., LEVINE, A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**, v. 11, p. 431-444, 1999.
117. SOUSA, D. O. B. Avaliação bioquímica e nutricional da soja [*Glycine max* (L) Merr.] cv. Seridó e Seridó-RCH. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica)** – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC, Fortaleza – Ceará, 102 p., 2001.
118. SPACKMAN, D. H., STEIN, N. H., MOORE, E. S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. **Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1190-1196, 1958.
119. STINTZ, A., HEITZ, T., PRASAD, V., WIEDEMANN-MERDINOGLU, S., KAUFFMANN, S., GEOFFROY, P., LEGRAND, M., FRITIG, B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. **Biochimie**, v. 75, p. 687-706, 1993.

120. STROBL, S., MASKOS, K., WIEGAND, G., HUBER, R., GOMIS-RUTH, F. X., GLOCKSHUBER, R. A novel strategy for inhibition of alpha-amylases: yellow meal worm alpha-amylase in complex with the Ragi bifunctional inhibitor at 2.5 Å resolution. **Structure**, v.6 (7), p. 911-921, 1998.
121. TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
122. TRIEBOLD, H. O. Quantitative Analysis with Applications to Agricultural and Food Products. **New York, USA, Van Nostrand Company**, 1946.
123. TUBARO, A., SOSA, S., CARBONATTO, M., ALTINIER, G., VITA, F., MELATO, M., SATAKE, M., YASUMOTO, T. Oral and intraperitoneal acute toxicity studies of yessotoxin and homoyessotoxins in mice. **Toxicon**, v. 41, p. 783-792, 2003.
124. ULVATNE, H., VORLAND, L. H. Bactericidal kinetics of three lactoferricins against *S. aureus* and *E. coli*. **Scandinavian Journal of Infectology Diseases.**, v. 33, p. 507-511, 2001.
125. URBANEK, H., KUZNIAK-GEBAROWSKA, E., HERKA, K. Elicitation of defense responses in bean leaves by *Botrytis cinerea* polygalacturonase. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 13 (1), p. 43-50, 1991.
126. VALENCIA, A., BUSTILLO, A. E., OSSA, G. E., CHRISPEELS M. J. Alpha-amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 30, p. 207-13, 2000.

127. VAN DAMME, E. J. M., BARRE, A., ROUGÉ, P., VAN LEUVEN, F., PEUMANS, W. J. Characterization and molecular cloning of *Sambucus nigra* agglutinin V (nigrinin b), a GalNac-specific type 2 ribosome-inactivating protein from the bark of elderberry (*Sambucus nigra*). **European Journal of Biochemistry**, v. 237, p. 505-513, 1996.
128. VAN LOON, L. C., VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 55, p. 85-97, 1999.
129. VAN PARIJS, J., JOOSEN, H. M., PEUMANS, W. J., GEUNS, J. M., VAN LAERE, A. J. Effect of the *Urtica dioica* agglutinin on germination and cell wall formation of *Phycomyces blakesleeanus* Burgeff. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1428, p. 424-432, 1992.
130. VASCONCELOS, I. M., CAVADA, B. S., MOREIRA, R. A., OLIVEIRA, J. T. A. Purification and partial characterization of a lectin from the seeds of *Dioclea guianensis*. **Journal of Food Biochemistry**, v. 15, p. 137-154, 1991.
131. VASCONCELOS, I. M., TRENTIM, A., GUIMARÃES, J. A., CARLINI, C. R. Purification and physicochemical characterization of soyatoxin, a novel toxic protein isolated from soybeans (*Glycine max*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 312, p. 357-366, 1994.
132. VASCONCELOS, I. M., SIEBRA, E. A., MAIA, A. A. B., MOREIRA, R. A., NETO, A. F., CAMPELO, G. J. A., OLIVEIRA, J. T. A. Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of Brazilian soybean (*Glycine max*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 75, p. 419-426, 1997.

133. VASCONCELOS, I. M., MAIA, A. A. B., SIEBRA, E. A., OLIVEIRA, J. T. A., CARVALHO, A. F. F. U., MELO, V. M. M., CARLINI, C. R., CASTELAR, L. I. M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 1-8, 2001.
134. VIEIRA, C. R., CABRAL, L. C., de PAULA, A. C. O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, p. 1277-1283, 1999.
135. WANG, Y., NELSON, R. L., HU, Y. Genetic analysis of resistance to soybean mosaic virus in four soybean cultivars from China. **Crop Science**, v. 38, p. 922-925, 1998.
136. WANG, X., THOMA, R. S., CARROLL, J. A., DUFFIN, K. L. Temporal generation of multiple antifungal proteins in primed seeds. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 292, p. 236-242, 2002.
137. WILSON, K. A., PAPASTOITSIS, G., HARTL, P., TAN-WILSON, A. L. Survey of the proteolytic activities degrading the Kunitz trypsin inhibitor and glycinin in germinating soybeans (*Glycine max*). **Plant Physiology**, v. 88, p. 355-360, 1988.
138. WITTSTOCK, U., GERSHENZON, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 300-307, 2002.
139. WURMS, K., LONG, P., GREENWOOD, D., SHARROCK, K., GANESH, S. Endo- exochitinase activity in kiwifruit infected with *Botrytis cinerea*, **Journal Phytopatology**, v. 145, p. 145-151, 1997.

140. YANG, W., WEAVER, D. B. Resistance to frog-eye leaf spot in maturity groups VI and VII of soybean germplasm. **Crop Science**, v. 41, p. 549-552, 2001.
141. YE, X. Y., WANG, H. X., Ng, T. B. Identification and partial characterization of a chitinase and β -1,3-glucanase from *Copemicia cerifera* wax. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 269, p. 155-159, 2000.
142. ZELLER, F. J. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.): utilization, genetics, biotechnology. **Bodenkultur**, v. 50 (3), p. 191-202, 1999.
143. ZHANG, J-hong, WANG, C-zhu, QIN, J-de. The interactions between soybean trypsin inhibitor and δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* in *Helicoverpa armigera* larva. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 75, p. 259-266, 2000.