

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

JOSÉ EDVAR MONTEIRO JÚNIOR

DETECÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEINASES CISTEÍNICAS EM RAÍZES DE
FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] E AVALIAÇÃO DE SUA
ATIVIDADE SOBRE O NEMATÓIDE DAS GALHAS *Meloidogyne javanica*

FORTALEZA-CEARÁ

2007

JOSÉ EDVAR MONTEIRO JÚNIOR

DETECÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEINASES CISTEÍNICAS EM RAÍZES DE
FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] E AVALIAÇÃO DE SUA
ATIVIDADE SOBRE O NEMATÓIDE DAS GALHAS *Meloidogyne javanica*

Dissertação submetida à coordenação do programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. José Tadeu A. de Oliveira

FORTALEZA-CEARÁ

2007

M777d

Monteiro-Júnior, José Edvar

Detecção de inibidores de proteinases cisteínicas em raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] e avaliação de sua atividade sobre o nematóide das galhas *Meloidogyne javanica* / José Edvar Monteiro Júnior
107 f. il., color. enc.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
Orientador: Prof. Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Área de Concentração: Bioquímica Vegetal

1. *Vigna unguiculata*, 2. Inibidores de proteinases cisteínicas, 3. *Meloidogyne javanica*, I . Oliveira, José Tadeu Abreu de, II. Universidade Federal do Ceará (UFC) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, III. Título

CDD.574.192

JOSÉ EDVAR MONTEIRO JÚNIOR

DETECÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEINASES CISTEÍNICAS EM RAÍZES DE
FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] E AVALIAÇÃO DE SUA
ATIVIDADE SOBRE O NEMATÓIDE DAS GALHAS *Meloidogyne javanica*

Dissertação submetida à coordenação do programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.




José Edvar Monteiro Júnior


Dissertação Aprovada em:

09-11-2007


BANCA EXAMINADORA



Dr. José Tadeu Abreu de Oliveira
Universidade Federal do Ceará
Orientador



Dr. Benildo de Souza Cavada
Universidade Federal do Ceará
Examinador



Dr. Francisco das Chagas de Oliveira Freire
EMBRAPA/Agroindústria Tropical
Examinador

*A Deus, em primeiro lugar,
Meus grandes avós, Luiz Moura e Luíza de Marilac,
Meus amados pais, Isabel Cristina e Edvar Monteiro,
Meus queridos irmãos, Moura Neto, Carlos André, Rosana
Cristina e Kélvia Kélem
E à Simone Martins, cujo amor, carinho e presença
foram, são e sempre serão indispensáveis na minha vida...*

...Dedico com sincera gratidão e respeito...

*“É chato chegar a um objetivo num instante...
...Eu prefiro ser esta metamorfose
ambulante...”*

*----- *Raul Seixas* -----*

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo gostaria de enfatizar meu agradecimento a Deus, visto que, do meu ponto de vista, Ele sempre se faz presente, direta ou indiretamente nas nossas vidas, dando-nos a possibilidade de traçarmos os mais diversificados caminhos estando, porém, sempre nos vigiando e aguardando que precisemos de sua mão.

Ao professor Dr. José Tadeu, pelo apoio dado durante todo o desenvolvimento deste trabalho e pelos muitos ensinamentos passados não só a mim, mas a todos os membros do laboratório 1085. Ensinamentos estes muitas vezes transmitidos, não por palavras, mas por sua postura, sempre muito séria, criteriosa e honesta, quanto à pesquisa e ao ensino.

Aos membros compositores da banca examinadora deste trabalho, Dr. Francisco das Chagas de Oliveira Freire, pesquisador da EMBRAPA/Agroindústria Tropical e o professor Dr. Benildo de Souza Cavada, professor adjunto do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Ceará, por, tão prontamente, terem aceitado o convite para participação da banca examinadora e pelas pertinentes contribuições dadas ao presente trabalho.

Gostaria de agradecer aos professores do Departamento de Bioquímica, primeiramente, à professora Dra. Ilka Maria Vasconcelos, pelo trabalho em conjunto realizado com nosso laboratório, consistindo, não só, do empréstimo de equipamentos e reagentes, como também, de sua participação e de seus estudantes em seminários envolvendo ambos os laboratórios, onde a troca de sugestões, sempre representou importante contribuição em nossas atividades acadêmicas. Gostaria de agradecer também a todos os estudantes de seu laboratório, desde aqueles que já concluíram seus trabalhos e estão em outras atividades, até os atuais integrantes.

Aos professores, Dr. Enéas Gomes, Dr. Joaquim Albenízio e Dr. Joaquim Enéas, pelas muitas vezes que nos ampararam cedendo, sem hesitar, ou a casa de vegetação, para realização dos plantios de feijão, ou ainda, equipamentos como, centrífuga, liofilizador e reagentes, sempre sem nenhuma burocracia. Muito obrigado, aos professores e estudantes que compõem os laboratórios, por eles, administrados.

Ao professor Dr. Francisco Campos “Professor Chico” sempre bastante comprometido com seu papel de pesquisador e a todos os membros de seu laboratório, em especial ao amigo, Tiago Lustosa, cuja convivência, desde os tempos de infância, foi sempre agradável e amistosa.

Aos demais professores e funcionários, em especial à Marisa e ao secretário Márcio, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Aos vários amigos que tive a oportunidade de fazer, desde o período do Curso de Ciências Biológicas e continuaram comigo na Bioquímica, Ygor Raphael, Thiago Eduardo, Carlos Eduardo (Sagat), Cléverson Diniz e Janne Keila, amigos com quem convivo há mais de seis anos e sempre se mostraram excelentes pessoas de se conviver. A todos vocês, muito obrigado.

Aos colegas do Laboratório 1085 – Proteínas Vegetais de Defesa: Vaneska, Magaline, Vadjah, Débora, Ivina, Haíssa, Lara, Gabriela, Aline, Ygor Raphael, Thiago Eduardo, Adem Tabosa, Júlio, Edson, Germano, Vladimir, Fredy, Fernando, Gina, Sílvio, Ana Lúcia, Betânia, Hévila, Eduardo, Alethéia, Mayra, Hélio, Cléberson Fernandes e Simone Martins, que direta ou indiretamente, não só contribuíram na realização deste trabalho, mas, acima de tudo, proporcionaram momentos de descontração, harmonia e amizade, sem falar das diversas confraternizações do grupo, muito obrigado. Foi ainda neste ambiente que pude tirar o que considero ser a maior de todas as lições do mundo acadêmico: aprender a aprender!

A Simone Martins merece agradecimentos à parte. Ela foi a pessoa que me acompanhou desde que entrei no laboratório, na iniciação científica, até mesmo, durante o mestrado. Acho que 90 % do que aprendi durante esta caminhada, tem a participação direta da Simone, portanto, muito do trabalho aqui realizado teve sua contribuição. Na maioria das vezes esta contribuição não se restringiu apenas aos trabalhos de bancada, mas também consistiu da discussão de resultados, planejamento de experimentos, preparo de trabalhos para congressos, apoio nas horas de tristeza e desânimo e o mais importante, uma companhia sincera, amigável e inseparável, que comumente transpassava as barreiras do trabalho. Muito obrigado Simone, de coração.

Não posso deixar de falar da minha família. Agradeço muito a meus pais, Edvar Monteiro e Isabel Cristina, dois exemplos de perseverança e honestidade, que foram os pilares onde minha educação e a de meus irmãos, Moura Neto, Carlos André, Rosana Cristina e Kélvia Kélem, foi plenamente construída. Agradeço em especial às minhas tias Tereza e Olindina e meu tio Roberto Sérgio, que diretamente sempre têm dado muito apoio a minha família. Aos meus avós Luiz Moura, que já partiu desta vida, e Luíza de Marilac, que sempre estiveram presentes em minha vida. Por fim, agradeço a todos os meus amigos, tios, primos e outros parentes aqui não listados.

Este Trabalho foi realizado graças ao auxílio e recursos financeiros das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de Pós-graduação concedida ao autor desta dissertação, através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Conselho Nacional Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de convênio com o Programa de Pós-graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico Pesquisa (FUNCAP), através de convênio com o Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará.

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

RESUMO

DETECÇÃO DE INIBIDORES DE PROTEINASES CISTEÍNICAS EM RAÍZES DE FEIJÃO-DE-CORDA [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] E AVALIAÇÃO DE SUA ATIVIDADE SOBRE O NEMATÓIDE DAS GALHAS *Meloidogyne javanica*

A detecção de inibidores de proteinases cisteínicas em raízes de feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) Walpers] bem como o acúmulo de frações ricas nestes inibidores por meio de precipitação com sulfato de amônio seguida de cromatografia líquida de fase reversa foram realizados no presente trabalho. Frações contendo os maiores níveis de atividade de inibidores de proteinases cisteínicas foram selecionadas e sujeitas à avaliação de sua habilidade em suprimir a mobilidade de juvenis de segundo estágio (J2) do nematóide das galhas *Meloidogyne javanica*, raça 1. Em adição o efeito nematicida destas também foi avaliado. Quanto ao parâmetro mobilidade, a fração F 30/60 precipitada com sulfato de amônio, numa dose de 40 µg de proteínas, mostrou ser a mais potente de todas as amostras testadas, às 24 h de incubação. No entanto, com relação à mortalidade ambos os picos PIHPLC e PIIHPLC, obtidos dos passos de HPLC, foram os mais ativos causando um percentual de mortes de nematóides de 95,0 e 94,7 %, respectivamente, quando as doses mais potentes destes picos foram comparadas. Além disso, a fração F 30/60 acoplada a FITC foi usada em experimentos de microscopia de luz-fluorescência para responder as seguintes questões: 1) Estariam os efeitos observados sobre a mobilidade e mortalidade relacionados à ligação das proteínas no nematóide? e 2) Se sim, esta interação é realizada com a superfície do nematóide ou seu intestino, ou com ambas estruturas? A fração F 30/60 parece ser incorporada pelos juvenis e ligar-se especificamente à região correspondente ao intestino dos nematóides às 6 h após incubação, enquanto que às 24 h após incubação o complexo fluorescente parece se dispersar ao longo de todo o corpo do nematóide, como observado pela microscopia de luz-fluorescência. Estes resultados, somados, sugerem o possível uso dos inibidores presentes em raízes de feijão-de-corda como ferramentas biológicas potenciais no controle do nematóide das galhas, *M. javanica*.

Palavras-Chave: Feijão-de-corda, *Meloidogyne javanica*, nematóides das galhas, inibidores de proteinases cisteínicas.

ABSTRACT

DETECTION OF CYSTEINE PROTEINASE INHIBITORS IN COWPEA [*Vigna unguiculata* (L.) Walpers] ROOTS AND EVALUATION OF ITS ACTIVITY ON THE ROOT-KNOT NEMATODE, *Meloidogyne javanica*

Detection of cysteine proteinase inhibitors in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walpers] roots as well as the accumulation of inhibitors enriched fractions through ammonium sulfate precipitation followed by reversed-phase liquid chromatography were in this present work accomplished. Fractions containing higher levels of cysteine proteinase inhibitor activity were selected and subjected to evaluation of its ability of to suppress the mobility of second stage juveniles (J2) of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*, race 1. In addition, the nematicidal effect of these fractions was also tested. When the mobility parameter was analyzed the ammonium sulfate precipitated F 30/60 fraction, at a dose of 40 µg of proteins, it shown to be the most potent of all tested samples at 24 h after incubation. However, regarding to mortality the both picks, PIHPLC and PIIHPLC, obtained from the HPLC step were the more actives causing a percentage of killing nematodes of 95.0 % and 94.2 %, respectively when the most potent doses of these picks were compared. Moreover, FITC-coupled F 30/60 fraction was used in light-fluorescence microscopy experiments in order to answer the following basic questions: 1) the observed effects on mobility and mortality will be related to the binding of the proteins in the nematode? And 2) If yes, this interaction is performed with the gut or surface nematode, or yet in the both structures? F 30/60 fraction appears to be incorporated by juveniles and specifically bind to the region corresponding to the gut of nematodes at 6 h after incubation, while at 24 h after incubation the fluorescent complex appears to be widespread along the whole body of the nematode, as observed by light-fluorescence microscopy. These results, all together, suggest the possible use of the inhibitors present in cowpea roots as a potential biological tool in the control of the root-knot nematode, *M. javanica*.

Key-words: Cowpea, *Meloidogyne javanica*, root-knot nematode, cysteine proteinase inhibitors.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Página
1	<p>Interação entre o produto, <i>AVR</i>, do gene de avirulência do patógeno e o produto, <i>R</i>, do gene de resistência da planta. Nesta interação, fenômenos como o acúmulo rápido e transiente de ROS, que culminarão no desencadeamento da resposta hipersensitiva (HR), estão tipicamente envolvidos. Além disso, moléculas capazes de se translocarem sistemicamente pelos tecidos vegetais, como o ácido salicílico (SA), também são acumuladas durante a interação, <i>Avr - R</i>. Alteração na expressão gênica levando à síntese de proteínas de defesa e o estabelecimento de um estado de imunidade sistêmica caracterizam a SAR, que seria uma conseqüência final de todo o processo. As pontuações amareladas destacadas pelo número 1, dentro de um quadrado, nas folhas da planta da esquerda, são um sinal macroscópico típico da HR.</p>	4
2	<p>Desenho esquemático de uma planta de Feijão-de-corda [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walpers]. Notar a anatomia de vagens e flores, típicas de plantas leguminosas e os rizóbios fixadores de N₂ associados às raízes (Retirado de http://www.iita.org/cms/articlefiles/269-cowpea.jpg).</p>	14
3	<p>Sistema radicular de plantas de feijão-de-corda, genótipo TE 97 411 1-E, susceptível a <i>M. incognita</i>. As plantas das figuras acima foram cultivadas e inoculadas com <i>M. incognita</i> raça 1, em nosso laboratório. Notar as regiões drasticamente espessadas, galhas, que caracterizam a infecção por nematóides do gênero <i>Meloidogyne</i> (A). Detalhe de uma região da raiz evidenciando a presença de várias galhas amontoadas (B).</p>	17
4	<p>Plantio de Feijão-de-corda [<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.], genótipo CE-31, em casa de vegetação. As plantas da figura apresentam vinte dias de idade.</p>	24
5	<p>Aspecto de massas de ovos de <i>M. incognita</i>, após coloração com fucsina ácida. Todo o procedimento de plantio, inoculação, coloração e remoção de fêmeas e massas de ovos foi realizado em nossa casa de vegetação. A- Massas de ovos em raízes de quiabo, cultivar, Santa Cruz 47. B- Massas de ovos em raízes de tomateiro, cultivar, Santa Adélia. A seta vermelha (A) indica uma fêmea, propositalmente, retirada de uma galha e disposta sobre a raiz enquanto as setas azuis (A e B) indicam massas de ovos. Apesar de os experimentos, neste trabalho, terem sido realizados com <i>M. javanica</i>, tanto o formato das massas de ovos, como das fêmeas é bastante semelhante entre espécies do gênero <i>Meloidogyne</i>.</p>	35
6	<p>Método para obtenção de juvenis de segundo estágio (J2) de <i>M. javanica</i>. As setas indicam as massas de ovos de <i>M. javanica</i>, previamente coradas com fucsina ácida. Antes de serem utilizadas para eclosão de juvenis as massas de ovos foram submetidas à assepsia superficial em solução de hipoclorito de sódio. Tanto o hipoclorito como a fucsina residual foram removidos por lavagens posteriores em água destilada. Só então estas massas foram dispostas em câmaras de eclosão.</p>	37

7	Desenho esquemático ilustrando os diferentes passos referentes aos ensaios de avaliação da capacidade dos inibidores de proteinases cisteínicas de raízes de feijão-de-corda em alterar a mobilidade de J2 de <i>M. javanica</i> e/ou causarem mortalidade destes.	39
8	Desenho esquemático representando os passos envolvidos desde o processo de conjugação do isotiocianato de fluoresceína às proteínas presentes na fração F 30/60, até as análises microscópicas. Para descrição mais detalhada ver texto.	41
9	Atividade inibitória de proteinases cisteínicas de extratos totais de raízes de feijão-de-corda submetidos a diferentes tratamentos térmicos, por diferentes períodos de tempo. A – atividade de extratos aquecidos por cinco minutos; B – atividade de extratos aquecidos por dez minutos; C – atividade de extratos aquecidos por quinze minutos e D – atividade de extratos aquecidos por vinte minutos. Em todos os casos a atividade está expressa em termos de unidade de atividade inibitória por miligrama de proteína (UAI/mgP), atividade específica. A temperatura de 100 °C representa temperatura de fervura que consistiu, a rigor, em temperatura de 96 ± 2 °C.	44
10	Curvas de inibição da atividade papainásica expressas em função da redução da absorbância, no comprimento de onda de 540 nm. Alíquotas de 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 µL de extratos totais de raízes de feijão-de-corda, em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0; tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21; tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,1 e tampão glicina-NaOH, 0,05 M, pH 9,8, foram incubadas com volumes de papaína pré-estabelecidos com base em curvas de atividade da enzima.	46
11	Atividade inibitória de proteinases cisteínicas de raízes de feijão-de-corda submetidas à extração em tampão fosfato de 0,05 M, pH 6,0; tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21; tampão Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,1 e tampão glicina-NaOH, 0,05 M, pH 9,8. A – atividade por mililitro; B – atividade específica e C – atividade por grama de massa fresca de raiz. O tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, baseado nos critérios A e C, foi selecionado como tampão ideal para extração de inibidores de proteinases cisteínicas.	47
12	A – Massa média do sistema radicular de plantas de feijão-de-corda, genótipo CE-31, coletadas 10, 15, 20 e 25 DAP. Notar que esta figura evidencia a massa média de uma única raiz, ao longo dos diferentes tempos de coleta. B – Proteínas solúveis totais por massa total média de uma raiz. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas, de acordo com o teste de Tukey, a nível de significância de 0,05 %.	49
13	Atividade inibitória de proteinases cisteínicas de extratos totais de raízes de feijão-de-corda coletadas aos 10, 15, 20 e 25 DAP. Atividade por mililitro (A), atividade específica (B), atividade por grama de massa fresca de raízes (C). Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas, de acordo com o teste de Tukey, a nível de significância de 0,05 %.	50
14	Atividade inibitória de proteinases cisteínicas total, ao longo de, 10, 15, 20 e 25 DAP. Notar que, apesar de o tempo de 20 DAP apresentar atividade	51

estatisticamente semelhante ao tempo de 15 DAP, uma tendência de aumento crescente na atividade inibitória é observada. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas, de acordo com o teste de Tukey, a nível de significância de 0,05 %.

15 Proteínas solúveis totais oriundas de raízes de feijão-de-corda. E B - extrato bruto não fervido, Ebf - extrato bruto fervido, 0/30, 30/60, 60/90, 0/60 e 0/90 são as frações obtidas por fracionamento dos extratos brutos fervidos, com sulfato de amônio. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas, de acordo com o teste de Tukey, a nível de significância de 0,05 %. 53

16 Atividade inibitória de proteinases cisteínicas (esferas vermelhas) versus proteínas totais (barras verticais). A elevada atividade nos extratos totais, em comparação com as diferentes frações, pode indicar a possível presença de inibidores de proteinases cisteínicas de natureza não-protéica. As letras minúsculas referem-se à estatística (Teste de Tukey) utilizada na comparação de médias de proteínas totais e as letras maiúsculas referem-se à estatística utilizada na comparação de médias da atividade inibitória por miligrama de proteína, com nível de significância de 0,05 %. 54

17 Atividade inibitória de proteinases cisteínicas, expressa em função de 1 (um) grama de massa fresca de raiz (esferas azuis), versus proteínas, também expressas por grama de massa fresca (barras verticais). Notar que os maiores níveis de inibidores são concentrados nas frações F 30/60 e F 60/90. Este dado foi bastante importante na seleção destas duas frações para realização dos experimentos posteriores. As letras minúsculas referem-se à estatística (Teste de Tukey) utilizada na comparação de médias de proteínas totais e as letras maiúsculas referem-se à estatística utilizada na comparação de médias da atividade inibitória por grama de massa fresca, com nível de significância de 0,05 %. 55

18 Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %), na presença de SDS, das proteínas solúveis totais de raízes de feijão-de-corda, genótipo CE-31. M – Marcadores de massa molecular: Fosforilase b (97 KDa), albumina (66 KDa), ovoalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina (20 KDa) e α -lactoalbumina (14,4 KDa). Ebf: extrato bruto fervido, 0/30, 30/60, 60/90, 0/90 e 0/60 frações advindas da precipitação do extrato bruto fervido com sulfato de amônio. Aproximadamente, 3,97 μ g de proteína foram aplicados em cada poço. As proteínas foram reveladas por impregnação do gel com nitrato de prata. 56

19 Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %), na presença de SDS, evidenciando degradação aparente de proteínas após aplicação da fração F 60/90 em coluna de afinidade, Papaína-Sepharose. 1 - extrato bruto, 2 - extrato bruto fervido, 3 - F 60/90 repetição 1, 4 - F 60/90 repetição 2, 5 - F 60/90 repetição 3, 6 - pico não retido, 7 - pico retido (tubo de maior leitura, a 280 nm, com atividade), 8 - pico retido (segundo tubo de maior leitura, a 280 nm, com atividade) e 9 - marcadores de massa molecular: Fosforilase b (97 KDa), albumina (66 KDa), ovoalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina (20 KDa) e α -lactoalbumina (14,4 KDa). A seta mais inferior, raia 6, evidencia a presença de uma banda ou grupo de bandas na altura do marcador de 20 KDa que não interagem com a papaína. Cerca de 3,0 μ g de proteínas foram aplicados nos poços. As proteínas foram reveladas por impregnação do gel 58

- com nitrato de prata.
- 20 Cromatograma típico de uma aplicação de F 30/60 em coluna de interação hidrofóbica, Phenyl-Sepharose. Aproximadamente, 5 mg de proteínas foram aplicadas na coluna. O pico 1 foi eluído por simples passagem do tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 0,05 M pH 7,21 contendo sulfato de amônio 1,0 M). Os demais picos foram eluídos por meio da aplicação de concentrações decrescentes (ver setas no gráfico) de sulfato de amônio até aplicação de água. A água tem a capacidade de eluir as moléculas que apresentam maior caráter hidrofóbico. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL.min⁻¹ e o volume coletado, 3,0 mL por tubo. 59
- 21 Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %), na presença de SDS, evidenciando o perfil de bandas protéicas correspondentes aos picos eluídos da coluna de interação hidrofóbica, Phenil-Sepharose. O pico eluído com 0,75 M de sulfato de amônio (segunda raia da esquerda para a direita) figura A, chamou a atenção pela presença de uma banda bastante proeminente destacada na figura B, seta. Aproximadamente, 1,0 µg de proteína foi aplicado em cada poço. As proteínas foram reveladas por impregnação do gel com nitrato de prata. 61
- 22 Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0 %), na presença de SDS, do Pico 2, eluído da coluna de interação hidrofóbica, Phenyl sepharose, com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, contendo sulfato de amônio, 0,75 M. Raia 1, marcadores de massa molecular: Fosforilase b (97 KDa), albumina (66 KDa), ovoalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina (20 KDa) e α-lactoalbumina (14,4 KDa) , raia 2, pico 2 (F 30/60 eluída com 0,75 M de sulfato de amônio). Cerca de 0,5 µg de proteína foi aplicado no gel. As proteínas foram reveladas por impregnação do gel com nitrato de prata. 62
- 23 Atividade Inibitória de proteinases cisteínicas de picos provenientes da aplicação de F 30/60 em coluna de interação hidrofóbica, Phenyl-Sepharose. A- Atividade específica dos picos eluídos da coluna de interação hidrofóbica. B- Atividade inibitória de proteinases cisteínicas representada pelo percentual de inibição da atividade papainásica. A eluição foi realizada por aplicação de concentrações decrescentes de sulfato de amônio. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 representam os picos eluídos com 1,0; 0,75; 0,5; 0,0 M de sulfato de amônio e Água Grau Milli-Q, respectivamente. *F30/60, corresponde à fração aplicada na coluna. Notar o elevado aumento obtido na atividade específica dos picos 1 e 2; 107,57 e 70,05 vezes, respectivamente, quando comparados com a fração F 30/60. 63
- 24 Cromatograma típico da aplicação do pico eluído com 0,75 M de sulfato de amônio, da coluna de interação hidrofóbica, Phenyl-Sepharose, na coluna de troca aniônica Resource Q. Gradiente salino descontínuo (linha vermelha), variando de 0,0 a 1,0 M de NaCl foi aplicado. As setas mostram os picos que detiveram atividade inibitória, pico 1 – não retido, eluído por simples lavagem da coluna com tampão de equilíbrio, que inibiu em 43,7 % a atividade papainásica e pico 2 – eluído com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, contendo NaCl 0,1 M, que causou um percentual de inibição da papaína de 93,3 %. Os demais picos não apresentaram atividade inibitória. 65
- 25 Zimograma em gel de poliacrilamida (10,0 %), na presença de SDS, contendo gelatina. 0, F 30/60 não fervida; 15, 30, 60 e 120 representam F 30/60 fervida por 66

15, 30, 60 e 120 minutos, respectivamente. As setas indicam a altura aparente de algumas proteases, evidenciadas pela degradação da gelatina.

- 26 Avaliação da atividade inibitória de proteinases cisteínicas após a fração F 30/60 ter sido submetida a diferentes tratamentos térmicos. As curvas de inibição foram construídas com base em quatro alíquotas (0, 20, 40 e 60 μ L) contendo as mesmas quantidades de proteína para os diferentes tratamentos térmicos. 67
- 27 Cromatograma típico da aplicação da fração F 30/60 fervida em coluna de fase reversa μ RPC C2/C18 ST 4.6/100 (GE-Healthcare, 1,6 mL) acoplada a um sistema HPLC (Waters®). A amostra foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 e a eluição das proteínas realizada por aplicação de concentrações crescentes de acetonitrila (32,0; 41,6; 48,0; 60,0 e 80,0%). O fluxo utilizado foi de 0,5 mL por minuto e a coleta dos picos manualmente realizada. A maior parte da atividade inibitória se concentrou nos picos 3 e 4 - setas - (esquerda para a direita) eluídos com 48,0 e 60,0 % de acetonitrila, respectivamente. A leitura das absorbâncias foi realizada a 230 nm. Os demais picos ou não apresentaram atividade ou apresentaram em níveis muito baixos. 69
- 28 Efeito nematostático de diferentes amostras (extrato bruto não fervido e fervido, F 30/60 não fervida e fervida, PIHPLC e PIIHPLC) sobre juvenis de segundo estágio de nematóides da espécie *M. javanica*, raça 1. Análise realizada 24 h após incubação das diferentes frações com os juvenis (As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05). 71
- 29 Efeito nematocida de diferentes amostras (extrato bruto não fervido e fervido, F 30/60 não fervida e fervida, PIHPLC e PIIHPLC) sobre juvenis de segundo estágio de nematóides da espécie *M. javanica*, raça 1. Análise realizada 24 h após incubação das diferentes frações com os juvenis. (As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05). 72
- 30 Atividade inibitória de proteinases cisteínicas da fração F 30/60 não fervida, F 30/60 fervida, pico 1 do HPLC (PIHPLC) e pico 2 do HPLC (PIIHPLC). A atividade está expressa em termos de atividade específica, que denota o grau relativo de pureza das amostras. 73
- 31 Visualização, por fluorescência, da interação entre as proteínas presentes na fração F 30/60 fervida e estruturas presentes no trato digestório de juvenis de segundo estágio de *M. javanica* raça 1. A- Nematóide observado após 6 horas de incubação com F 30/60 fervida. B- Mesmo nematóide, agora visto através da emissão de fluorescência. C- Nematóide observado 24 horas após incubação com F 30/60 fervida. D- Mesmo indivíduo sendo observado por meio da emissão de fluorescência. As setas indicam as extremidades anteriores dos juvenis. 75

LISTA DE TABELAS

TABELA		Página
1	Famílias de Proteínas Relacionadas a Patogêneses (PR-proteínas)	6
2	Principais Grupos de Proteinases	8

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

BANA	N-benzoil-DL-Arginina-2-Naftilamida
BSA	Albumina Sérica Bovina
DAP	Dias Após Plantio
DTT	Ditiotreitol
DMACA	4-dimetilaminocinamaldeído ou p- dimetilaminocinamaldeído
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
EGTA	Ácido etileno glicol bis (b-amino etilenoéter) tetracético
EB	Extrato Bruto
Eb f	Extrato Bruto Fervido
F 0/30	Fração 0 a 30 % de sulfato de amônio
F 30/60	Fração 30 a 60 % de sulfato de amônio
F 60/90	Fração 60 a 90 % de sulfato de amônio
F 0/60	Fração 0 a 60 % de sulfato de amônio
F 0/90	Fração 0 a 90 % de sulfato de amônio
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FPLC	Cromatografia Líquida de Rápida Performance
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
J1	Juvenil de Primeiro Estágio
J2	Juvenil de Segundo Estágio
NaCl	Cloreto de Sódio
PIHPLC	Pico 1 eluído da Cromatografia de Fase Reversa
PIIHPLC	Pico 2 eluído da Cromatografia de Fase Reversa
PR-Proteínas	Proteínas Relacionadas à Patogêneses
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SA	Ácido Salic
SAR	Resistência Sistêmica Adquirida
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SISVAR	Sistema de Análise de Variância
TEMED	N, N, N', N'- tetrametiletlenodiamino
TFA	Ácido Trifluoracético

UAI

Unidade de Atividade Inibitória de Proteinases Cisteínicas

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xv
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	xvi
1.0 <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1 Os Vegetais: Os Desafios que os Cercam e Seus Mecanismos de Defesa	1
1.1.1 Os problemas de ordem biótica, abiótica e as defesas constitutivas e induzidas	1
1.1.2 Resistência Sistêmica Adquirida e Resposta Hipersensitiva	2
1.1.3 As Proteínas Relacionadas à Defesa	5
1.1.4 Inibidores e Enzimas Proteolíticas de Plantas	5
1.1.4.1 As enzimas Proteolíticas: Classificação e papéis biológicos	5
1.1.4.2 Os Inibidores de Proteinases: Caracterização e Classificação	7
1.1.4.2.1 Papéis Biológicos e Expressão Heteróloga de Fitocistatinas	10
1.1.4.3 Purificação	12
1.2 Feijão-de-corda: Classificação Botânica e Importância Econômica	13
1.3 Nematóides: Biologia e Importância Econômica	15
2.0 <u>OBSERVAÇÃO BIOLÓGICA</u>	20
3.0 <u>OBJETIVOS</u>	21
3.1 Objetivo Geral	21
3.2 Objetivos Específicos	21
4.0 <u>MATERIAIS</u>	22
4.1 Sementes	22
4.2 Obtenção de Nematóides	22
4.3 Reagentes Químicos	22
5.0 <u>MÉTODOS</u>	23
5.1 Plantio, Extração de Proteínas e Detecção de Inibidores de Proteinases Cisteínicas	23
5.1.1 Assepsia das Sementes, Condições de Plantio e Coleta	23
5.1.2 Obtenção dos Extratos Totais	25
5.1.3 Experimentos Preliminares	25
5.1.3.1 Temperatura e Tempo de Aquecimento dos Extratos Totais	25
5.1.3.2 Tampão de Extração	27
5.1.3.3 Tempo de Coleta	28
5.1.4 Determinação dos Teores de Proteínas Solúveis Totais	28
5.1.5 Determinação da Atividade Inibitória de Proteinases Cisteínicas	29

5.1.6	Eletroforeses em Géis de Poliacrilamida	30
5.1.7	Atividade Proteolítica <i>in gel</i>	30
5.2	Purificação Parcial	31
5.2.1	Fracionamento com Sulfato de Amônio	31
5.2.2	Passos Cromatográficos	32
5.2.2.1	Cromatografia de Afinidade	32
5.2.2.2	Cromatografia de Exclusão Molecular	32
5.2.2.3	Cromatografia de Interação Hidrofóbica	33
5.2.2.4	Cromatografia de Troca Iônica	33
5.2.2.5	Cromatografia de Fase Reversa	33
5.3	Manutenção da População de <i>M. javanica</i> e Atividades Biológicas	34
5.3.1	Manutenção da População de <i>M. javanica</i>	34
5.3.2	Obtenção Dos Juvenis de Segundo Estágio (J2) de <i>M. javanica</i>	35
5.4	Avaliação do efeito de picos cromatográficos, frações e extratos totais de raízes de Feijão-de-corda sobre a mobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio de <i>Meloidogyne javanica</i> raça 1	35
5.4.1	Ensaio de Inibição de Mobilidade e Mortalidade	35
5.5	Avaliação Microscópica da Interação de uma Fração Específica com a Estrutura Interna e Externa de J2 de <i>M. javanica</i> , raça 1	38
5.5.1	Acoplamento da Fração F30/60 com FITC (Isotiocianato de Fluoresceína)	38
5.5.2	Remoção do FITC não acoplado	40
5.5.3	Determinação da Relação: Proteína Conjugada ao FITC / Proteína Livre	40
5.5.4	Incubação de J2 de <i>M. javanica</i> raça 1 com F30/60 acoplada ao FITC	40
5.6	Análises Estatísticas	42
6.0	<u>RESULTADOS</u>	43
6.1	Resultados Referentes aos Experimentos Preliminares	43
6.1.1	Temperatura e Tempo de Aquecimento dos Extratos Totais	43
6.1.2	Tampão de Extração	43
6.1.3	Tempo de Coleta	48
6.2	Fracionamento com Sulfato de Amônio	52
6.3	Passos Cromatográficos	57
6.3.1	Cromatografia de Troca Iônica	60
6.3.2	Cromatografia de Fase Reversa	64
6.4	Bioensaios	70
6.4.1	Ensaio de Inibição de Mobilidade e Mortalidade	70
6.4.2	Avaliação Microscópica da Interação de uma Fração Específica com a Estrutura Interna e Externa de J2 de <i>M. javanica</i> , raça 1	74
7.0	<u>DISCUSSÃO</u>	77
8.0	<u>CONCLUSÃO</u>	82
9.0	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	83

1.0 - Introdução

1.1 - Os Vegetais: Os Desafios que os Cercam e Seus Mecanismos de Defesa

Analisando superficialmente, uma planta parece ser uma forma de vida bastante passiva, estática. No entanto, uma observação mais profunda e criteriosa, não do ponto de vista microscópico, mas, molecular, mostra que este pensamento está errado. Na verdade, as plantas são equipadas com um complexo aparato de percepção e transdução de sinais capaz de permitir que elas detectem as alterações que ocorrem no ambiente que as cercam e enviem as informações coletadas ao longo de si e, até mesmo, para outros vegetais, sob forma de sinais químicos! (KOMBRINK E SCHMELZER, 2001; MÉTRAUX, 2001). É neste interessante cenário que se baseiam e justificam o montante de pesquisas e informações acumuladas, ao longo dos anos, a respeito dos mecanismos de defesa dos vegetais.

1.1.1 - Os problemas de ordem biótica, abiótica e as defesas constitutivas e induzidas

Solos com elevada salinidade, escassez de água, presença de substâncias tóxicas, excesso de calor, frio, falta de luz, são algumas das intempéries rotineiramente denominadas abióticas. Todas estas situações, além de outras não citadas, têm a capacidade de mexer com o metabolismo natural do vegetal de modo que o mesmo poderá responder, através da regulação da expressão de determinados genes, positiva ou negativamente a tais condições. Da mesma forma, quando um menino ou uma lagarta arranca mecanicamente uma folha de uma planta, esta injúria é percebida pelo vegetal e sinais sistêmicos são translocados pelas diversas partes do mesmo, de modo que, mais uma vez a regulação da expressão de genes fica alterada. Essa alteração pode ocorrer de modo a favorecer a planta, permitindo que ela suporte aquela condição de estresse, ou não. Isso dependerá, dentre outros fatores, da carga genética do indivíduo (vegetal), do sinal que induziu a alteração na expressão dos genes e também da interação entre o vegetal e o ambiente (BUCHANAN *et al.*, 2000).

Quando numa determinada interação (biótica ou abiótica) o vegetal percebe tardiamente a chegada do inimigo (entenda-se como inimigo o fator estressante) e o estado patológico denominado doença é estabelecido, a planta é dita susceptível àquela condição. Contudo, se a planta percebe a presença do inimigo e ativa suas respostas bioquímicas de defesa levando-o (no caso de estresse biótico) a uma baixa taxa de crescimento e colonização de seus tecidos, ela é dita resistente (VAN LOON, 1997). Esta definição, porém, é relativa, uma vez que é possível se pensar em graus de susceptibilidade e resistência. Em se tratando de estresse biótico havendo, portanto, relação entre dois ou mais seres vivos, a interação pode ser denominada de compatível, no caso de ocorrer doença ou incompatível, caso a planta consiga superar o desafio (BAKER *et al.*, 1997) .

Os fatores que conferem resistência aos vegetais são variados, podendo ser constituídos por estruturas de defesa pré-formadas como, por exemplo, calose, cutina, ceras, pêlos e lignina e moléculas pré-existentes como as fitoanticipinas, compostos antimicrobianos de baixa massa molecular que podem estar presentes no vegetal antes da ocorrência do estresse, sob a forma de precursores químicos, ou totalmente ativos (ZINOV'EVA *et al.*, 2004). Além disso, estruturas ou substâncias sintetizadas apenas durante ou após a condição de estresse também estão envolvidas no processo de resistência. É neste grupo de estruturas ou compostos químicos denominados, pós-formados, que moléculas como as Proteínas Relacionadas a Patogêneses - PR-proteínas (Pathogenesis Related Proteins), algumas espécies reativas de oxigênio - ROS - (Reactive Oxygen Species), sinalizadores químicos de defesa, como a Sistemina (o primeiro hormônio vegetal de natureza protéica descoberto), além de outras, estão enquadradas (MAURICIO *et al.*, 1997).

1.1.2 - Resistência Sistêmica Adquirida e Resposta Hipersensitiva

A seguir, breve comentário a respeito de algumas das principais respostas bioquímicas que caracterizam parte das respostas de defesa de plantas é descrito.

Os eventos que caracterizam o mecanismo de defesa dos vegetais têm como uma de suas principais conseqüências o estabelecimento de um importante fenômeno, denominado Resistência Sistêmica Adquirida – SAR - (Systemic Acquired Resistance). No entanto, para que a SAR seja ativada, a planta necessita, inicialmente, detectar a presença do patógeno. A fim de propor um mecanismo químico que explicasse como se dá tal reconhecimento, o cientista Flor tornou pública ao meio científico, no ano de 1955, sua tão famosa hipótese, gene a gene. Segundo esta hipótese numa interação incompatível, ou seja, onde não há doença, o organismo potencialmente patogênico possui um gene de avirulência, (*Avr*), que será traduzido num fator de avirulência, *Avr*, o qual interagirá com o produto de resistência, *R*, sintetizado a partir de um gene de resistência (*R*) do hospedeiro (FLOR, 1955).

Como decorrência desta interação, vários eventos como, a produção aumentada e acúmulo de moléculas de defesa pré-existentes, bem como, a síntese *de novo* de outras moléculas, além, também, do aumento na concentração de ROS, evento muitas vezes associado ao suicídio celular programado conhecido como resposta hipersensitiva – HR (Hypersensitive Response) são desencadeados. Uma vez ativada a HR o patógeno se torna privado de células vivas e pode vir a morrer, caso se trate de microrganismo biotrófico, confinado entre células vegetais mortas (GRAHAM e GRAHAM, 1999).

O resultado final de todas estas cascatas de reações é um estado de defesa em que o vegetal encontra-se imunizado contra novos ataques. Como a produção e translocação, pelas diversas partes da planta, de moléculas sinalizadoras da resposta de defesa, como o ácido salicílico - SA (Salicylic Acid), por exemplo, também são realizadas durante esse processo, esta imunização se dá de forma sistêmica e, por esta razão, o fenômeno é denominado de resistência sistêmica adquirida (MAUCH *et al.*, 1992; OZERETSKOVSKAYA *et al.*, 2004). A figura 1 ilustra, resumidamente, algumas das principais etapas envolvidas no mecanismo de defesa vegetal, indo desde o reconhecimento químico do patógeno, pela planta, até a produção de ROS, síntese de sinalizadores sistêmicos de defesa, como SA, alteração na expressão gênica e, por fim, o fenômeno da SAR.

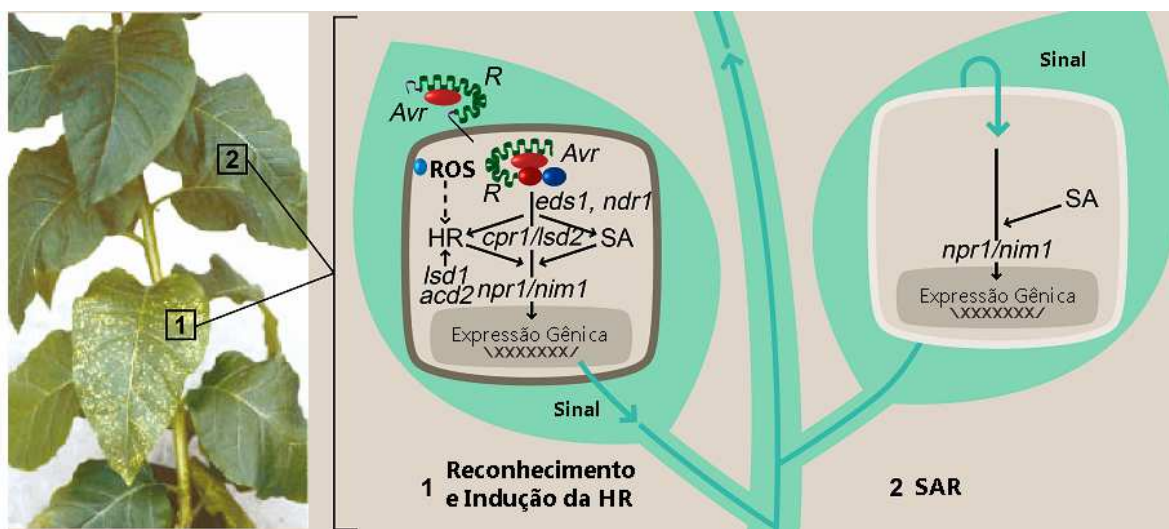


Figura 1 – Interação entre o produto, AVR, do gene de avirulência do patógeno e o produto, R, do gene de resistência da planta. Nesta interação, fenômenos como o acúmulo rápido e transitente de ROS, que culminarão no desencadeamento da resposta hipersensitiva (HR), estão tipicamente envolvidos. Além disso, moléculas capazes de se translocarem sistemicamente pelos tecidos vegetais, como o ácido salicílico (SA), também são acumuladas durante a interação, Avr - R. Alteração na expressão gênica levando à síntese de proteínas de defesa e o estabelecimento de um estado de imunidade sistêmica caracterizam a SAR, que seria uma consequência final de todo o processo. As pontuações amareladas destacadas pelo número 1, dentro de um quadrado, nas folhas da planta da esquerda, são um sinal macroscópico típico da HR.

Fonte: BAKER *et al.*, 1997.

1.1.3 - As Proteínas Relacionadas à Defesa

Dentre as moléculas que são induzidas durante a SAR estão as PR- proteínas. Estas proteínas foram originalmente observadas, na mesma época, por dois grupos de pesquisa distintos quando trabalhavam com o tabaco (*Nicotiana tabacum*) infectado com vírus do mosaico do tabaco (*Tobacco mosaic virus*) (GIANINAZZI *et al.*, 1970; VAN LOON e VAN KAMMEN, 1970).

As PR-proteínas são definidas como proteínas que só aparecem no vegetal após o mesmo entrar em condição de estresse ou que podem estar presentes nos tecidos vegetais em condições normais (não estressantes), porém em níveis reduzidos. Atualmente as PR-proteínas são divididas em 17 famílias (Tabela 1), muitas das quais são formadas por enzimas hidrolíticas capazes de degradar componentes estruturais da parede celular de fungos e bactérias, como as β -1,3-glucanases e quitinases. Além disso, enzimas relacionadas à lignificação da parede celular vegetal, como algumas peroxidases, proteínas envolvidas no bloqueio e inibição da atividade de enzimas proteolíticas (inibidores de proteases) e proteínas com outras atividades voltadas para a defesa vegetal são também classificadas como PR-proteínas (VAN LOON *et al.*, 2006).

1.1.4 - Inibidores e Enzimas Proteolíticas de Plantas

1.1.4.1 - As enzimas Proteolíticas: Classificação e papéis biológicos

Antes de começar a falar sobre os inibidores de proteases e sua ação na defesa vegetal é preciso que uma breve explanação sobre as proteases seja feita. As enzimas proteolíticas, assim conhecidas por causarem digestão de proteínas, são genericamente denominadas de proteases ou peptidases. No entanto, o termo protease não define o padrão de clivagem da ligação peptídica que a enzima apresenta. Proteases que clivam ligações peptídicas internas de seus substratos (endopeptidases) são chamadas proteinases, já o termo protease tem sentido mais amplo, englobando tanto endo como exopeptidases (LECAILE *et al.*, 2002).

Tabela 1 – Famílias de Proteínas Relacionadas a Patogêneses (PR-Proteínas)

Família	Membro Tipo	Propriedades	Símbolo do Gene	Referência
PR-1	Tabaco PR-1a	antifúngica	<i>Ypr1</i>	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-2	Tabaco PR-1a	β -1,3-glucanase	<i>Ypr2</i> , [<i>Gns2</i> (' <i>Glb</i> ')]	Antoniw <i>et al.</i> , 1980
PR-3	Tabaco P Q	quitinase tipo I,II, IV,V,VI,VII	<i>Ypr3</i> , <i>Chia</i>	Van Loon, 1982
PR-4	Tabaco 'R'	quitinase tipo I,II	<i>Ypr4</i> , <i>Chid</i>	Van Loon, 1982
PR-5	Tabaco S	semelhante a taumatina	<i>Ypr5</i>	Van Loon, 1982
PR-6	Inibidor de Tomate I	Inibidor de proteinase	<i>Ypr6</i> , <i>Pis</i> (' <i>Pir</i> ')	Green e Ryan, 1972
PR-7	Tomate P ₆₉	endoproteinase	<i>Ypr7</i>	Vera e Conejero, 1988
PR-8	Quitinase de Pepino	quitinase tipo III	<i>Ypr8</i> , <i>Chib</i>	Métraux <i>et al.</i> , 1988
PR-9	Peroxidase formadora de lignina' de tabaco	peroxidase	<i>Ypr9</i> , <i>Prx</i>	Lagrimini <i>et al.</i> , 1987
PR-10	PR1' Salsa	semelhante a ribonuclease	<i>Ypr10</i>	Somssich <i>et al.</i> , 1986
PR-11	Quitinase 'Classe V' de Tabaco	quitinase tipo I	<i>Ypr11</i> , <i>Chic</i>	Melchers <i>et al.</i> , 1994
PR-12	Rs-AFP3 Radish	defensina	<i>Ypr12</i>	Terras <i>et al.</i> , 1992
PR-13	THI2.1 Arabidopsis	tionina	<i>Ypr13</i> , <i>Thi</i>	Epple <i>et al.</i> , 1995
PR-14	LTP4 Cevada	proteína transferidora de lipídios	<i>Ypr14</i> , <i>Ltp</i>	García-Olmedo <i>et al.</i> , 1995
PR-15	OxOa Cevada	oxidase do oxalato	<i>Ypr15</i>	Zhang <i>et al.</i> , 1995
PR-16	OxOLP Cevada	semelhante a oxidase do oxalato	<i>Ypr16</i>	Wei <i>et al.</i> , 1998
PR-17	PRp27 Tabaco	desconhecida	<i>Ypr17</i>	Okushima <i>et al.</i> , 2000

Fonte: VAN LOON *et al.*, 2006

Com relação ao mecanismo de ação as proteases são categorizadas em seis grandes grupos: Proteases serínicas, cisteínicas, aspárticas, treonina-proteases e metalo-proteases. Além destas, a classificação da União Internacional de Bioquímica propõe a existência da sexta classe mecanicística de proteases, que agruparia proteases de “tipo desconhecido” (LECAILE *et al.*, 2002, VAN DER HORN e JONES, 2004; DUBEY *et al.*, 2007).

Apesar desta classificação em seis grupos as quatro primeiras classes, proteases serínicas, cisteínicas, aspárticas, e metalo-proteases são as melhor estudadas (OLIVEIRA *et al.*, 2003). A (Tabela 2) mostra, resumidamente, algumas características físico-químicas relativas a estas proteases e alguns de seus principais membros representantes.

Estas quatro classes de proteases estão envolvidas em diversos processos fisiológicos em organismos dos mais variados reinos, desde os maiores e mais complexos mamíferos a organismos mais “rudimentares” como fungos e bactérias.

Algumas funções propostas e outras já bem elucidadas para as proteases são: proteólise de proteínas defeituosas e processamento pós-traducional, mobilização de proteínas de reserva do endosperma de sementes durante a germinação (OLIVEIRA *et al.*, 2003; PERNAS *et al.*, 1998; SANTINO *et al.*, 1998; XAVIER-FILHO, 1992), digestão de proteínas da alimentação (LAWRENCE e KOUNDAL, 2002), atuação em alguns aspectos do mecanismo de defesa vegetal (VAN DER HORN e JONES, 2004; HSIANG e GOODWIN, 2006), ativação do processo de morte celular programada em animais e da resposta hipersensitiva em vegetais (DENAULT e SALVESEN, 2002; HOORN e JONES, 2004), participação em processos inflamatórios, na regulação da coagulação sanguínea e no processamento hormonal (IVANOV *et al.*, 2006) etc.

1.1.4.2 - Os Inibidores de Proteinases: Caracterização e Classificação

A atividade das enzimas proteolíticas precisa e é regulada por ação de moléculas inibidoras que, ao se complexarem com estas, formam complexos parcial ou totalmente inativos (HABIB e FAZILI, 2007).

Tabela 2 – Principais Grupos de Proteinases

PROTEINASE	GRUPO DO SÍTIO ATIVO	pH ÓTIMO	PROTEÍNAS REPRESENTANTES
Proteinases Serínicas	Ser, His	7 a 9	Tripsina, Quimiotripsina, Elastase, Catepsina G
Proteinases Cisteínicas	Cys	4 a 7	Papaina, Ficina, Bromelaina, Ananaina, Catepsinas (+) B, C, H, K, L, O, S e W
Proteinases Aspárticas	Asp, Try	< 5	Catepsinas D e E, Renina e Pepsina
Metalo-Proteinases	Íon Metálico	7 a 9	Carboxipeptidases A e B e Aminopeptidases

Fonte: Oliveira *et al.*, 2003

Pelo menos uma categoria de inibidor proteináceo tem sido prontamente identificada para cada tipo ou classe mecanicística de enzima proteolítica existente. Dessa forma, este é um dos critérios pelos quais os inibidores de proteases podem ser classificados. Contudo, esta propriedade isolada não é suficiente para classificação dos inibidores, sendo, portanto, apenas um dos variados parâmetros utilizados nesta classificação (HABIB e FAZILI, 2007).

Nesta discussão, maior ênfase será dada aos inibidores de proteinases cisteínicas, comumente denominados cistatinas, alvo maior do presente trabalho.

O termo cistatina refere-se a uma superfamília de inibidores de proteinases cisteínicas que compreende grande número de proteínas homólogas ativas contra proteinases da família da papaína ou membros relacionados, sendo amplamente distribuídos entre plantas, animais e microrganismos (GRUDKOWSKA e ZAGDANSKA, 2004). A primeira cistatina descrita foi a cistatina da clara do ovo, em 1960. Hoje, representantes variando desde os encontrados nos protozoários até os de mamíferos são conhecidos. Estas proteínas foram inicialmente classificadas em três grandes subfamílias. As cistatinas pertencentes à classe I, denominadas de ESTEFINAS, são proteínas de aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos, que não possuem pontes dissulfeto nem resíduos de carboidratos, sendo tipicamente localizadas no citosol. Cistatinas pertencentes à classe II, denominadas de CISTATINAS, apresentam, em média, 120 resíduos de aminoácidos, são formadas por duas pontes dissulfeto e apresentam um peptídeo sinal para endereçamento extracelular. Do tipo III, conhecidas como CININOGÊNIOS ou QUININOGÊNIOS, são glicoproteínas divididas em três subgrupos. Quininogênios de elevada massa molecular, apresentando cerca de 120 KDa, de baixa massa molecular, variando entre 60 e 80 KDa e os quinogênios tipo T, com massa molecular de 68 KDa. Estas proteínas possuem três domínios “semelhante-cistatina tipo II” repetidos sendo que apenas dois são, contudo, capazes de inibir proteinases cisteínicas. Podem ser secretadas e possuem participação no processo de coagulação sanguínea (BARRET, 1987; OLIVEIRA *et al.*, 2003, DUBIN, 2005, HABIBI e FAZILI, 2007).

Uma quarta subfamília de inibidores, FITOCISTATINAS, que engloba quase todos os inibidores de proteinases cisteínicas descritos em plantas, foi

posteriormente proposta. Esta subfamília, por sua vez é subdividida em duas classes. Inibidores de baixa massa molecular (tipo 1, ou de único domínio), que inclui a maioria das fitocistatinas descritas e purificadas e inibidores de elevada massa molecular, ou tipo II, múltiplos domínios. Neste último grupo as multicistatinas da batata (WALSH e STRICKLAND, 1993) e do tomate (WU e HAARD, 2000; BOLTER, 1993) que apresentam vários sítios de interação com a papaína (múltiplos domínios), são enquadradas. Neste caso, uma única molécula de inibidor é capaz de interagir com e inibir várias moléculas de papaína e/ou proteases relacionadas à mesma.

Algumas das principais características físico-químicas compartilhadas entre as fitocistatinas incluem semelhanças com cistatinas animais pertencentes às classes I e II. Dentre estas características, ausência de resíduos de cisteína livre e, conseqüentemente, ausência de pontes dissulfeto, ausência de resíduos de carboidratos, baixa massa molecular, em torno de 11,0 a 20 KDa e presença de um único domínio (fitocistatinas tipo I) (OLIVEIRA *et al.*, 2003), são algumas que podem ser citadas.

Além disso, outras características como, boa tolerância a elevadas temperaturas (SANTINO *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2003) e a presença das seqüências de aminoácidos, (Glu-Val-Val-Ala-Gly), típica das cistatinas animais e (Leu-Ala-Arg-Phe-Ala-Val-X-Glu-His-Asp), ausente nas cistatinas animais, porém bastante conservada entre as fitocistatinas (XAVIER-FILHO, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2003; MOSOLOV e VALUEVA, 2004) também caracterizam esta família de inibidores.

1.1.4.2.1- Papéis Biológicos e Expressão Heteróloga de Fitocistatinas

O potencial das fitocistatinas como importantes moléculas do mecanismo de defesa vegetal tem sido um dos maiores estímulos impulsionadores para o desenvolvimento de pesquisas visando sua purificação e caracterização físico-química e biológica, clonagem molecular e expressão heteróloga. Em verdade a literatura corrente está repleta de trabalhos que abordam esse tema (ABE *et al.*, 1987; KOUZUMA *et al.*, 1996; PERNAS *et al.*, 1998; SANTINO *et al.*, 1998;

AKPINAR e AN, 2005; YANG e YEH, 2005; GIANOTTI *et al.*, 2006). Contudo, a idéia de fitocistatinas como proteínas de defesa não é tão antiga, se comparada às especulações a respeito da participação dos inibidores de tripsina da soja na defesa do vegetal. Alguns dados remontam da década de 40, mais especificamente, ano de 1947, quando Mickel e Standish observaram que as larvas de certos insetos não se desenvolviam normalmente sobre produtos da soja. Posteriormente, foi mostrado que os inibidores de tripsina presentes na soja é que eram os fatores antinutricionais que estavam prejudicando as larvas de *Tribolium confusum* (LIPKE *et al.*, 1954). Em alguns casos a administração alimentar destes inibidores parece induzir aumento na produção de enzimas proteolíticas nos indivíduos alimentados, acarretando deficiência de aminoácidos sulfurados, nos mesmos, que serão drenados para a síntese *de novo* destas enzimas (SHULKE e MURDOCK, 1983).

Com relação aos organismos para os quais as fitocistatinas têm-se mostrado efetivamente ativas, um grande número de trabalhos se concentra em cima de insetos-praga herbívoros, principalmente devido ao fato destes animais utilizarem dieta baseada no recrutamento de enzimas proteolíticas, particularmente as proteinases cisteínicas, durante o processo de digestão dos alimentos (ZHAO *et al.*, 1996; ARAI *et al.*, 2002; AGUIAR *et al.*, 2006, HABIBI e FAZILI, 2007).

Estes inibidores podem atuar reduzindo, completa ou parcialmente, a atividade de enzimas proteolíticas presentes no intestino de insetos, nematóides, ou até mesmo, secretadas por microrganismos, e, desta forma, reduzir o aporte de aminoácidos a estes organismos que necessitam destas proteases ativas para completarem seu ciclo de vida sobre o hospedeiro (LAWRENCE e KOUNDAL, 2002). Além dos insetos, trabalhos com nematóides, especialmente fitonematóides pertencentes aos gêneros *Meloidogyne*, *Heterodera* e *Globodera*, e fungos fitopatogênicos têm demonstrado o potencial das fitocistatinas no biocontrole de pragas (URWIN *et al.*, 1995; VAIN *et al.*, 1998; JOSHI *et al.*, 1998; PERNAS *et al.*, 1999). A expressão heteróloga da fitocistatina do arroz (orizacistatina) nas células localizadas nos sítios de alimentação de nematóides pertencentes às espécies *Meloidogyne incognita* e *Globodera pallida* foi capaz de conferir de 70 ± 4 a 67 ± 9 %, respectivamente, de resistência a plantas de batata a estes nematóides (LILLEY *et al.*, 2004).

Como as proteinases cisteínicas não fazem parte do pool de enzimas proteolíticas que atuam na digestão das proteínas da dieta alimentar, de seres humanos e outros vertebrados, estando mais envolvidas em outros processos celulares (OLIVEIRA *et al.*, 2003) a produção e comercialização de plantas transgênicas expressando fitocistatinas, aparentemente, parece ser uma estratégia viável (ATKINSON *et al.*, 2004). No entanto, estudos mais aprofundados investigando o papel destas proteínas na defesa vegetal e a possível ocorrência de reações cruzadas com proteases de mamíferos, quando da sua expressão heteróloga, são indispensáveis.

Além disso, é importante que se tenha em mente que a natureza muitas vezes é capaz de driblar determinadas situações. Fato que tem ocorrido com insetos, onde os efeitos deletérios oriundos da administração de dieta baseada em fitocistatinas e também inibidores de alfa-amilase, além de outros, foram, em alguns casos, compensados pelos animais que se adaptaram prontamente àquela condição, seja pelo uso de outras classes de enzimas proteolíticas na dieta, pela síntese de novas proteases, refratárias à ação dos inibidores testados, ou ainda, pela síntese de proteases capazes de degradar estes inibidores (BRITO *et al.*, 2001; ZHU-SALZMAN *et al.*, 2003). O que reforça mais ainda a necessidade de que aprofundamentos nas pesquisas relacionadas a este tema sejam realizados.

1.1.4.3- Purificação

Com relação à purificação de fitocistatinas a maioria dos trabalhos se concentram nos órgãos de reserva, como sementes e tubérculos (BRZIN *et al.*, 1998; PERNAS *et al.*, 1998; ARAI *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2000) e em folhas (DIOP *et al.*, 2004; WU e HAARD, 2000). Porém, com relação a raízes, órgão de estudo do presente trabalho, nenhum dado de purificação de fitocistatinas, até o momento, foi publicado!

1.2 - Feijão-de-corda: Classificação Botânica e Importância Econômica

O gênero *Vigna* família Fabaceae é composto de mais de 200 espécies nativas das regiões quentes do velho e novo mundo. *Vigna* está intimamente relacionado ao gênero *Phaseolus*, o qual é formado por cerca de 20 espécies típicas das regiões tropicais do planeta. Algumas espécies, antes classificadas como pertencentes ao gênero *Phaseolus*, estão hoje enquadradas no *Vigna*. Este gênero compreende várias espécies de grande importância econômica para as sociedades dos países em desenvolvimento, dentre as quais, [*Vigna unguiculata* (L.) Walpers], [*V. radiata* (L.) Wilczek] e [*V. mungo* (L.) Hepper] são as principais, constituindo fonte alimentícia fundamental para milhões de pessoas (FERY, 2002). Nesta discussão destaque será dado à espécie de estudo do presente trabalho, [*V. unguiculata* (L.) Walpers] (Figura 2).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial desta espécie de feijão (depois de Nigéria e Níger), com aproximadamente 30 milhões de consumidores (EMBRAPA, 2007).

Os brasileiros conhecem a leguminosa *V. unguiculata* por diferentes nomes, como: Feijão-de-corda, caupi (derivado do Inglês “cowpea”), feijão macassar, feijão-da-colônia, feijão-de-praia, feijão-miúdo, feijão-fraudinho, além de várias outras denominações, dependendo da região onde é cultivado (PIO-RIBEIRO e ASSIS FILHO, 1997).

Do ponto de vista de classificação taxonômica a espécie *V. unguiculata* é uma leguminosa dicotiledônea, pertencente à ordem *Fabales*, família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Phaseolinae*, gênero *Vigna* e seção *Caating* (VERDCOURT, 1970; PADULOSI e NG, 1977; MARÉCHAL *et al.*, 1978; FREIRE-FILHO, 1988).

Os grãos secos do feijão-de-corda representam a principal forma de consumo da planta, no entanto, folhas (em muitas partes do leste da África, continente de onde a planta foi originada), sementes frescas (no sudeste dos Estados Unidos e Senegal) e vagens frescas verdes (em regiões úmidas da Ásia e do Caribe) também são consumidas (EHLERS e HALL, 1997).



Figura 2 - Desenho esquemático de uma planta de feijão-de-corda [*V. unguiculata* (L.) Walpers]. Notar a anatomia de vagens e flores, típicas de plantas leguminosas e os rizóbios fixadores de N₂ associados às raízes (Retirado de <http://www.iita.org/cms/articlefiles/269-cowpea.jpg>).

Dentre as principais características do feijão-de-corda, seu elevado conteúdo protéico, associado à boa capacidade de fixação de nitrogênio, boa tolerância às condições de baixa disponibilidade de água nos solos e altas temperaturas, condições típicas das regiões semi-áridas do nordeste do Brasil, são algumas das que podem ser citadas. Trata-se de um alimento básico para a população e representa principal cultivo na maioria dos municípios das regiões Norte e Nordeste do país, constituindo a principal fonte de proteínas de origem vegetal nessas regiões (ARAÚJO e WATT, 1988).

No entanto, apesar desta boa capacidade de tolerância a diferentes condições estressantes, parte da produtividade do feijão-de-corda, é ameaçada pela ação de fitopatógenos como vírus, fungos, bactérias e fitonematóides (FREITAS *et al.*, 1999).

Com relação aos nematóides, mais de 30 espécies foram identificadas como sendo parasitas do feijão-de-corda, sendo destacados os gêneros *Meloidogyne*, *Pratylenchus* e o nematóide reniforme, *Rotylenchulus reniformes*.

Dentro do gênero *Meloidogyne*, as espécies *Meloidogyne incognita* Kofoid & White e *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood têm sido descritas como as mais importantes (FREITAS *et al.*, 1999, SILVA, 2000, FREIRE-FILHO *et al.*, 2005), sendo, portanto, responsáveis pelos maiores danos à cultura.

1.3 - Nematóides: Biologia e Importância Econômica

Os nematóides representam importante e numeroso filo (Nematoda) de microrganismos multicelulares de tamanho e forma variados e compreendem o grupo com maior número de espécimes dentre os animais multicelulares (YEATES *et al.*, 1993).

Podem ser de vida livre ou parasitas animais e vegetais (MAGGENLI, 1981). Os nematóides parasitas de plantas, também denominados fitonematóides, são divididos em dois grandes grupos principais. Nematóides ectoparasitas (importantes vetores de vírus) e nematóides endoparasitas que, por sua vez, são subdivididos em nematóides migradores e sedentários (WILLIAMSON e HUSSEY, 1996).

Dentre os nematóides sedentários destaque é dado à família Heteroderidae a qual compreende dois importantes tipos de fitonematóides. Os nematóides formadores de cistos, gêneros *Heterodera* e *Globodera* e os nematóides formadores de galhas, gênero *Meloidogyne* (WILLIAMSON e HUSSEY, 1996). Este último grupo de fitonematóides receberá mais ênfase e detalhamento na discussão que segue no próximo parágrafo.

Os nematóides formadores de galhas, como o próprio nome diz, induzem a formação de tumores nas raízes das plantas hospedeiras, comumente denominados de galhas (Figura 3). No interior destas galhas, um verdadeiro abrigo para os parasitas, fêmeas alimentam-se ativamente do conteúdo citoplasmático das células que cercam sua região anterior. O local onde há o íntimo contato entre a região anterior da fêmea e as células que estão nutrindo-a é denominado sítio de alimentação (WYSS *et al.*, 1992, WILLIAMSON e HUSSEY, 1996; GHEYSEN e FENOLL, 2002; DAVIS *et al.*, 2004). O conhecimento do ciclo de vida do nematóide das galhas é um requisito básico para melhor compreensão de como o verme parasita a planta hospedeira até levar à formação das galhas e do sítio de alimentação.

Inicialmente, ainda dentro do ovo, o indivíduo jovem, denominado juvenil de primeiro estágio (J1) sofre uma ecdise, dando origem ao estágio infectivo denominado J2 ou juvenil de segundo estágio. O J2, ao eclodir, tem a capacidade de detectar sinais químicos que eventualmente venham a ser liberados por raízes de uma potencial planta hospedeira, por meio de órgãos quimiorreceptores, como os anfídeos, por exemplo, localizados em sua extremidade anterior (PERRY, 1996). Uma vez captados os sinais, o J2 inicia um processo de migração até a raiz e, por meio de várias proteínas, algumas sintetizadas e liberadas pelas suas glândulas esofagianas, dá início ao processo de degradação da parede da célula localizada no local da penetração (MAI e NULLIN, 1996).

Ao atingir a região da raiz que servirá de sítio de alimentação o J2 perfura a membrana plasmática da célula hospedeira e, por meio de estrutura retrátil especializada em forma de tubo, denominada estilete, inicia uma série de atividades que envolvem, tanto a retirada de nutrientes como também a injeção de substâncias secretadas pelas glândulas esofagianas. Como conseqüência, as células do cilindro



Figura 3 - Sistema radicular de plantas de feijão-de-corda, genótipo TE 97 411 1-E, susceptível a *M. incognita*. As plantas das figuras acima foram cultivadas e inoculadas com *M. incognita* raça 1, em nosso laboratório. Notar as regiões drasticamente espessadas, galhas, que caracterizam a infecção por nematóides do gênero *Meloidogyne* (A). Detalhe de uma região da raiz evidenciando a presença de várias galhas amontoadas (B).

vascular, adjacentes à cabeça do juvenil, sofrem cariocinese sem, no entanto, passarem pela citocinese, tornando-se, portanto, multinucleadas. Além disso, outras alterações nestas células incluem seu aumento de tamanho e por isso elas são denominadas de células gigantes. Ainda por influência dos sinais do J2 as células do córtex radicular, situadas ao redor do corpo do verme, multiplicam-se desordenadamente originando as galhas. O J2 se torna então sedentário e passa por mais ecdises dando origem aos estágios J3, J4 e indivíduo adulto (WILLIAMSON e HUSSEY, 1996; BEZAWADA *et al.*, 2003; FREIRE-FILHO *et al.*, 2005; JAUBERT *et al.*, 2005).

O indivíduo adulto pode ser de vida livre, no caso dos machos, e deixar a raiz ou endoparasita sedentário, como ocorre com as fêmeas. Estas são morfológicamente bem distintas do J2, apresentando o corpo em forma de pêra e com coloração branco-leitosa. Normalmente as fêmeas ficam inseridas na raiz com o estilete posicionado em direção às células gigantes, sendo protegidas pela galha (ABAD *et al.*, 2003).

Ao final do ciclo as fêmeas dão início à secreção de uma massa mucilaginosa, pelas glândulas anais, a qual envolverá e protegerá os ovos que ali serão depositados. Normalmente esta massa de ovos fica aderida à região posterior da fêmea sendo, porém, exposta para fora da galha, enquanto que a fêmea permanece inserida no seu interior (MAI e NULLIN, 1996; FREIRE-FILHO *et al.*, 2005).

Importante notar quão surpreendente é a interação entre estes nematóides e suas plantas hospedeiras, uma vez que estes pequenos vermes desenvolveram, ao longo de sua evolução, a capacidade de orquestrar um elaborado sistema parasitário capaz de manipular a regulação da expressão de alguns genes e, conseqüentemente, parte do metabolismo vegetal em função de sua sobrevivência (VANHOLME *et al.*, 2004).

Em verdade, nematóides formadores de galhas e nematóides de cisto foram capazes de regular positivamente, em plantas de tabaco, a expressão de cinco genes responsáveis pela codificação de diferentes isoformas de β -1,4-glucanases da planta, numa interação compatível. Os autores confirmaram, neste trabalho, que a indução da expressão destes genes pelos nematóides favorece o seu estabelecimento e ainda especulam que muitas das alterações nas paredes

celulares da planta hospedeira podem ser atribuídas mais à ação das enzimas da própria planta, sob influência de sinais do nematóide, do que mesmo devido a uma ação direta do parasita (GOELLNER *et al.*, 2001).

Como conseqüência final deste processo parasitário, além das típicas galhas, sintomas semelhantes à deficiência nutricional e de nitrogênio como clorose, murcha da parte aérea, considerável queda na produtividade, susceptibilidade a outras pragas e, em situações mais severas, morte do vegetal, são tipicamente observados em plantas hospedeiras (GRUNDLER e BÖCKENHOF, 1997; FREITAS *et al.*, 1999, FREIRE-FILHO *et al.*, 2005).

Em termos numéricos, os danos econômicos causados por nematóides, particularmente aqueles pertencentes ao gênero *Meloidogyne*, são estimados com sendo da ordem de 100 bilhões de dólares por ano (LILLEY *et al.*, 1999, RIPOLL *et al.*, 2003).

Tendo em vista o intrincado mecanismo, acima exposto, que envolve as interações planta-nematóide torna-se claro quão complexo também deve ser o mecanismo de controle destes parasitas. Principalmente por que eles ficam situados no solo e no interior das raízes, locais onde os nematicidas comuns têm dificuldade de chegar (CHITWOOD, 2002). Em adição, não se pode desprezar os dados que mostram os sérios danos à saúde e ao meio ambiente, além dos prejuízos econômicos, advindos da utilização contínua, não só de nematicidas, mas de pesticidas em geral (BAKER *et al.*, 1997).

Desta forma, medidas de controle urgentes necessitam ser desenvolvidas, por isso é importante que pesquisas que almejem a descoberta de estratégias alternativas de controle destes importantes patógenos vegetais sejam incentivadas e prontamente executadas.

2.0 - Observação Biológica

Durante seu trabalho de Doutorado, ANDRADE (2003) verificou que o genótipo de feijão-de-corda, CE-31, popularmente conhecido como Pitiúba, se mostrou altamente resistente ao ataque do nematóide das galhas, *Meloidogyne incognita*.

Tendo em vista a importância econômica dos nematóides pertencentes ao gênero *Meloidogyne* para a agricultura mundial e, levando em consideração os dados de ANDRADE (2003), que apontaram os inibidores de proteinases cisteínicas de raízes do genótipo de feijão-de-corda utilizado em seus experimentos, como um dos fatores que contribuíram com a resistência da planta ao nematóide, o presente trabalho objetivou avaliar a ação de frações enriquecidas em inibidores de proteinases cisteínicas, extraídas deste mesmo genótipo de feijão-de-corda, sobre nematóides da espécie *M. javanica*, raça 1.

A utilização do feijão-de-corda como modelo de estudo é decorrente da sua grande importância econômica e alimentícia, especialmente, para o povo do nordeste brasileiro, além do fato desta cultura, como já enfatizado na introdução, sofrer perdas consideráveis devido ao ataque de nematóides do gênero *Meloidogyne*, particularmente, pelas espécies, *M. incognita* e *M. javanica*.

3.0 - Objetivos

3.1 - Objetivo Geral

Avaliar, o potencial de inibidores de proteinases cisteínicas presentes em raízes de feijão-de-corda como possíveis moléculas de defesa da planta contra o nematóide das galhas, *Meloidogyne javanica*, raça 1.

3.1.2 - Objetivos Específicos

Estabelecer um protocolo de extração, fracionamento com sulfato de amônio e purificação parcial de inibidores de proteinases cisteínicas de raízes de feijão-de-corda;

Investigar os efeitos de frações enriquecidas em inibidores sobre a mobilidade de J2 de *M. javanica*, raça 1, bem como o possível efeito nematicida destas frações;

Avaliar a possível interação entre proteínas presentes em determinadas frações, ricas em inibidores de proteinases cisteínicas, e estruturas de J2 de *M. javanica*, raça 1.

4.0 - Materiais

4.1 - Sementes

Sementes de feijão-de-corda [*V. unguiculata* (L.) Walp.], genótipo CE-31 (Pitiúba), foram gentilmente cedidas pelo banco de sementes da Universidade Federal do Ceará (UFC). Em todos os experimentos aqui descritos sementes das safras de 2006 e 2007 foram utilizadas. Estas sementes foram multiplicadas na Horta do Departamento de Agronomia da UFC e estavam armazenadas em câmara fria à temperatura de 10°C

4.2 - Obtenção dos Nematóides

Nematóides do gênero *Meloidogyne*, espécie *M. javanica* raça 1 foram gentilmente cedidos pelo Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR).

4.3 - Reagentes Químicos

Ácido clorídrico, ácido etileno diamino tetraacético (EDTA), ácido etileno glicol bis (b-amino etilenoéter) tetracético (EGTA), ácido trifluoracético (TFA), ácido fosfórico, acrilamida, albumina sérica bovina (BSA), azida sódica, azul brilhante de coomassie G e R, azul de bromofenol, bicarbonato de sódio, N,N-metileno-bisacrilamida, carbonato de sódio anidro, cloreto de sódio (NaCl), ditioneitol (DTT), dodecil sulfato de sódio (SDS), *p*-dimetilaminocianamaldeído (DMACA), etanol, fosfato de sódio, fucsina ácida, glicerol, glucose, hipoclorito de sódio, isotiocianato de fluoresceína (FITC), β -mercaptoetanol, metanol, nitrato de prata, persulfato de amônio, sulfato de amônio, N, N, N', N'- tetrametiletilenodiamino (TEMED), tris-HCl, triton X-100, foram obtidos da Sigma Chemical Co., St. Louis USA.

Acetonitrila foi obtida da Tedia e a gelatina e demais reagentes utilizados em outras técnicas foram de grau analítico e obtidos comercialmente.

5.0 - Métodos

5.1 - Plantio, Extração de Proteínas e Detecção de Inibidores de Proteinases Cisteínicas

5.1.1 - Assepsia das Sementes, Condições de Plantio e Coleta

Sementes homogêneas quanto a características como: tamanho, cor e conformação foram selecionadas e submetidas a assepsia superficial com solução de hipoclorito de sódio contendo 0,025% de cloro ativo por 1 minuto. Logo em seguida estas sementes foram mergulhadas em água destilada para remoção do hipoclorito de sódio.

Areia retirada de leito de rio, previamente lavada e autoclavada à pressão de $9,8 \times 10^4$ Pascal e temperatura de 121 °C por período de 30 minutos foi utilizada como substrato. Esta areia foi adicionada a potes plásticos de, aproximadamente, 1 litro de volume os quais foram dispostos em casa de vegetação. Nos vinte minutos que precederam a semeadura, as sementes foram embebidas em água destilada. Esta pré-hidratação de vinte minutos foi utilizada como condição essencial para que a semente iniciasse a germinação e se desenvolvesse normalmente.

Durante período que precedeu a germinação, que leva em torno de um dia e meio a dois dias, para o genótipo CE-31, as plântulas foram regadas apenas com água destilada. No terceiro dia após germinação a aplicação de solução nutritiva de HOAGLAND e ARNON (1950), modificada de acordo com SILVEIRA *et al.*, (2001) foi iniciada, primeiramente, numa forma 10 vezes diluída da solução padrão seguida de solução diluída 5x, 2x e, finalmente, na concentração normal.

Vinte dias após plantio, 20 DAP, as raízes foram coletadas e lavadas para remoção de resíduos do solo, bem como, de rizóbios sendo, em seguida, secas e submetidas à pesagem. Este material foi armazenado em ultra freezer à temperatura aproximada de - 85 °C, onde permaneceu até o momento das extrações.

Normalmente os plantios renderam, em média, 1650 g de raízes, o equivalente a, aproximadamente, 600 plantas de feijão-de-corda (Figura 4).



Figura 4 - Plantio de feijão-de-corda [*V. unguiculata* (L.) Walp.], genótipo CE-31, em casa de vegetação. As plantas da figura apresentam vinte dias de idade.

5.1.2 - Obtenção dos Extratos Totais

Numa extração típica, lotes de aproximadamente 50, \pm 1,5 g, de raízes foram separadamente submetidos à trituração na presença de nitrogênio líquido até obtenção de uma fina farinha. A esta farinha tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, foi adicionado seguindo proporção de 1:3 (m/v). Esta mistura foi manualmente agitada em almofariz de porcelana com auxílio de pistilo sob banho de gelo (temperatura aproximada de 6, \pm 2 °C) por período de quinze minutos.

Os extratos provenientes destes lotes de 50 g foram reunidos perfazendo um único extrato que foi filtrado em tecido de trama fina e submetido à centrifugação a 3700 g, 4 °C por 48 minutos (centrífuga Sorval RC 5B plus, rotor GSA). O sobrenadante foi coletado e dialisado exaustivamente contra o tampão de extração. Ao final das diálises o extrato foi fervido por cinco minutos e novamente centrifugado nas mesmas condições acima descritas. Esta preparação final foi utilizada nos passos posteriores de detecção de inibidores de proteinases cisteínicas e obtenção de frações enriquecidas em inibidores.

5.1.3 - Experimentos Preliminares

Antes que a metodologia empregada na purificação dos inibidores, a qual envolveu fracionamento com sulfato de amônio e passos cromatográficos, seja relatada, a descrição de experimentos pilotos realizados com o objetivo de se determinar parâmetros como: 1) tampão de extração; 2) temperatura e tempo de aquecimento das amostras e 3) tempo de plantio e coleta de raízes, será, em seguida, feita.

5.1.3.1 - Temperatura e Tempo de Aquecimento dos Extratos Totais

Um dos grandes problemas envolvidos na purificação e dosagem de inibidores de proteases é a possível interferência que proteases endógenas do material de extração, seja ele, folhas, sementes, tubérculos, raízes etc., possam exercer sobre estas determinações.

Desta forma, tendo como base a grande estabilidade térmica apresentada por inibidores de proteases já bastante relatada na literatura corrente, aquecimento prévio dos extratos totais por tempo e temperatura predefinidos representa importante passo no processo de purificação, pois, além da eliminação de enzimas proteolíticas endógenas, outras proteínas, que não resistem ao processo de fervura, podem precipitar, fato que otimiza o processo de purificação. No entanto, é preciso que a temperatura e o tempo de aquecimento que não desnaturam os inibidores sejam prontamente estabelecidos.

Neste experimento, sementes de feijão-de-corda, genótipo CE-31, obtidas conforme descrito no item 4.1 e tratadas como descrito no subitem 5.1.1 foram plantadas, em casa de vegetação, em potes plásticos contendo areia de leito de rio lavada e autoclavada nas mesmas condições descritas neste subitem. No período de 11 (onze) dias após plantio (DAP) as raízes foram coletadas, lavadas, secas e pesadas (ver subitem 5.1.1).

A extração de proteínas foi realizada na presença de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, seguindo proporção de 1:3 (m/v). As temperaturas e tempos de aquecimento variaram entre 60, 70, 80, 90 e 96 ± 2 °C (temperatura de fervura) pelos períodos de 5 (cinco), 10 (dez), 15 (quinze) e 20 (vinte) minutos, respectivamente.

Importante salientar que para realização deste primeiro preliminar o tampão de extração, fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, foi utilizado, com base em muitos trabalhos que relatam a purificação de inibidores de proteinases cisteínicas os quais utilizam, durante as extrações, tampões com zona de tamponamento próximo da neutralidade, pH ~ 7,0. Entretanto, como já citado, uma vez estabelecidos tempo e temperatura de aquecimento dos extratos totais, experimentos posteriores avaliando sete faixas de pH diferentes na extração dos inibidores foram conduzidos. Com relação ao tempo de onze dias de plantio este período foi escolhido tendo como base a expansão do primeiro par de folhas secundárias, que, para o genótipo trabalhado, ocorre aproximadamente aos 11 DAP. Contudo, experimentos de avaliação dos níveis de inibidores de proteinases cisteínicas, ao longo do tempo, com período máximo de vinte e cinco dias de plantio, também foram realizados.

Como é possível observar, por se tratarem de muitas variáveis, algumas destas tiveram de ser, inicialmente fixadas.

Os parâmetros avaliados nestes experimentos preliminares foram: proteínas solúveis totais e atividade inibitória de proteinases cisteínicas por miligrama de proteína - atividade específica (UAI/mgP).

5.1.3.2 - Tampão de Extração

Os plantios foram realizados como descrito nos itens anteriores, sendo o período de coleta, o mesmo utilizado para determinação da temperatura e tempo de fervura, ou seja, 11 DAP.

As extrações foram realizadas de acordo com o subitem 5.1.2. Os tampões avaliados foram: glicina-NaOH 0,05 M, pH 2,1; glicina-NaOH 0,05 M, pH 3,0; acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2; fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0; fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21; tris-HCl 0,05 M, pH 8,1 e glicina-NaOH 0,05 M, pH 9,8.

Após obtenção dos extratos totais, estes foram aquecidos por tempo e temperatura preestabelecidos (subitem 5.1.3.1), centrifugados nas mesmas condições descritas no subitem 5.1.2 e, finalmente, utilizados para dosagem de proteínas solúveis totais e atividade inibitória de proteinases cisteínicas, subitens 5.1.4 e 5.1.5, respectivamente.

Antes da dosagem de atividade inibitória de proteinases cisteínicas nos diferentes extratos, a análise da possível interferência que, os diferentes tampões usados nas extrações, *per sí*, poderiam exercer sobre a atividade da papaína (proteinase cisteínica comercial usada na dosagem de inibidores, ver subitem 5.1.5 para mais detalhes), foi averiguada, por meio da incubação de diferentes alíquotas dos diferentes tampões com papaína, sem extratos de raízes. Estes preliminares foram realizados com o objetivo de que os tampões que, possivelmente tivessem alguma interferência na dosagem de inibidores de proteinases cisteínicas, fossem excluídos dos experimentos posteriores.

Quando os extratos obtidos com os diferentes tampões foram testados quanto à capacidade de inibição da atividade papainásica, os parâmetros avaliados foram: atividade inibitória de proteinases cisteínicas por mililitro de extrato por minuto

(UAI/mL.mL⁻¹), atividade específica (UAI/mgP) e atividade inibitória por grama de massa fresca de raiz (UAI/gMF raiz). Além disso, a dosagem de proteínas solúveis totais também foi realizada.

Nas determinações de atividade inibitória, alíquotas variando de 0 a 120 µL de extratos totais foram incubados com volumes predeterminados de papaína, baseados em curvas de atividade da protease, previamente realizadas, para construção de diferentes curvas de inibição da atividade da enzima.

5.1.3.3 - Tempo de Coleta

Uma vez determinados, que tampão utilizar durante a extração e qual temperatura e tempo de aquecimento dos extratos totais, a análise dos níveis de inibidores de proteinases cisteínicas, ao longo do tempo, foi o último preliminar realizado, com o objetivo de que curvas de atividade inibitória fossem estabelecidas na busca do tempo de coleta que proporcionasse maior rendimento protéico. Para tanto, experimentos preliminares consistindo no plantio de sementes de feijão-de-corda, CE-31, em casa de vegetação, conforme já descrito nos itens anteriores e coleta de raízes nos períodos de tempo de 10 (dez), 15 (quinze), 20 (vinte) e 25 (vinte e cinco) DAP foram realizados.

O tampão utilizado nas extrações foi aquele selecionado por meio dos experimentos descritos no subitem 5.1.3.1, e a temperatura e tempo de aquecimento utilizados, foram aqueles estabelecidos nos experimentos descritos no subitem 5.1.3.2. Os extratos totais foram realizados como descrito no subitem 5.1.2.

Após obtenção dos extratos totais, tanto a dosagem de proteínas solúveis como a determinação da atividade inibitória, em todos os experimentos preliminares aqui relatados (5.1.3.1, 5.1.3.2 e 5.1.3.3), foram realizadas conforme descritos nos subitens 5.1.4 e 5.1.5, respectivamente.

5.1.4 - Determinação dos Teores de Proteínas Solúveis Totais

A dosagem de proteínas foi realizada segundo metodologia descrita por BRADFORD, (1976) com a utilização de albumina séria bovina - BSA - na

construção da curva padrão a partir da qual o fator de correção, necessário para determinação dos teores de proteínas solúveis, foi obtido. As leituras das absorbâncias foram realizadas no comprimento de onda de 595 nm utilizando espectrofotômetro (Novaspec III, Pharmacia), após decorridos dez minutos de incubação das amostras com o reagente de Bradford.

5.1.5 - Determinação da Atividade Inibitória de Proteinases Cisteínicas

A metodologia descrita por ABE *et al.*, (1992) foi empregada na determinação da atividade de inibidores de proteinases cisteínicas. Papaína (2x cristalizada Sigma Chemical Co., St. Louis USA) dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0 foi utilizada como proteinase cisteínica padrão. N-benzoil-DL-Arginina-2-Naftilamida (BANA) foi utilizado como substrato da protease. Num ensaio típico, diferentes alíquotas das amostras contendo os inibidores foram incubadas com 40 µL de solução ativadora (DTT 0,002 M e EDTA 0,001 M em tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0) e papaína. O volume de papaína utilizado em cada ensaio foi estabelecido com base em curvas-padrão previamente realizadas por meio da incubação da papaína, em concentrações crescentes, com o substrato BANA, na ausência de qualquer inibidor. A incubação das amostras contendo os inibidores com a papaína foi realizada a 37 °C por período de 10 minutos em banho-maria. Em seguida, BANA a 0,044 % foi adicionado. Após 20 minutos de interação, também a 37°C, a reação foi parada pela adição de uma solução consistindo de HCl 2% em álcool etílico concentrado. O composto 4-dimetilaminocinamaldeído (DMACA) foi adicionado ao meio reacional para desenvolvimento da cor. Após 40 minutos, a absorbância foi monitorada a 540 nm em espectrofotômetro (Novaspec III, Pharmacia). Uma unidade de atividade inibitória foi definida como a quantidade de inibidor que diminuiu a absorbância em 0,01 unidade no comprimento de onda de 540 nm.

5.1.6 - Eletroforeses em Géis de Poliacrilamida

Eletroforeses em géis de poliacrilamida foram realizadas segundo método descrito por SCHÄGGGER e VON JAGOWO, 1987. O gel principal (separação, main gel) consistiu de solução aquosa de tampão Tris-HCL, 1,5 M pH 8,8, contendo SDS (dodecilsulfato de sódio) a 10 %, persulfato de amônio a 10 %, TEMED (N,N,N'N'-Tetrametiletilenodiamino) concentrado e a mistura, acrilamida (30%) mais bis-acrilamida (0,8 %) em concentrações finais de 12,5 % e/ou 15,0 %. O gel de acomodação (Stacking gel) consistiu de solução de Tris-HCL, 1,0 M, pH 6,8, contendo SDS a 10 %, persulfato de amônio a 10 %, TEMED concentrado e a mistura acrilamida mais bis-acrilamida na concentração final de 3,5 %.

As eletroforeses foram realizadas sob condições desnaturantes, LAEMMLI (1970). O sistema, miniVE Electrophoresis Systems (Hoefer Pharmacia Biotech Inc.), foi utilizado em todas as corridas.

A detecção de proteínas nos géis de eletroforese foi realizada por impregnação com Nitrato de Prata, de acordo com a metodologia descrita por BLUM *et. al.*, (1987).

5.1.7 - Atividade Proteolítica *in gel*

Zimogramas objetivando a detecção de possíveis proteases endógenas resistentes à fervura dos extratos brutos foram realizados segundo a metodologia descrita por MICHAUD (1998).

Para tanto, gelatina comercial, na concentração final de 0,1 % substituiu parte da água utilizada na composição do gel de eletroforese. A concentração final de acrilamida mais bis-acrilamida foi de 10,0 %. A amostra cuja presença de proteases endógenas termoestáveis seria investigada foi previamente fervida, à temperatura de aproximadamente 96 ± 2 °C, pelos períodos de 0, 15, 30, 60 e 120 minutos e, em seguida, centrifugada a 10000 *g*/ 24 °C por 10 minutos. Após esta centrifugação os sobrenadantes foram coletados e incubados com papaína por período de 10 minutos a 37 °C, em banho-maria.

Seguindo esta incubação, as misturas reacionais, amostras + papaína, foram aplicadas nos géis e as corridas eletroforéticas realizadas sob condições constantes de amperagem, à temperatura ambiente, na presença de tampão de corrida contendo SDS. Ao final das corridas, os géis foram incubados em solução de triton X 100 a 2,5 %, à temperatura ambiente, por 30 minutos, para remoção do SDS.

Após remoção do SDS, os géis foram incubados, a 37 °C por 12 horas, na solução de ativação, que consistiu de tampão fosfato de sódio 0,25 M, pH 6,0, contendo DTT 0,003 M e EDTA a 0,001 M.

Decorridas as 12 horas de incubação, os géis foram lavados com água destilada e corados com Comassie Brilliant Blue R. Após 4 horas, estes géis foram descorados e a detecção de degradação da gelatina foi visualmente realizada.

5.2 - Purificação Parcial

A seguir, experimentos objetivando a obtenção de frações protéicas, a partir dos extratos totais, contendo atividade inibitória de proteinases cisteínicas, bem como a utilização de diferentes passos cromatográficos na tentativa de purificação destes inibidores, são relatados.

5.2.1 - Fracionamento com sulfato de amônio

Fracionamento com sulfato de amônio nas faixas de 0/30, 30/60, 60/90, 0/60 e 0/90 % de sulfato de amônio foi realizado na tentativa de se determinar qual ou quais faixas de precipitação concentravam a maior parte da atividade inibitória de proteinases cisteínicas.

O fracionamento foi realizado por meio de vagarosa adição de sulfato de amônio, até total dissolução do mesmo, ao extrato inicial (sob agitação) seguindo tabela de precipitação para 24 °C. Ao final da adição do sal, o extrato permaneceu sendo agitado por mais duas horas sendo, em seguida, deixado em repouso por 12 horas, à temperatura de 8, ± 2°C, em Isotrio. O precipitado foi coletado por centrifugação a 3700 g, 4 °C, por 48 minutos (centrífuga Sorval RC 5B plus, rotor

GSA) e disperso em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21. O sobrenadante resultante foi submetido à nova precipitação, agora em outra faixa.

Este procedimento foi repetido até que todas as frações desejadas fossem obtidas. Ao final, diálises exaustivas contra água grau Milli-Q foram realizadas para posterior liofilização das frações.

5.2.2 - Passos Cromatográficos

Na tentativa de purificação dos inibidores de proteinases cisteínicas de raízes de feijão-de-corda, diferentes passos cromatográficos, isolados ou em seqüência, foram avaliados. Em todos os casos, a medida das absorvâncias foi realizada a 280 nm, à exceção das cromatografias de fase reversa, utilizando espectrofotômetro Novaspec III da Pharmacia.

5.2.2.1 - Cromatografia de Afinidade

Papaína (Sigma) carboximetilada, acoplada à Sepharose 4B (Pharmacia) foi usada como coluna de afinidade (~ 10,0 mL). O equilíbrio da coluna foi feito com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, no qual as amostras foram dissolvidas. Amostras aplicadas ficaram em contato por diferentes intervalos de tempo. Após remoção do pico não retido, por simples passagem do tampão de equilíbrio, o pico retido foi eluído por elevação de pH, o que foi conseguido com a aplicação de tampão glicina-NaOH 0,05 M, pH 11,0.

5.2.2.2 - Cromatografia de Exclusão Molecular

Coluna de exclusão molecular, Superose 12 HR 10/30, ~ 24mL, (Pharmacia), acoplada a um sistema de cromatografia líquida de rápida performance (FPLC - *Fast Performance Liquid Chromatography* - Pharmacia LKB), previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, foi utilizada alternativamente à coluna de afinidade. O fluxo aplicado foi de 0,5 mL por minuto e o volume de amostra coletado por tubo variou de acordo com a quantidade de proteína aplicada.

5.2.2.3 - Cromatografia de Interação Hidrofóbica

Coluna de Interação hidrofóbica, Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow (Low sub), ~ 10 mL, Pharmacia, previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, contendo sulfato de amônio 1,0 M foi outra alternativa avaliada. A eluição das proteínas adsorvidas foi realizada por aplicação de tampão fosfato de sódio 0,05M, pH 7,21, contendo sulfato de amônio nas concentrações decrescentes de 1,0; 0,75; 0,5; e 0,0 M. A remoção das substâncias mais fortemente aderidas à matriz (componentes mais hidrofóbicos) foi feita por passagem de água grau Milli-Q.

5.2.2.4 - Cromatografia de Troca Iônica

Colunas de troca aniônica, Resource Q (GE Healthcare) e catiônica, Resource S (GE Healthcare), ambas com 1,0 mL de volume, separadamente acopladas a um sistema FPLC, também foram empregadas na tentativa de purificação das cistatinas. O fluxo mantido foi de 0,5 mL por minuto. Ambas as colunas foram equilibradas com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21. Tanto as modalidades de gradientes salinos contínuos, como descontínuos, foram utilizadas na eluição das proteínas adsorvidas às matrizes.

5.2.2.5 - Cromatografia de Fase Reversa

O último passo cromatográfico avaliado foi cromatografia de fase reversa. Neste caso, coluna de fase reversa, μ RPC C2/C18 ST 4.6/100, ~1,6 mL, (GE Healthcare), acoplada a um sistema de cromatografia líquida de alta performance (HPLC- *High Performance Liquid Chromatography* – Waters®), foi utilizada.

A coluna foi previamente equilibrada em solução A, que consistiu em TFA (ácido trifluoracético) a 0,1 % dissolvido em água grau Milli-Q. Após aplicação da amostra, ressuspensa em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, concentrações crescentes da solução B, composta de acetonitrila a 80 %, TFA 0,09 % e água grau Milli-Q, foram aplicadas.

O fluxo utilizado foi de 0,5 mL por minuto e as coletas dos picos realizadas manualmente. Após coletados, os picos foram imediatamente congelados em ultra freezer a $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, em seguida, liofilizados para posterior dissolução em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, e determinação da atividade inibitória de proteinases cisteínicas e demais atividades biológicas.

5.3 - Manutenção da População de *M. javanica* e Atividades Biológicas

5.3.1 – Manutenção da População de *M. javanica*

Sementes de tomate, cultivares Santa Adélia e Kada Gigante e quiabo, cultivar Santa Cruz 47, foram lavadas em água destilada e, em seguida, colocadas para germinar em bandejas de isopor (sementeira) contendo areia de leito de rio, previamente lavada e autoclavada ($121\text{ }^{\circ}\text{C}$, $9,8 \times 10^4$ Pascal) por duas vezes durante 30 minutos, com intervalos de 24 horas a cada autoclavagem.

Dez dias após semeio, as plantas foram transferidas para vasos com capacidade de 1,5 litros contendo como substrato uma mistura de húmus e areia de leito de rio, na proporção de 1:2 (m/m), respectivamente, e utilizadas como hospedeiras. O substrato foi previamente esterilizado nas mesmas condições descritas acima. Três dias após transferência, cada planta foi inoculada com 3 a 5 massas de ovos depositadas na base do caule em um orifício de 2 cm de profundidade feito no substrato. As raízes foram coletadas sessenta dias após inoculação e lavadas, cuidadosamente, em água corrente, para remoção das partículas de substrato aderidas. As massas de ovos foram coradas por imersão das raízes em solução de fucsina ácida 0,1%, durante 30 minutos, (BYRD *et al.*, 1983) (Figura 5). A coleta das massas foi realizada com auxílio de alças metálicas, sob microscópio estereoscópico, sendo as massas colocadas em tubos de microcentrífuga (tipo eppendorf) contendo água destilada. Estas massas foram usadas para manutenção da população ou para obtenção de juvenis de segundo estágio (J2).

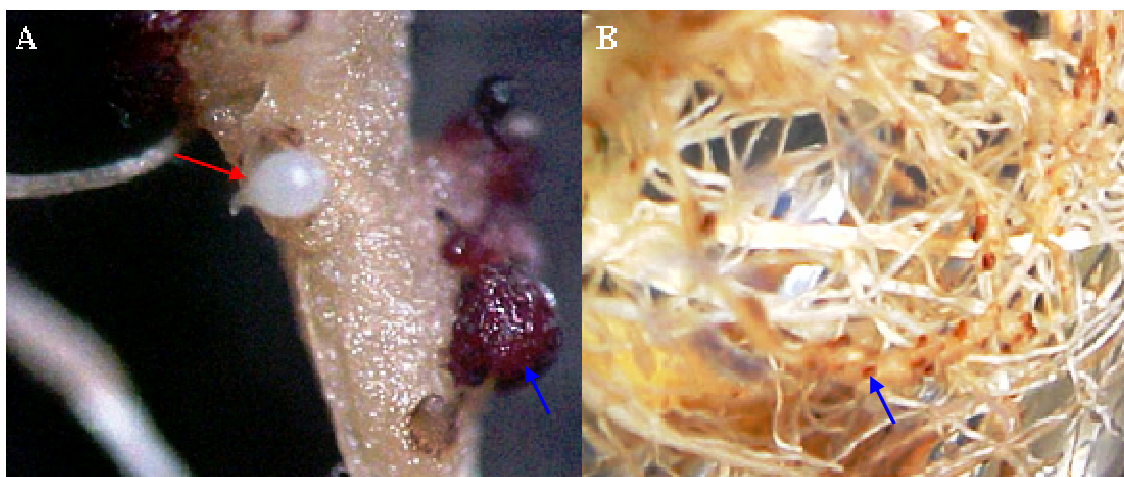


Figura 5- Aspecto de massas de ovos de *M. incognita*, após coloração com fucsina ácida. Todo o procedimento de plantio, inoculação, coloração e remoção de fêmeas e massas de ovos foi realizado em nossa casa de vegetação. A- Massas de ovos em raízes de quiabo, cultivar, Santa Cruz 47. B- Massas de ovos em raízes de tomateiro, cultivar, Santa Adélia. A seta vermelha (A) indica uma fêmea, propositalmente, retirada de uma galha e disposta sobre a raiz enquanto as setas azuis (A e B) indicam massas de ovos. Apesar de os experimentos, neste trabalho, terem sido realizados com *M. javanica*, tanto o formato das massas de ovos, como das fêmeas é bastante semelhante entre espécies do gênero *Meloidogyne*.

5.3.2 - Obtenção Dos Juvenis de Segundo Estádio (J2) de *M. javanica*

As massas de ovos, obtidas conforme item 5.3.1, passaram por processo de assepsia superficial que consistiu na imersão das mesmas em solução de hipoclorito de sódio contendo 0,05% de cloro ativo, durante 3 minutos, seguida de 3 lavagens com água destilada estéril para retirada do hipoclorito e da fucsina ácida (HUSSEY E BARKER, 1973). Após a assepsia, as massas de ovos foram colocadas em câmaras de eclosão, constituídas por malha de tecido fino e poroso (tipo escaline), colocada sobre borda da parte inferior de uma placa de Petri de 2 cm de diâmetro, preenchida com água grau Milli-Q, estéril. As massas de ovos foram depositadas sob a malha de tecido e a câmara de eclosão foi acondicionada em recipiente fechado e forrado com papéis de filtro umedecidos, sendo mantida em câmara para desenvolvimento de organismos biológicos (BOD - *Biological Organisms Development*), a 26 °C. Os J2 que eclodiram migraram através da malha sendo coletadas na placa de Petri. Os J2 eclodidos nas primeiras 24 horas foram descartados e aqueles com tempo de eclosão variando entre 48 e 72 horas foram coletados a cada 12 horas, contados e armazenados em béquer ou tubos tipo eppendorf, até perfazerem número suficiente para os experimentos, de acordo com o descrito por MARTINS, 2007, (Figura 6).

5.4 - Avaliação do efeito de picos cromatográficos, frações e extratos totais de raízes de feijão-de-corda sobre a mobilidade e mortalidade de juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica* raça 1

5.4.1 – Ensaio de Inibição de Mobilidade e Mortalidade

A metodologia descrita por SILVA *et al.*, (2000), com algumas modificações, foi empregada para estas análises. Os J2 de *M. javanica*, raça 1 obtidos conforme descrito no item 5.3.2, foram colocados em soluções aquosas esterilizadas em filtros (MilliPore®) com poros de 25 µm. Volumes variados das amostras testes contendo 20, 40 e 60 µg de proteínas, à exceção dos extratos brutos que continham apenas 20 e 40 µg de proteínas, foram aplicados em poços de placa de microtitulação (tipo

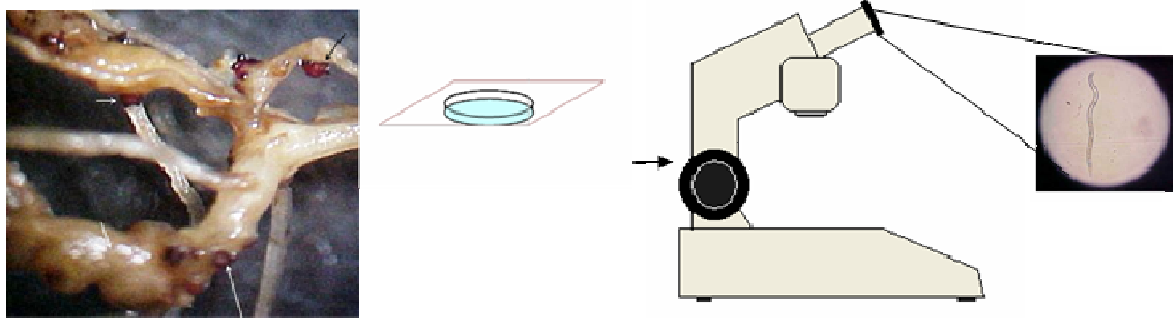


FIGURA 6 – Método para obtenção de juvenis de segundo estágio (J2) de *M. javanica*. As setas indicam as massas de ovos de *M. javanica*, previamente coradas com fucsina ácida. Antes de serem utilizadas para eclosão de juvenis as massas de ovos foram submetidas à assepsia superficial em solução de hipoclorito de sódio. Tanto o hipoclorito como a fucsina residual foram removidos por lavagens posteriores em água destilada. Só então estas massas foram dispostas em câmaras de eclosão.

ELISA) juntamente com cerca de 25 J2 por poço. A placa foi vedada e incubada a 26 °C em BOD. Vinte e quatro horas depois, os J2 foram observados em microscópio estereoscópico e avaliados quanto à mobilidade e mortalidade. Os ensaios foram realizados em triplicatas, sendo água grau Milli-Q estéril e tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, utilizados como controles. O desenho esquemático da (Figura 7) ilustra o procedimento empregado nos ensaios de averiguação dos efeitos nematostático e nematicida dos inibidores de proteinases cisteínicas.

Os nematóides foram considerados móveis quando apresentavam movimentos ativos; imóveis quando estavam parados, mas se movimentavam ao serem tocados com fina haste metálica e mortos quando mesmo com o toque não voltavam a se mover (MARTINS, 2007).

5.5 - Avaliação Microscópica da Interação de uma Fração Específica com a estrutura interna e externa de J2 de *M. javanica* raça 1

5.5.1 - Acoplamento da Fração F30/60 com FITC (Isotiocianato de Fluoresceína)

A metodologia de acoplamento das proteínas de interesse foi a mesma descrita por HOWARD (1993). A fração F30/60 foi liofilizada e dissolvida em tampão carbonato / bicarbonato 0,5 M, pH 9,5. Aproximadamente, dez miligramas da fração F30/60 foram dissolvidos em 1 mL de tampão carbonato/bicarbonato 0,5 M, pH 9,5. Esta mistura foi fervida por 15 minutos e centrifugada a 10000 g/ 24 °C, por 10 minutos. FITC (isotiocianato de fluoresceína) na concentração de 3 µg de FITC/mg de proteína foi adicionado ao sobrenadante da fração F30/60. A mistura foi suavemente agitada à temperatura de 25 °C em um agitador rotativo de tubos de ensaio por 90 minutos, para permitir o acoplamento. Este passo foi realizado ao abrigo da luz, por meio do envolvimento do tubo contendo a amostra com papel alumínio. Após incubação, a mistura foi centrifugada a 10000 g/ 24 °C, por 10 minutos.

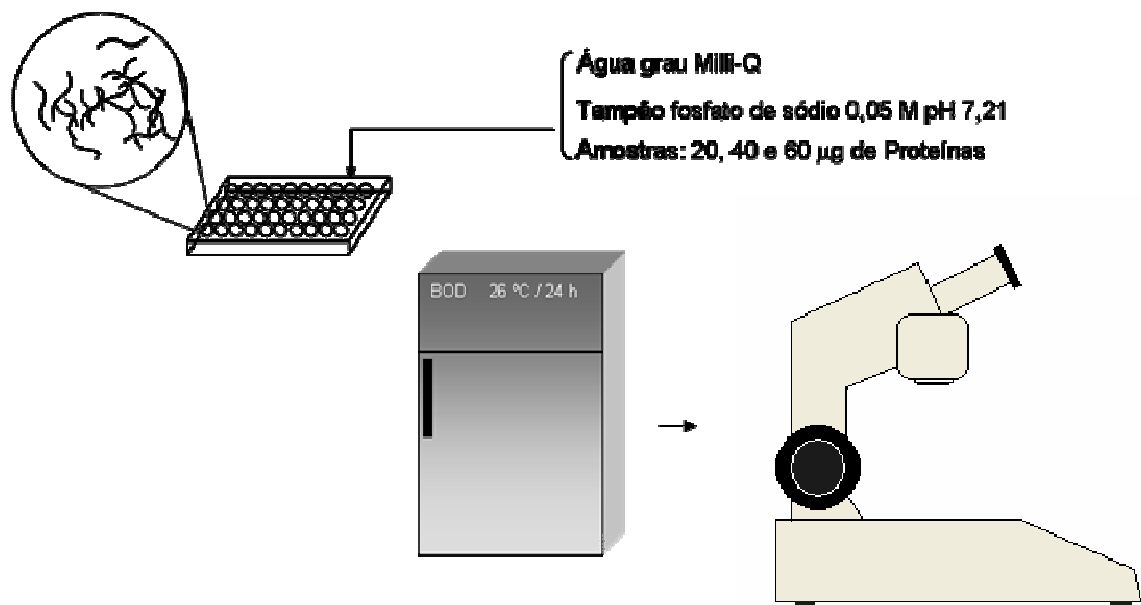


FIGURA 7. Desenho esquemático ilustrando os diferentes passos referentes aos ensaios de avaliação da capacidade dos inibidores de proteinases cisteínicas de raízes de feijão-de-corda em alterar a mobilidade de J2 de *M. javanica* e/ou causarem mortalidade destes.

5.5.2 - Remoção do FITC não acoplado

Coluna de exclusão molecular, Sephadex G25 (Hitrep Desalting, 5 ml, Pharmacia) foi utilizada para remoção do FITC livre, ou seja, todo o FITC que não se conjugou às proteínas.

A coluna foi previamente equilibrada em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21. O sobrenadante obtido na centrifugação realizada após o processo de acoplamento foi aplicado na coluna e um fluxo de 0,5 mL por minuto foi utilizado. Inicialmente, os primeiros, 1,5 mL de tampão foram descartados e os 2,5 mL seguintes, coletados. O FITC livre foi posteriormente eluído por simples passagem do tampão de equilíbrio. Após uso a coluna foi armazenada em azida sódica a 0,04 %.

5.5.3 - Determinação da Relação: Proteína Conjugada ao FITC / Proteína Livre

Após eluição visual e coleta do material contendo o complexo FITC-F 30/60, leituras nos comprimentos de onda de 495 e 280 nm foram realizadas para determinação da relação de proteínas acopladas à FITC para proteínas não acopladas, utilizando espectrofotômetro (Novaspec III, Pharmacia). A figura 8 é um desenho esquemático que ilustra, resumidamente, todo o processo de acoplamento aqui descrito.

5.5.4 - Incubação de J2 de *M javanica* raça 1 com F 30/60 acoplada ao FITC

Juvenis de segundo estágio de *M. javanica* raça 1 foram submetidos à eclosão como descrito no subitem 5.3.2. J2 eclodidos foram reunidos em tubos de tipo eppendorf (2,0 mL) e armazenados à temperatura ambiente até o momento do uso.

Durante os experimentos 600 µL de amostra (F30/60 + FITC) foram incubados com 240 µL de suspensão de juvenis de *M. javanica* raça 1. Os controles foram realizados por incubação dos J2 apenas com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21. Os volumes adotados acima dão uma relação de, aproximadamente, 10

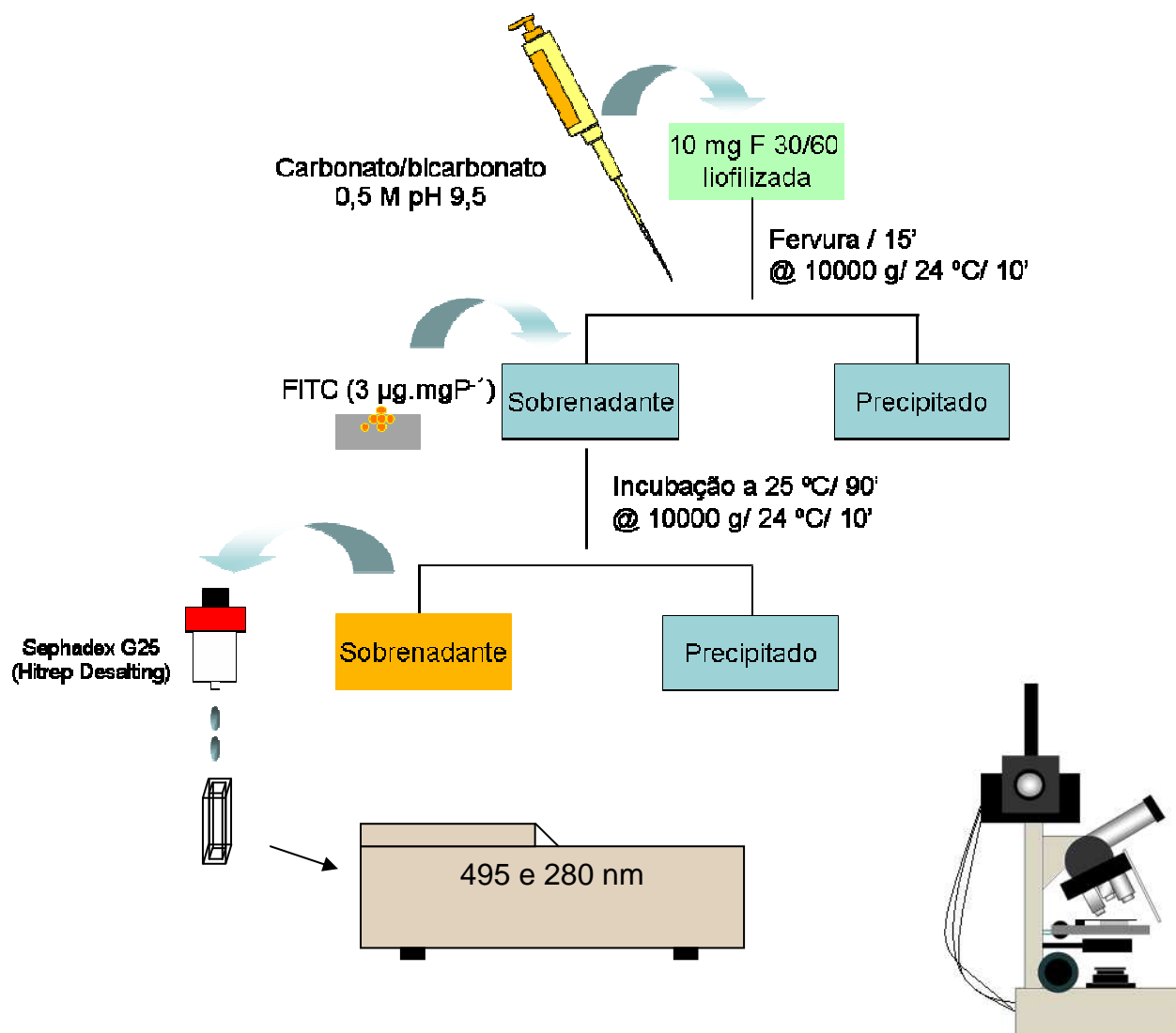


FIGURA 8 – Desenho esquemático representando os passos envolvidos desde o processo de conjugação do isotiocianato de fluoresceína às proteínas presentes na fração F 30/60, até as análises microscópicas. Para descrição mais detalhada ver texto.

(dez) μg de proteína por J2 e esta proporção foi baseada no descrito por (SCHROEDER e MACGUIDWIN, 2007).

Dois períodos de avaliação foram estabelecidos, sendo estes de 6 (seis), e 24 (vinte e quatro) horas após incubação com os juvenis. A incubação foi realizada à temperatura ambiente com a mistura (controle ou tratamento) ficando protegida da luz até o momento das análises. Seis e vinte e quatro horas após incubação, determinadas alíquotas das misturas foram centrifugadas a 500 g/24 °C, por 3 minutos para concentração dos juvenis e separação dos mesmos das proteínas que não interagiram. O precipitado foi alíquotado e novamente centrifugado, nas mesmas condições já descritas. Este procedimento foi repetido até remoção das amostras (F30/60 + FITC) que, até os períodos de 6 e 24 horas, não interagiram com os J2. Em seguida, as suspensões de J2 foram aplicadas em lâminas e analisadas, no escuro, quanto à emissão ou não de fluorescência.

As observações foram realizadas num microscópio de luz (Modelo Olympus) ao qual uma máquina fotográfica (Olympus) foi devidamente acoplada.

5.6 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O software SISVAR (**S**istema de Análise de **V**ariância - Daniel Furtado Ferreira, 2003. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, Brasil), foi utilizado na realização dos tratamentos estatísticos. Em todos os casos, teste de Tukey, com nível de significância de 0,05 %, foi empregado.

6.0 - Resultados

6.1 - Resultados Referentes aos Experimentos Preliminares

6.1.1 - Temperatura e Tempo de Aquecimento dos Extratos Totais

A análise da atividade inibitória de proteinases cisteínicas em extratos submetidos a diferentes tratamentos térmicos, por diferentes períodos de tempo, revelou que as temperaturas de 60, 70, 80, 90 e 96 ± 2 °C (temperatura de fervura), não interferiram consideravelmente nesta atividade, quando o tempo de aquecimento de cinco minutos foi utilizado (Figura 9).

No entanto, aos dez minutos, diferenças na atividade inibitória com relação ao tempo de cinco minutos foram nitidamente observadas, em todos os tratamentos térmicos. O mesmo aconteceu aos quinze e vinte minutos de aquecimento (Figura 9).

Desta forma, como o período de cinco minutos foi o que preservou maior atividade inibitória e, levando em consideração o fato de que dentro do período de cinco minutos, diferenças marcantes na atividade de extratos aquecidos nas diferentes temperaturas testadas, não foram observadas, a temperatura de fervura (96 ± 2 °C) foi então selecionada.

Baseado neste dado, todos os extratos posteriores foram submetidos à fervura, por período de cinco minutos.

6.1.2 - Tampão de Extração

Como já citado na metodologia o tampão utilizado nos experimentos de determinação de tempo e temperatura ideais de aquecimento foi o fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21. Entretanto, a confirmação de que este seria o tampão de extração definitivo só foi posteriormente realizada, por meio da determinação da atividade inibitória de proteinases cisteínicas de extratos de raízes de feijão-de-corda obtidos com auxílio de sete diferentes tampões de extração, dentre os quais, o fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, esteve presente.

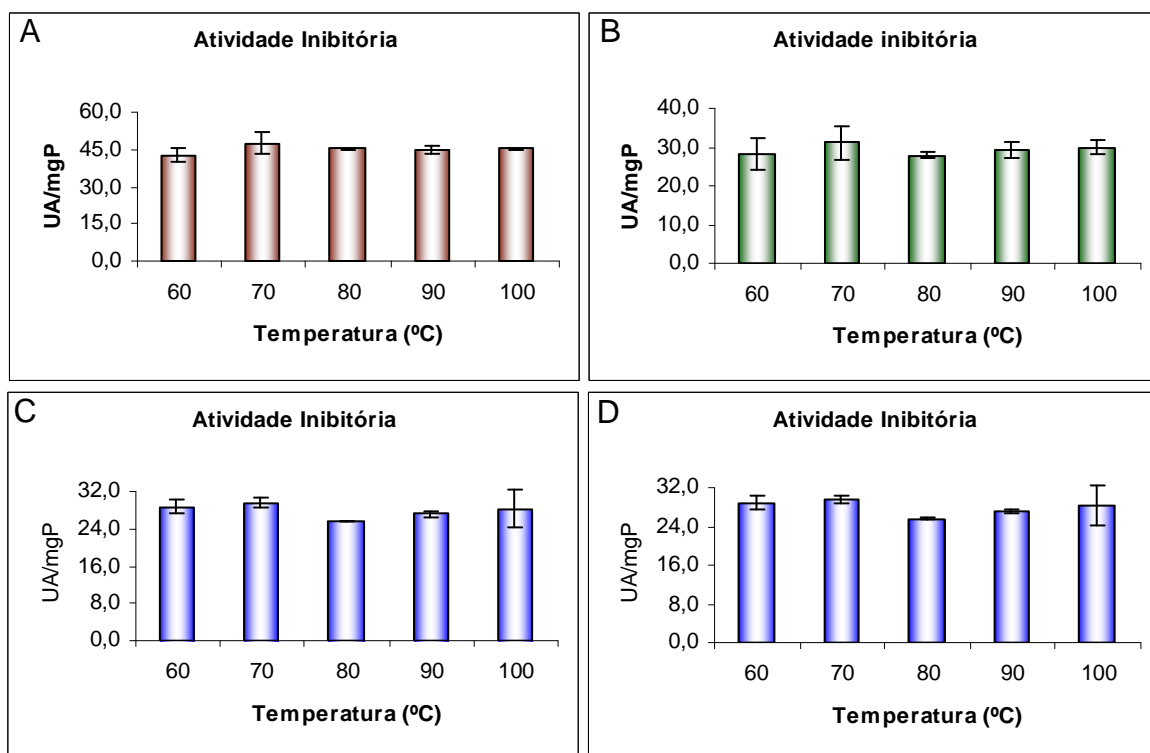


Figura 9 - Atividade inibitória de proteinases cisteínicas de extratos totais de raízes de feijão-de-corda submetidos a diferentes tratamentos térmicos, por diferentes períodos de tempo. A – atividade de extratos aquecidos por cinco minutos; B – atividade de extratos aquecidos por dez minutos; C – atividade de extratos aquecidos por quinze minutos e D – atividade de extratos aquecidos por vinte minutos. Em todos os casos a atividade está expressa em termos de unidade de atividade inibitória por miligrama de proteína (UA/mgP), atividade específica. A temperatura de 100 °C representa temperatura de fervura que consistiu, a rigor, em temperatura de 96 ± 2 °C.

Os tampões avaliados foram: glicina-NaOH 0,05 M, pH 2,1; glicina-NaOH 0,05 M, pH 3,0; acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2; fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0; fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21; tris-HCl 0,05 M, pH 8,1 e glicina-NaOH 0,05 M, pH 9,8.

Inicialmente, a análise da possível interferência que os diferentes tampões, *per si*, poderiam exercer sobre a atividade da papaína, mostrou que aqueles tampões de pH mais baixos, a saber, glicina-NaOH 0,05 M, pH 2,1; glicina-NaOH 0,05 M, pH 3,0 e acetato de sódio 0,05 M, pH 5,2, causaram diminuição da atividade papainásica, o que impossibilitou o uso destes tampões em experimentos posteriores.

Dessa forma, apenas os quatro tampões de pH mais elevados, fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0; fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21; Tris-HCl 0,05 M, pH 8,1 e glicina-NaOH 0,05 M, pH 9,8, foram utilizados na determinação do tampão ideal para extração de inibidores de proteinases cisteínicas.

A figura 10 mostra os perfis das curvas de inibição obtidas quando diferentes alíquotas, variando de 0 a 120 μ L de extratos totais, foram incubadas com volumes fixos de papaína. As curvas denotam a redução da absorbância, no comprimento de onda de 540 nm, quando alíquotas crescentes de extratos contendo os inibidores foram incubadas com papaína. Observar que, na ausência do inibidor, volume 0, a papaína apresenta a máxima hidrólise do substrato BANA, como verificado pela maior leitura de absorbância, a 540 nm. Esta é a leitura da reação não inibida e foi tomada como base para análise do grau de inibição ocasionado pelas amostras.

O tampão que extraiu a maior quantidade de inibidores de proteinases cisteínicas, considerando a atividade por grama de massa fresca de raiz e, ainda, a atividade por mililitro, foi o tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21. Em termos de atividade específica, o tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0, a partir dos 40 μ L, pareceu extrair maior quantidade de inibidores. No entanto, o tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, foi selecionado, baseado, como já citado, nos parâmetros de atividade por grama de massa fresca de raiz e atividade por mililitro, que são bastante representativos da capacidade de extração dos tampões testados (Figura 11).

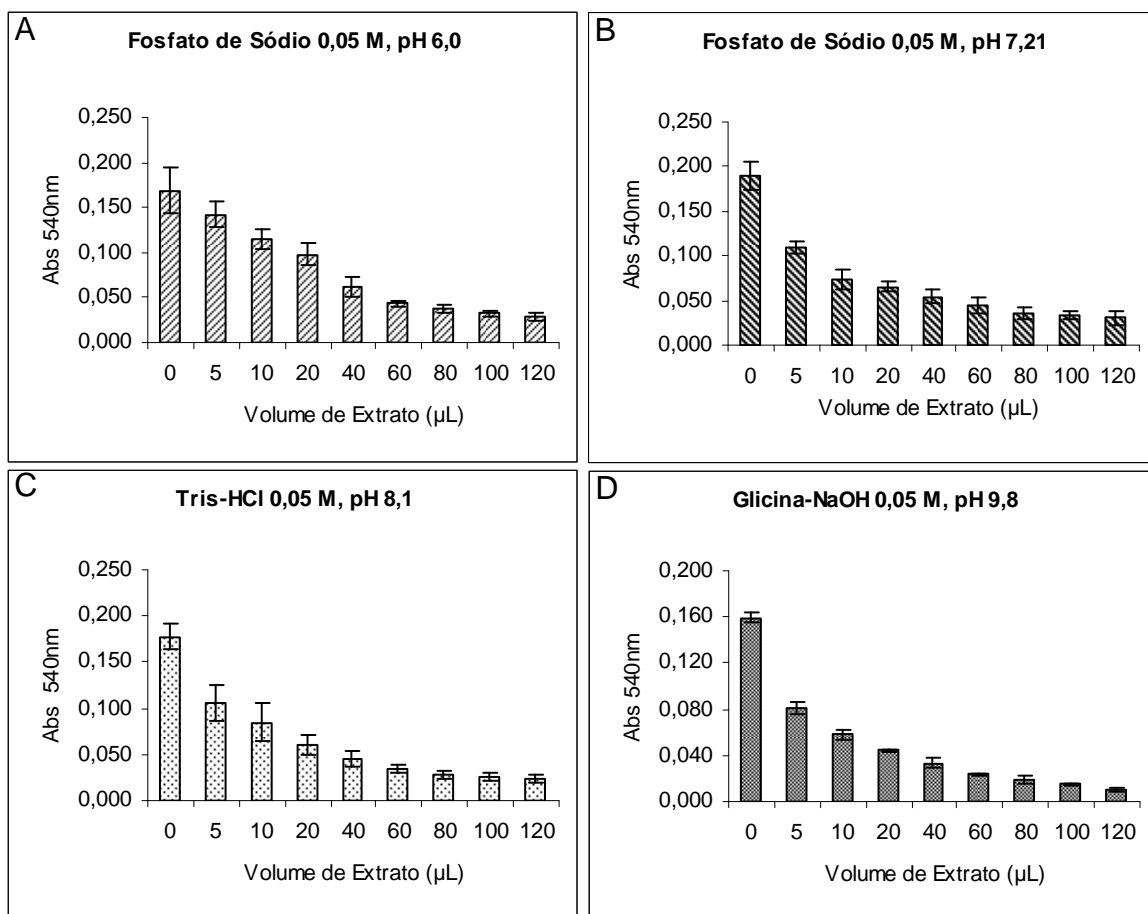


Figura 10 – Curvas de inibição da atividade papainásica expressas em função da redução da absorbância, no comprimento de onda de 540 nm. Alíquotas de 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 e 120 µL de extratos totais de raízes de feijão-de-corda, em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 6,0; tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21; tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,1 e tampão glicina-NaOH, 0,05 M, pH 9,8, foram incubadas com volumes de papaína pré-estabelecidos com base em curvas de atividade da enzima.

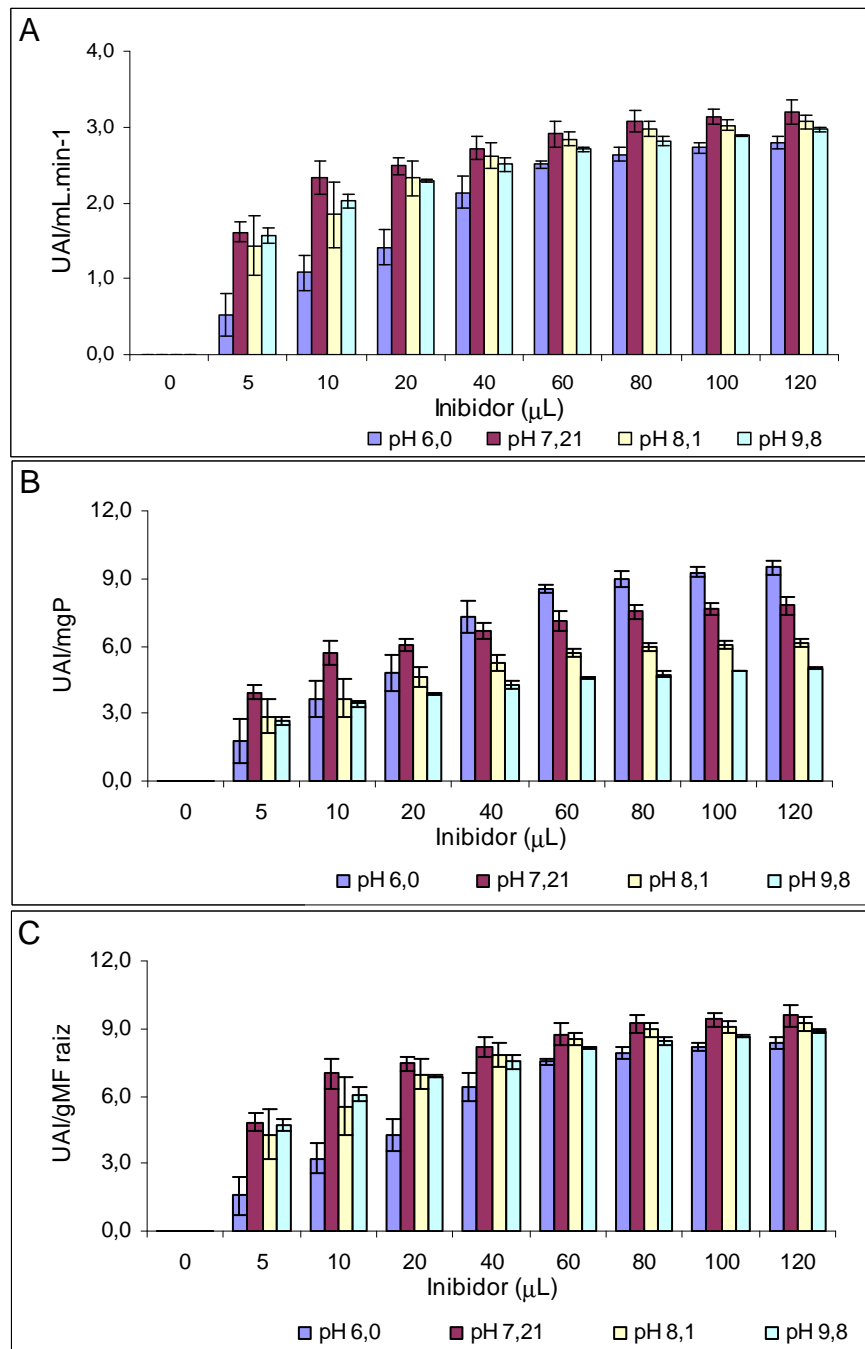


Figura 11 – Atividade inibitória de proteínases cisteínicas de raízes de feijão-de-corda submetidas à extração em tampão fosfato de 0,05 M, pH 6,0; tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21; tampão Tris-HCl, 0,05 M, pH 8,1 e tampão glicina-NaOH, 0,05 M, pH 9,8. A – atividade por mililitro; B – atividade específica e C – atividade por grama de massa fresca de raiz. O tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, baseado nos critérios A e C, foi selecionado como tampão ideal para extração de inibidores de proteínases cisteínicas.

6.1.3 - Tempo de Coleta

Até o presente momento, a utilização de tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, na obtenção dos extratos totais, bem como, fervura (96 ± 2 °C) destes extratos totais, por período de cinco minutos, foram os parâmetros iniciais na obtenção e purificação de inibidores de proteinases cisteínicas de raízes de feijão-de-corda, estabelecidos.

O próximo experimento consistiu na avaliação da atividade inibitória ao longo do tempo. Extratos totais oriundos de raízes de feijão-de-corda coletadas aos 10, 15, 20 e 25 DAP foram submetidos à dosagem de proteínas solúveis totais e atividade inibitória.

Aumento crescente na massa média do sistema radicular das plantas, no decorrer de seu desenvolvimento, durante os períodos de 10, 15, 20 e 25 DAP, foi observado. A análise da quantidade de proteínas por raiz mostrou que os maiores níveis se concentraram ao longo de 20 e 25 DAP (Figura 12 B).

Tomando como referência atividade inibitória, com relação à concentração de proteínas solúveis totais (atividade específica), bem como, a atividade inibitória com relação à massa de 1 (um) grama de tecido radicular, os dados apontam para o período de 25 DAP, como sendo o tempo em que os maiores níveis de inibidores são expressos (Figura 13).

Entretanto, a análise da atividade inibitória total, figura 14, expressa pelo produto da atividade por grama de massa fresca de raízes pela massa fresca total das raízes, mostra que o período de 20 DAP apresenta atividade semelhante à observada aos 25 DAP. Apesar de, aos 15 DAP, a atividade total se assemelhar à atividade encontrada aos 20 DAP, o que nós observamos foi uma tendência a maior acúmulo de inibidores ao longo do desenvolvimento (Figura 14).

Desta forma, considerando o fato de que a tendência geral é de aumento progressivo nos níveis de inibidores, ao longo do tempo, o período de 20 DAP foi escolhido como tempo de coleta de raízes. O tempo de 25 DAP foi excluído por ter sido considerado tempo de plantio demasiadamente longo, além, também de, quantitativamente, não diferir significativamente do período de 20 DAP (Figura 14).

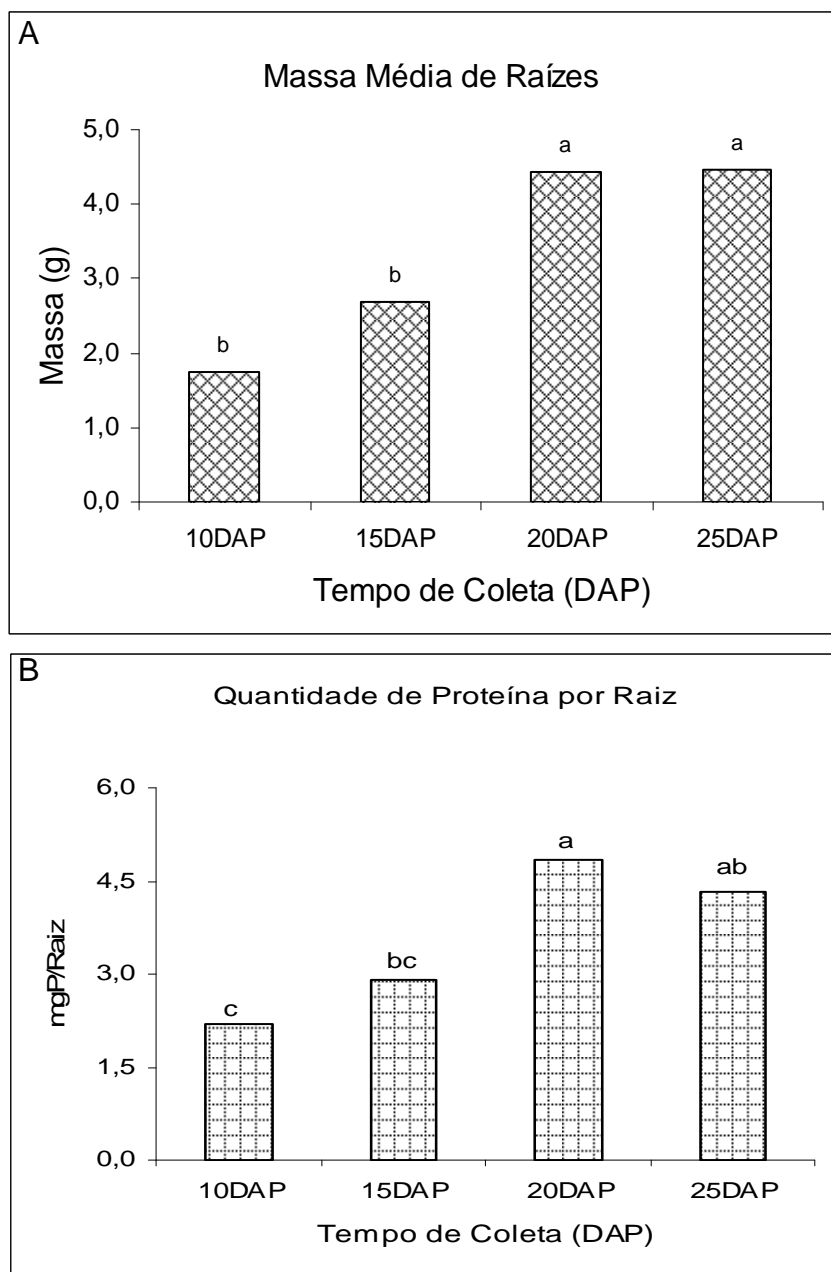


Figura 12 - A – Massa média do sistema radicular de plantas de feijão-de-corda, genótipo CE-31, coletadas 10, 15, 20 e 25 DAP. Notar que esta figura evidencia a massa média de uma única raiz, ao longo dos diferentes tempos de coleta. B – Proteínas solúveis totais por massa total média de uma raiz. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas, de acordo com o teste de Tukey, a nível de significância de 0,05 %.

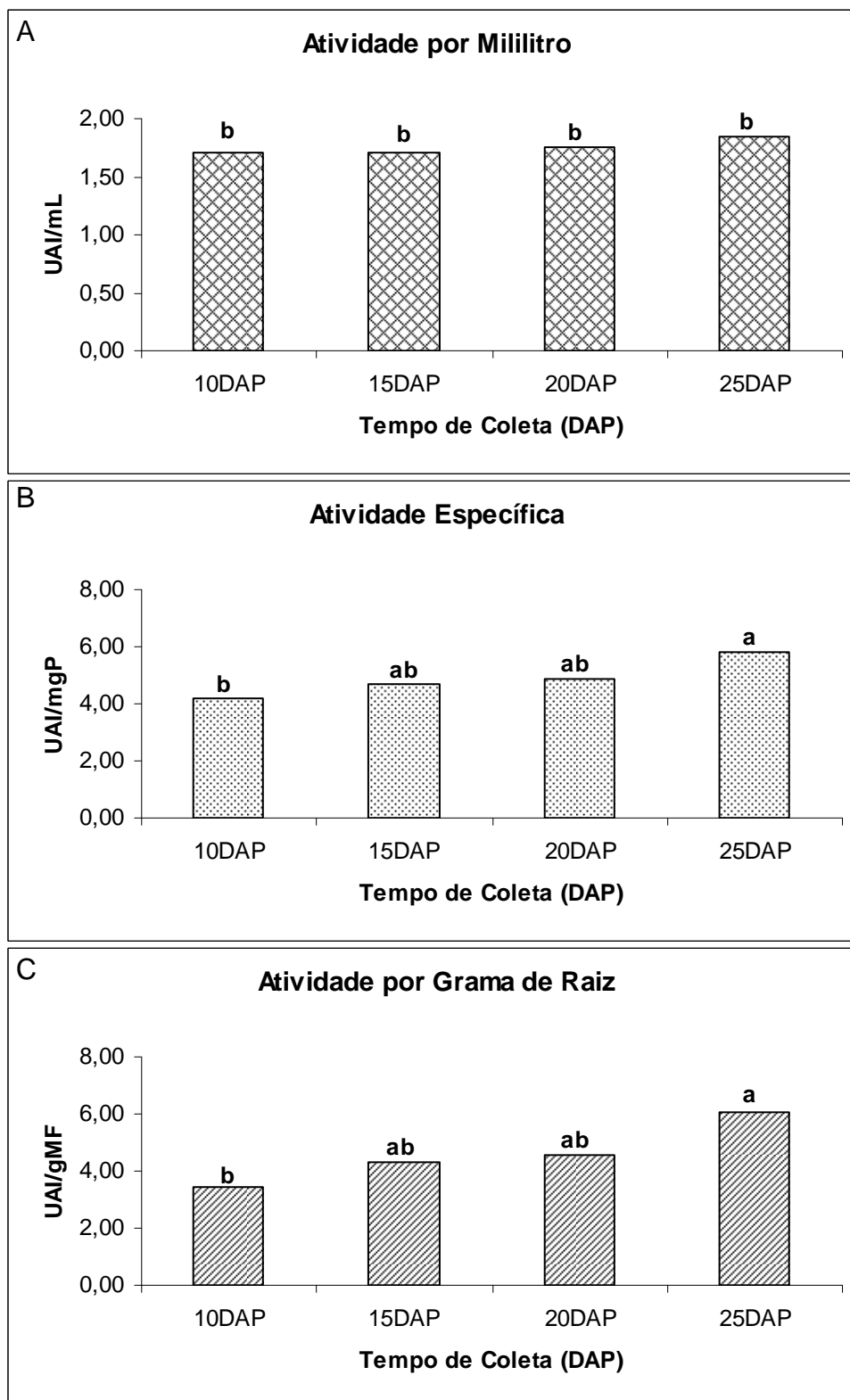


Figura 13 – Atividade inibitória de proteinases cisteínicas de extratos totais de raízes de feijão-de-corda coletadas aos 10, 15, 20 e 25 DAP. Atividade por mililitro (A), atividade específica (B), atividade por grama de massa fresca de raízes (C). Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas, de acordo com o teste de Tukey, a nível de significância de 0,05 %.

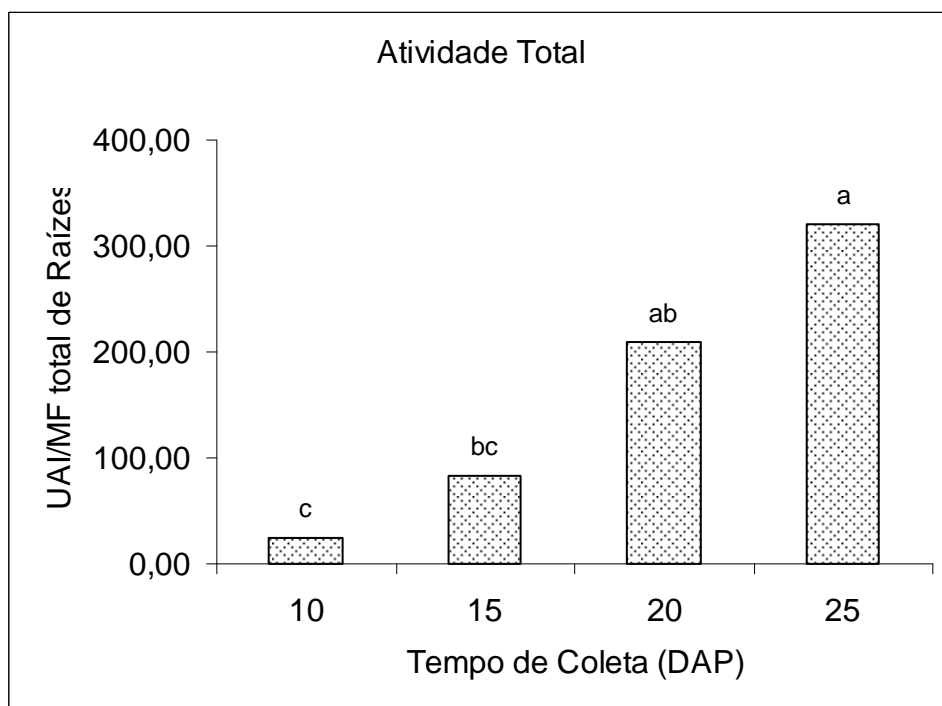


Figura 14 – Atividade inibitória de proteinases cisteínicas total, ao longo de, 10, 15, 20 e 25 DAP. Notar que, apesar de o tempo de 20 DAP apresentar atividade estatisticamente semelhante ao tempo de 15 DAP, uma tendência de aumento crescente na atividade inibitória é observada. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas, de acordo com o teste de Tukey, a nível de significância de 0,05 %.

6.2 - Fracionamento com sulfato de amônio

Os níveis de proteínas solúveis totais variaram, consideravelmente, entre as diferentes faixas de precipitação com sulfato de amônio testadas. O fato de a fração 0/90, que corresponde a uma faixa de precipitação que englobaria praticamente todas as proteínas dos extratos totais, ter mostrado teores de proteínas significativamente menores que estes pode indicar a presença de pigmentos ou outros componentes que tenham interferido nesta medição (Figura 15).

A redução de atividade inibitória de todas as frações, quando comparadas com os extratos brutos, pode ser devido a algo parecido com o que, supostamente, ocorreu na determinação dos teores de proteínas solúveis totais. Ou seja, outras moléculas, não protéicas, estariam exercendo essa atividade nos extratos totais. No entanto, analisando apenas as frações, o que se observa é que cada faixa de precipitação com sulfato de amônio apresenta atividade inibitória de proteinases cisteínicas (Figura 16). Contudo, partindo do princípio de que as frações com maiores níveis de proteínas totais estariam “mais contaminadas” resolvemos trabalhar, inicialmente, apenas com as faixas de precipitação com sulfato de amônio correspondentes a 30/60 e 60/90 % de saturação. Além disso, a análise da atividade inibitória por grama de massa fresca de tecido radicular revelou que esta atividade foi bastante concentrada entre as frações F 30/60 e F 60/90, particularmente, nesta última. Fato que também contribuiu com a escolha destas duas frações, como candidatas aos passos posteriores de purificação (Figura 17). A utilização de F 0/30 foi menos cogitada, dado seus elevados níveis de proteínas totais, com relação à F 30/60 e F 60/90, e baixos níveis de inibidores de proteinases cisteínicas com relação a todas as frações (Figura 16).

As eletroforeses em géis de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, não revelaram, visualmente, diferenças muito marcantes quanto ao perfil de bandas dos diversos materiais analisados, extratos totais e frações, à exceção da fração 60/90 que concentrou fortemente uma banda ou grupo de bandas próximo ao marcador de 20 KDa (Figura 18). Mesmo assim, a utilização inicial de F 30/60 e F 60/90 nos passos posteriores foi mantida.

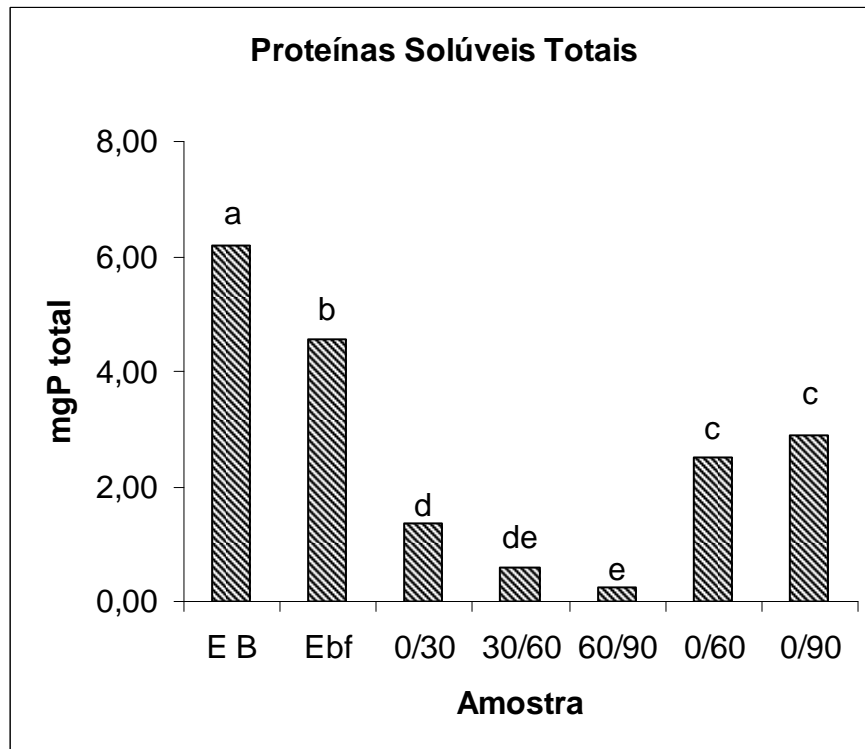


Figura 15 - Proteínas solúveis totais oriundas de raízes de feijão-de-corda. E B - extrato bruto não fervido, Ebf - extrato bruto fervido, 0/30, 30/60, 60/90, 0/60 e 0/90 são as frações obtidas por fracionamento dos extratos brutos fervidos, com sulfato de amônio. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas, de acordo com o teste de Tukey, a nível de significância de 0,05 %.

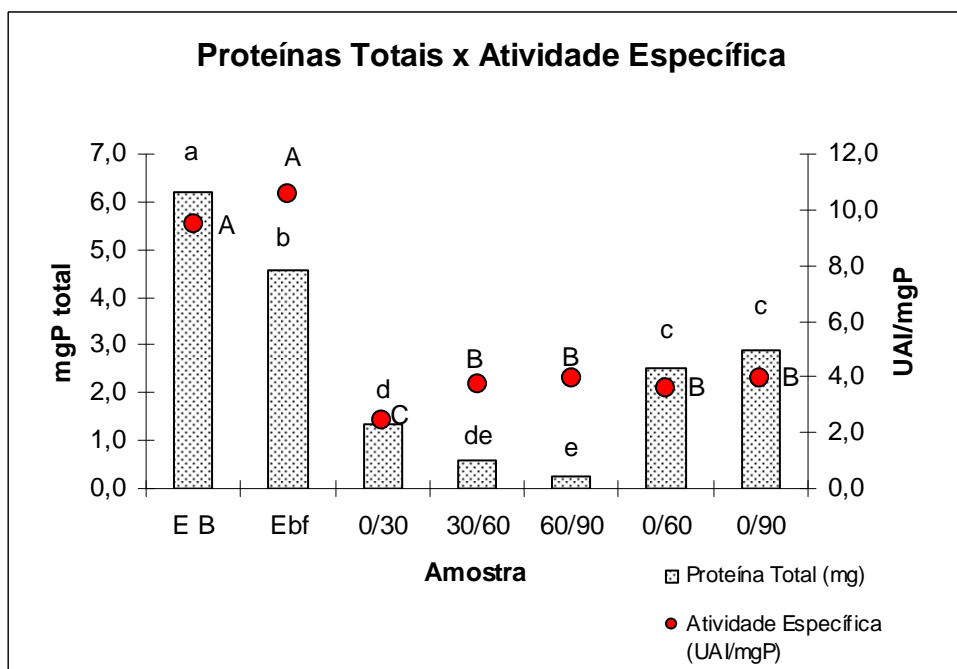


Figura 16 - Atividade inibitória de proteinases cisteínicas (esferas vermelhas) versus proteínas totais (barras verticais). A elevada atividade nos extratos totais, em comparação com as diferentes frações, pode indicar a possível presença de inibidores de proteinases cisteínicas de natureza não-protéica. As letras minúsculas referem-se à estatística (Teste de Tukey) utilizada na comparação de médias de proteínas totais e as letras maiúsculas referem-se à estatística utilizada na comparação de médias da atividade inibitória por miligrama de proteína, com nível de significância de 0,05 %.

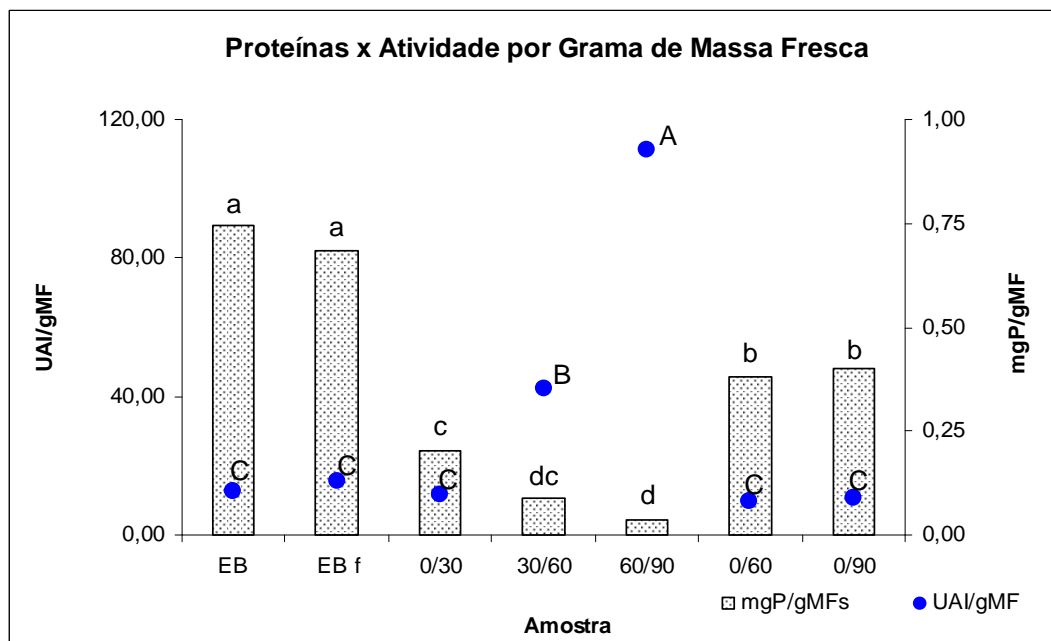


Figura 17 – Atividade inibitória de proteínases cisteínicas, expressa em função de 1 (um) grama de massa fresca de raiz (esferas azuis), versus proteínas, também expressas por grama de massa fresca (barras verticais). Notar que os maiores níveis de inibidores são concentrados nas frações F 30/60 e F 60/90. Este dado foi bastante importante na seleção destas duas frações para realização dos experimentos posteriores. As letras minúsculas referem-se à estatística (Teste de Tukey) utilizada na comparação de médias de proteínas totais e as letras maiúsculas referem-se à estatística utilizada na comparação de médias da atividade inibitória por grama de massa fresca, com nível de significância de 0,05 %.

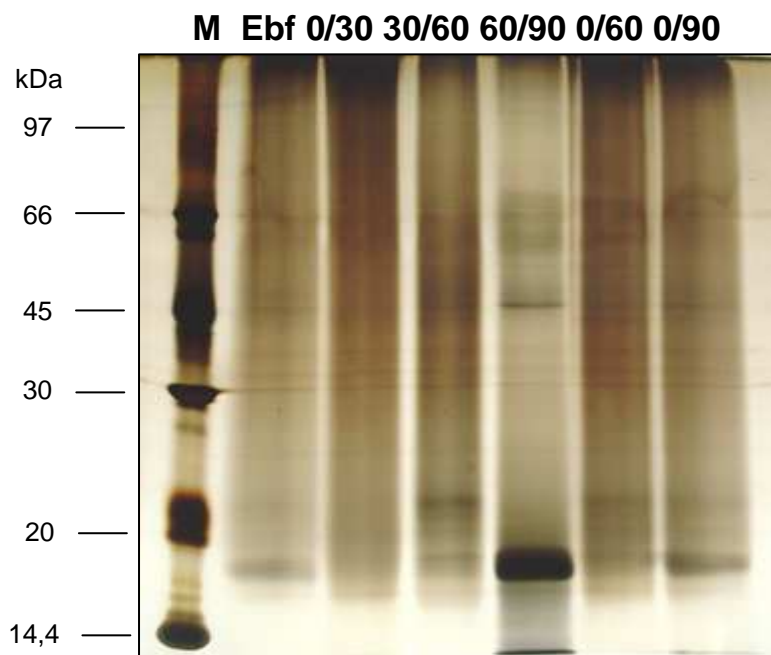


Figura 18 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %), na presença de SDS, das proteínas solúveis totais de raízes de feijão-de-corda, genótipo CE-31. M – Marcadores de massa molecular: Fosforilase b (97 KDa), albumina (66 KDa), ovoalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina (20 KDa) e α -lactoalbumina (14,4 KDa). Ebf: extrato bruto fervido, 0/30, 30/60, 60/90, 0/90 e 0/60 frações advindas da precipitação do extrato bruto fervido com sulfato de amônio. Aproximadamente, 3,97 μ g de proteína foram aplicados em cada poço. As proteínas foram reveladas por impregnação do gel com nitrato de prata.

6.3 - Passos Cromatográficos

Como mencionado no subitem 5.2.2, vários passos cromatográficos foram abordados envolvendo tanto a fração F 30/60 como F 60/90. Inicialmente, coluna de afinidade, método bastante comum na purificação de proteínas, em geral, onde papaína na sua forma carboximetilada estava acoplada à Sepharose 4B foi testada. Logo este método foi abandonado devido nossa suspeita de que a papaína acoplada estivesse degradando as amostras que eram aplicadas.

Isto ficou bastante evidenciado pelas eletroforeses que mostravam o “surgimento” de várias bandas antes ausentes no material que havia sido carregado.

Além disso, a atividade recuperada nos picos obtidos era muito baixa. A figura 19 mostra uma eletroforese em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, típica da aplicação da fração 60/90 em coluna de afinidade. É possível observar o perfil da amostra antes de ter sido passada na coluna e após eluição. A presença de inúmeras bandas, que supomos sejam produto de degradação, está evidenciada pelas pequenas setas pretas.

O exemplo da figura 19 é referente à fração F 60/90, mas o mesmo problema foi observado para a fração F 30/60, ou seja, tanto a questão da suposta degradação como a baixa atividade recuperada.

Outros passos cromatográficos (ver métodos), incluindo cromatografia de exclusão molecular, cromatografias de troca iônica em colunas acopladas a um sistema de cromatografia líquida de rápida performance (FPLC- Fast Performance Liquid Chromatography) foram então analisados.

Nenhum destes procedimentos, para ambas as frações, apresentou desempenho satisfatório (resultados não mostrados).

O passo cromatográfico que, aparentemente, trouxe o maior grau de purificação do material e permitiu significativa recuperação da atividade inibitória foi a cromatografia de interação hidrofóbica (Figura 20).

No entanto, esta técnica só foi testada com a fração F30/60 visto que, em termos de proteínas totais seria mais vantajoso trabalhar com esta fração do que com a fração F 60/90. Deste ponto em diante, todos os esforços para purificação do inibidor de proteinases de raízes de feijão-de-corda foram realizados com F 30/60.

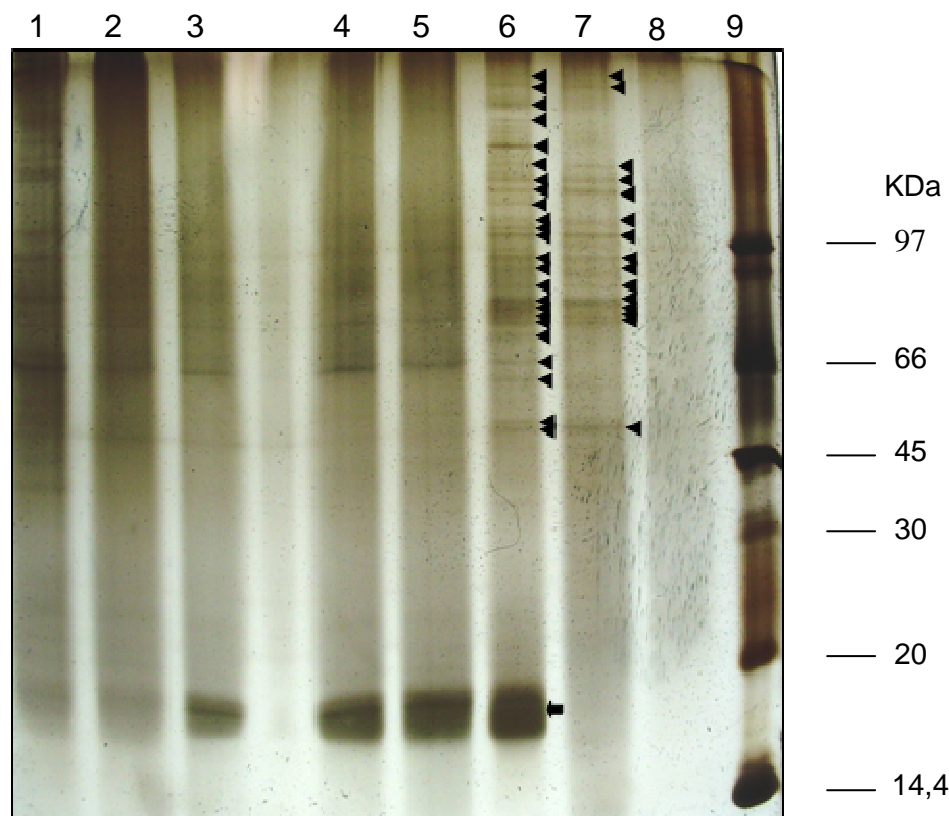


Figura 19 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %), na presença de SDS, evidenciando degradação aparente de proteínas após aplicação da fração F 60/90 em coluna de afinidade, Papaína-Sepharose. 1 - extrato bruto, 2 - extrato bruto fervido, 3 - F 60/90 repetição 1, 4 - F 60/90 repetição 2, 5 - F 60/90 repetição 3, 6 - pico não retido, 7 - pico retido (tubo de maior leitura, a 280 nm, com atividade), 8 - pico retido (segundo tubo de maior leitura, a 280 nm, com atividade) e 9 - marcadores de massa molecular: Fosforilase b (97 KDa), albumina (66 KDa), ovoalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina (20 KDa) e α -lactoalbumina (14,4 KDa). A seta mais inferior, raia 6, evidencia a presença de uma banda ou grupo de bandas na altura do marcador de 20 KDa que não interagem com a papaína. Cerca de 3,0 μ g de proteínas foram aplicados nos poços. As proteínas foram reveladas por impregnação do gel com nitrato de prata.

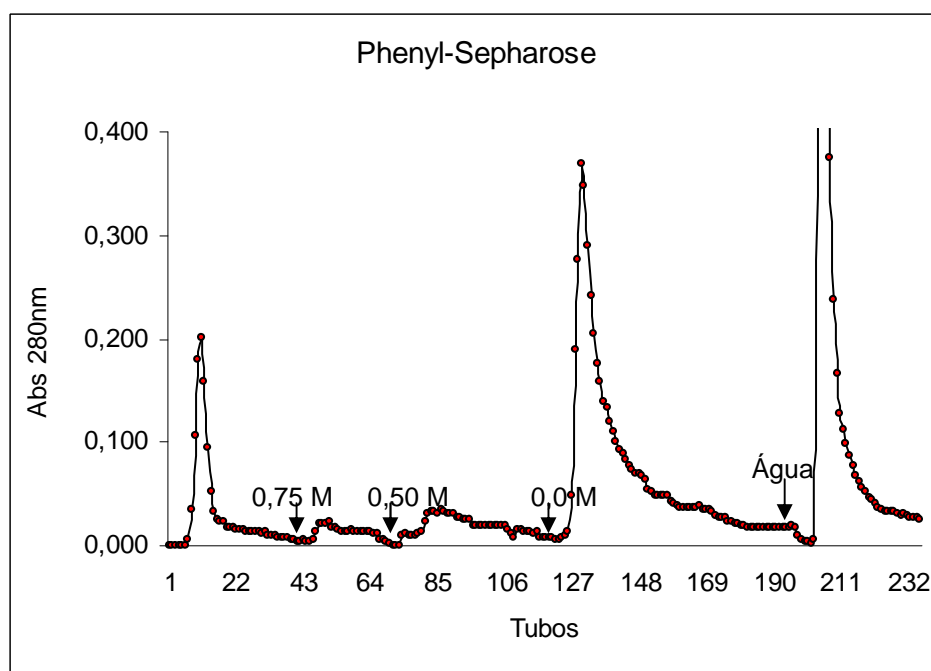


Figura 20 - Cromatograma típico de uma aplicação de F 30/60 em coluna de interação hidrofóbica, Phenyl-Sepharose. Aproximadamente, 5 mg de proteínas foram aplicadas na coluna. O pico 1 foi eluído por simples passagem do tampão de equilíbrio (fosfato de sódio 0,05 M pH 7,21 contendo sulfato de amônio 1,0 M). Os demais picos foram eluídos por meio da aplicação de concentrações decrescentes (ver setas no gráfico) de sulfato de amônio até aplicação de água. A água tem a capacidade de eluir as moléculas que apresentam maior caráter hidrofóbico. O fluxo utilizado foi de $1,0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ e o volume coletado, 3,0 mL por tubo.

A figura 21 mostra o perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, sob condições desnaturantes, dos diferentes picos obtidos da aplicação de F 30/60 em coluna de interação hidrofóbica, Phenyl-Sepharose. F 30/60 foi, previamente, dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, contendo sulfato de amônio 1,0 M, tampão de equilíbrio da coluna. Durante o processo cromatográfico, concentrações de sulfato de amônio decrescentes foram aplicadas para eluição das proteínas adsorvidas ao gel. As frações que detiveram maior atividade inibitória foram aquelas correspondentes aos picos eluídos com 1,0 e 0,75 M de sulfato de amônio (Figura 21). A figura 22 mostra o perfil eletroforético do pico eluído com 0,75 M de sulfato de amônio, agora, porém, em gel de poliacrilamida em concentração de 15 %.

Todos os picos obtidos da aplicação de F 30/60 na coluna de interação hidrofóbica apresentaram atividade inibitória contra papaína, o que nos leva a especular que haja diferentes isoformas de cistatinas na fração F 30/60, apesar de os experimentos necessários para comprovação de tal hipótese não terem sido executados. No entanto, a maior parte desta atividade esteve concentrada apenas nos picos 1 e 2, eluídos com 1,0 e 0,75 M de sulfato de amônio, respectivamente (Figura 23).

Como evidenciado na figura 21 os picos com maior atividade inibitória apresentaram distintos perfis eletroforéticos, mas o pico 2 pareceu, pelas análises eletroforéticas, estar mais livre de contaminantes que o pico 1. Tendo em vista seu elevado percentual de inibição da atividade papainásica, figura 23 B, e ainda, os perfis eletroforéticos, figuras 21 e 22, o pico eluído com 0,75 M de sulfato de amônio (pico 2) foi selecionado para os passos posteriores.

6.3.1 - Cromatografia de troca iônica

Após várias aplicações de F 30/60 na coluna de interação hidrofóbica e observação de que tanto o perfil cromatográfico, como a atividade inibitória e as eletroforeses se repetiam, o incremento de um passo cromatográfico posterior à cromatografia de interação hidrofóbica foi realizado.

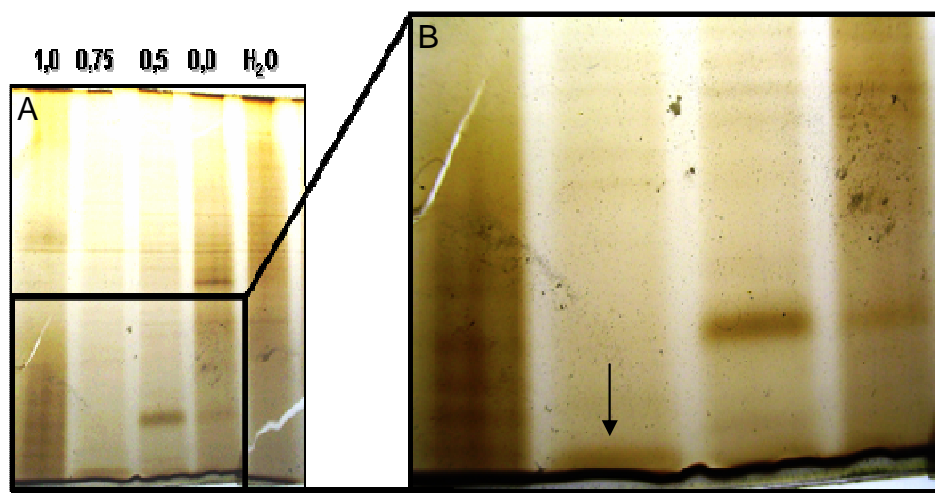


Figura 21 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5 %), na presença de SDS, evidenciando o perfil de bandas protéicas correspondentes aos picos eluídos da coluna de interação hidrofóbica, Phenil-Sepharose. O pico eluído com 0,75 M de sulfato de amônio (segunda raia da esquerda para a direita) figura A, chamou a atenção pela presença de uma banda bastante proeminente destacada na figura B, seta. Aproximadamente, 1,0 µg de proteína foi aplicado em cada poço. As proteínas foram reveladas por impregnação do gel com nitrato de prata.

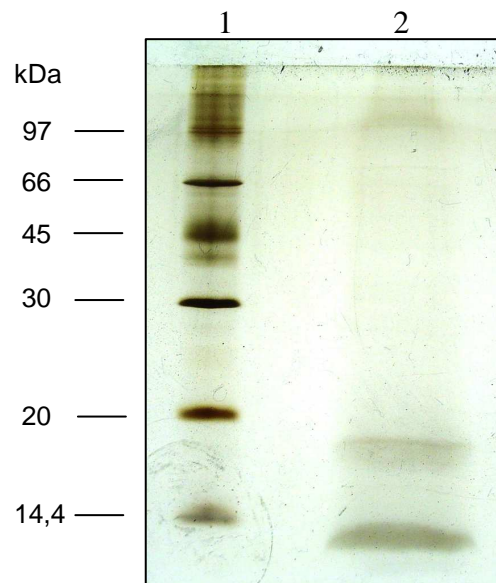


Figura 22 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (15,0 %), na presença de SDS, do Pico 2, eluído da coluna de interação hidrofóbica, Phenyl sepharose, com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, contendo sulfato de amônio, 0,75 M. Raia 1, marcadores de massa molecular: Fosforilase b (97 KDa), albumina (66 KDa), ovoalbumina (45 KDa), anidrase carbônica (30 KDa), inibidor de tripsina (20 KDa) e α -lactoalbumina (14,4 KDa) , raia 2, pico 2 (F 30/60 eluída com 0,75 M de sulfato de amônio). Cerca de 0,5 μ g de proteína foi aplicado no gel. As proteínas foram reveladas por impregnação do gel com nitrato de prata.

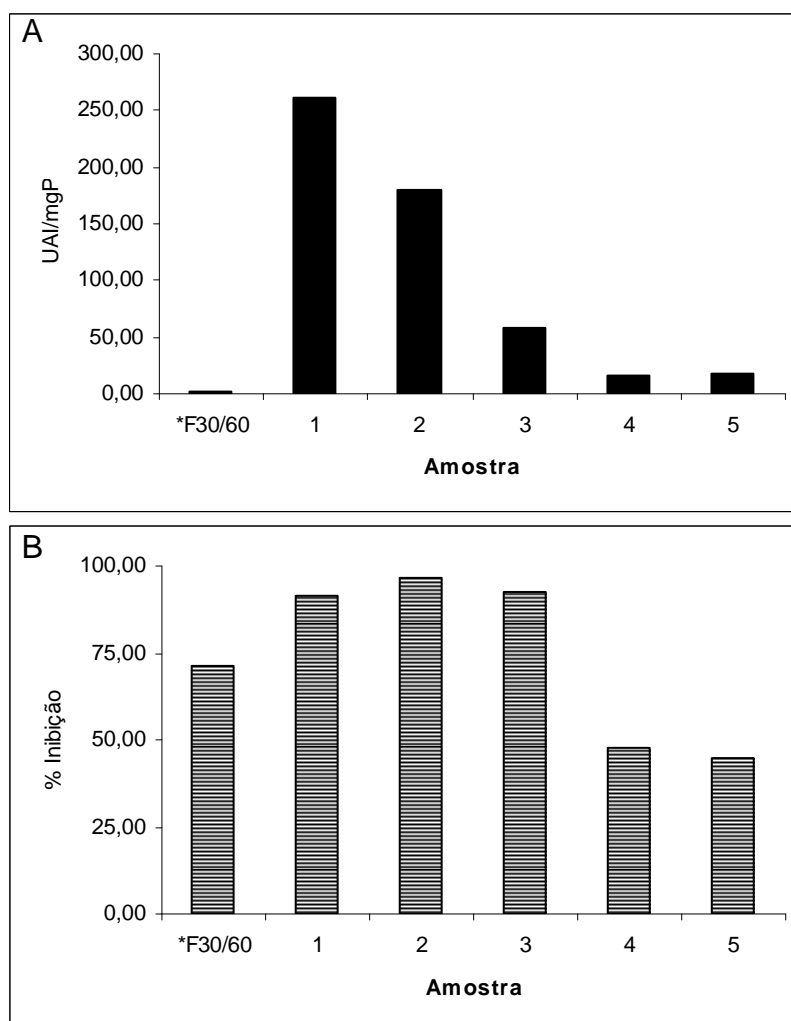


Figura 23 – Atividade Inibitória de proteinases cisteínicas de picos provenientes da aplicação de F 30/60 em coluna de interação hidrofóbica, Phenyl-Sepharose. A- Atividade específica dos picos eluídos da coluna de interação hidrofóbica. B- Atividade inibitória de proteinases cisteínicas representada pelo percentual de inibição da atividade papainásica. A eluição foi realizada por aplicação de concentrações decrescentes de sulfato de amônio. Os números 1, 2, 3, 4 e 5 representam os picos eluídos com 1,0; 0,75; 0,5; 0,0 M de sulfato de amônio e Água Grau Milli-Q, respectivamente. *F30/60, corresponde à fração aplicada na coluna. Notar o elevado aumento obtido na atividade específica dos picos 1 e 2; 107,57 e 70,05 vezes, respectivamente, quando comparados com a fração F 30/60.

A coluna utilizada foi a coluna de troca aniônica Resource Q (GE-Healthcare (1,0 mL)) a qual foi acoplada a um sistema FPLC.

Gradiente descontínuo de NaCl variando de 0,0 a 1,0 M foi aplicado. A amostra aplicada na coluna foi o pico 2, proveniente da coluna de interação hidrofóbica, Phenyl-Sepharose. Apenas dois picos detiveram atividade inibitória, o pico não retido, que apresentou 43,7 % de inibição da papaína e o pico eluído com, aproximadamente, 0,1 M de NaCl, que concentrou a maior parte desta atividade, causando 93,3 % de inibição (Figura 24).

O próximo passo foi a análise eletroforética de alguns dos picos obtidos nesta coluna. A eletroforese, porém, revelou a presença de várias bandas, antes ausentes no material proveniente da Phenyl-Sepharose (Pico 2 eluído com 0,75 M de sulfato de amônio). Algo semelhante ao que acontecia com a coluna de afinidade. Isso levou-nos a especular sobre a possível presença de proteases endógenas que resistiam à fervura inicial aplicada ao extrato bruto e, possivelmente, estariam degradando as proteínas durante os processos cromatográficos.

Diante deste fato, a fração F 30/60 foi fervida (96 ± 2 °C) por 0, 15, 30, 60 e 120 minutos, e, posteriormente, testada, *in gel* (zimogramas), quanto à presença de proteases endógenas. A determinação da atividade inibitória de proteinases cisteínicas, após os diferentes tempos de fervura, também foi realizada, a fim de que um tempo de fervura que não interferisse, consideravelmente, nesta atividade fosse estabelecido.

Os zimogramas, além de confirmarem a presença das proteases endógenas, mostraram que, 15 minutos de fervura, já foram suficientes para eliminação destas (Figura 25). Além disso, como mostrado pela figura 26, que evidencia as curvas de inibição da papaína, o período de 15 minutos foi o que menos interferiu com a atividade dos inibidores, sendo, portanto, estabelecido como tempo de fervura da fração F 30/60.

6.3.2 - Cromatografia de Fase Reversa

A última estratégia cromatográfica utilizada na tentativa de purificação das cistatinas de raízes de feijão-de-corda foi a cromatografia de fase reversa em coluna

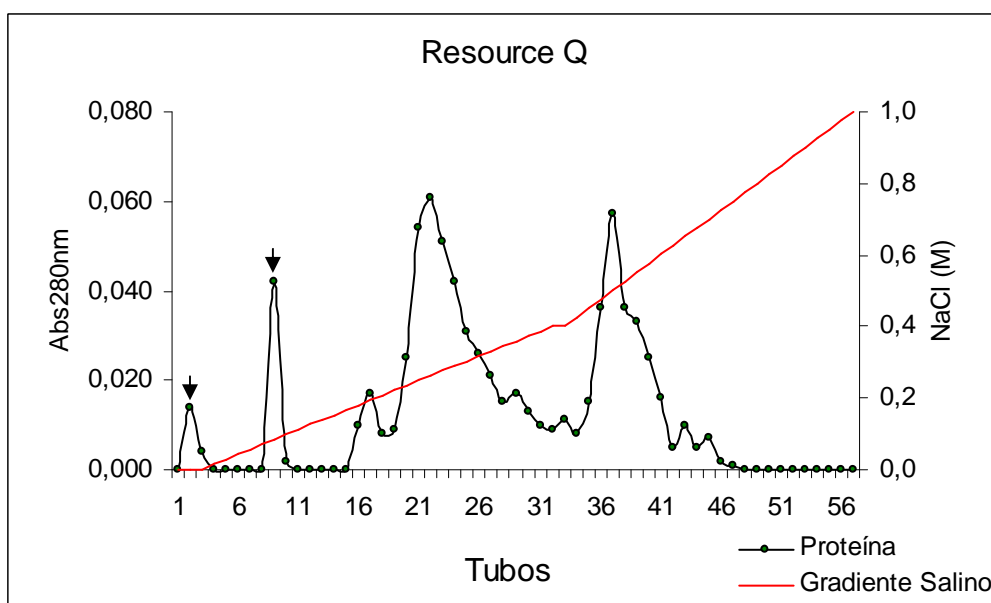


Figura 24 - Cromatograma típico da aplicação do pico eluído com 0,75 M de sulfato de amônio, da coluna de interação hidrofóbica, Phenyl-Sepharose, na coluna de troca aniônica Resource Q. Gradiente salino descontínuo (linha vermelha), variando de 0,0 a 1,0 M de NaCl foi aplicado. As setas mostram os picos que detiveram atividade inibitória, pico 1 – não retido, eluído por simples lavagem da coluna com tampão de equilíbrio, que inibiu em 43,7 % a atividade papainásica e pico 2 – eluído com tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21, contendo NaCl 0,1 M, que causou um percentual de inibição da papaína de 93,3 %. Os demais picos não apresentaram atividade inibitória.

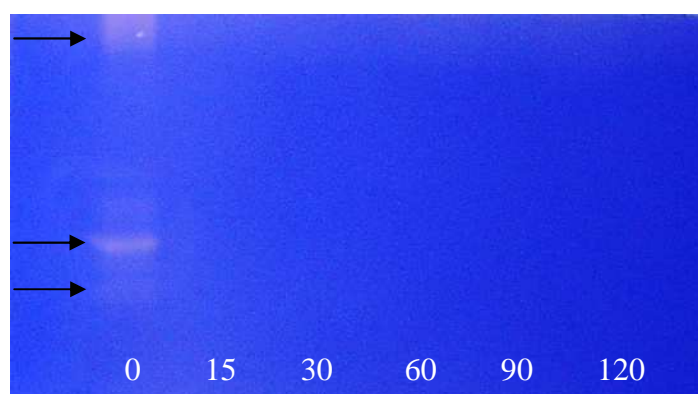


Figura 25 – Zimograma em gel de poliacrilamida (10,0 %), na presença de SDS, contendo gelatina. 0, F 30/60 não fervida; 15, 30, 60 e 120 representam F 30/60 fervida por 15, 30, 60 e 120 minutos, respectivamente. As setas indicam a altura aparente de algumas proteases, evidenciadas pela degradação da gelatina.

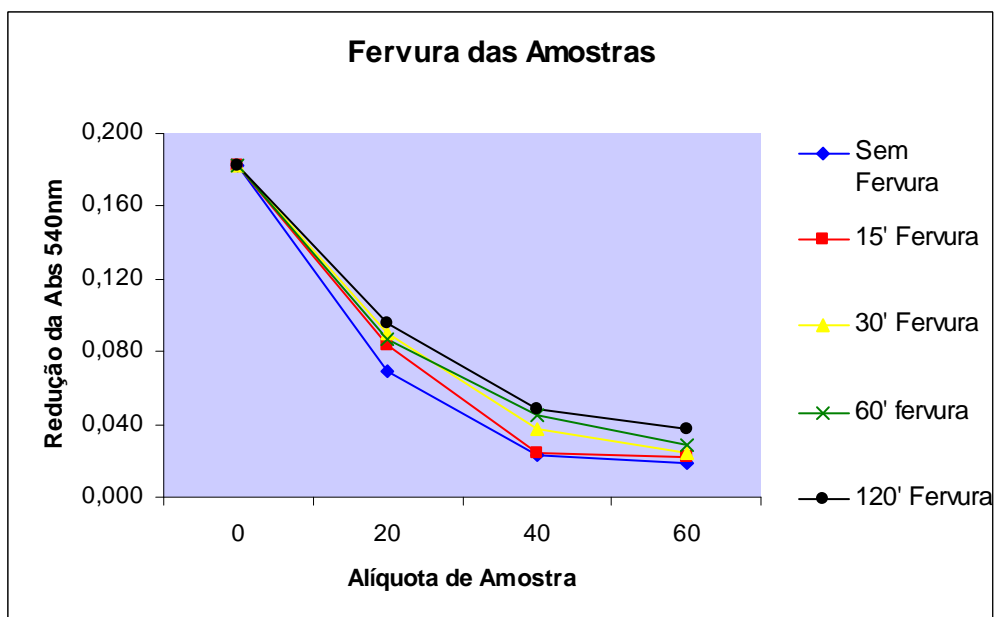


Figura 26 - Avaliação da atividade inibitória de proteinases cisteínicas após a fração F 30/60 ter sido submetida a diferentes tratamentos térmicos. As curvas de inibição foram construídas com base em quatro alíquotas (0, 20, 40 e 60 μ L) contendo as mesmas quantidades de proteína para os diferentes tratamentos térmicos.

de fase reversa C2C18 acoplada a um sistema HPLC. A figura 27 mostra o cromatograma típico da aplicação de F 30/60 na coluna de fase reversa.

Os picos que apresentaram maior atividade inibitória de proteinases cisteínicas foram aqueles eluídos com 48,0 e 60,0 % de acetonitrila (60 % e 75 % de Solução B – Solução consistindo de Acetonitrila, 80%, TFA, 0,09% e Água Grau Milli-Q, respectivamente).

O perfil eletroforético destes picos, porém, não é aqui evidenciado visto que as várias tentativas de revelação não resultaram numa boa visualização das bandas protéicas.

No entanto, a pureza de um dos picos, o pico eluído com 60 % de acetonitrila (de agora em diante denominado apenas de PIIHPLC) foi avaliada por aplicação deste em coluna de troca aniônica, coluna Resource-Q, o que resultou em cinco outros picos quando NaCl, nas concentrações de: 0,2, 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 M foi aplicado (resultado não mostrado). O que sugere a possível presença de contaminantes, ou isoformas inibidores.

O pico eluído com 48 % de acetonitrila (PIHPLC) foi caracterizado apenas quanto à atividade inibitória de proteinases cisteínicas e nos ensaios biológicos.

Tendo em vista que os experimentos até aqui descritos, como, plantio de feijão-de-corda, coleta de raízes, extração de proteínas, fracionamento com sulfato de amônio e aplicação das frações em colunas cromatográficas específicas, não foram capazes de nos permitir a utilização do inibidor purificado, nos bioensaios, estes foram então realizados com frações ricas em atividade inibitória de proteinases cisteínicas.

Estas frações consistiram dos extratos brutos não fervidos e submetidos à fervura, fração F 30/60 fervida e não fervida e, finalmente, PIHPLC e PIIHPLC. A avaliação da atividade destas frações, obtidas durante os procedimentos de purificação, sobre juvenis infectantes de *M. javanica* raça 1, com relação a seu potencial nematostático e/ou nematicida, foi realizada durante os bioensaios e é discutida no próximo item, 6.4.

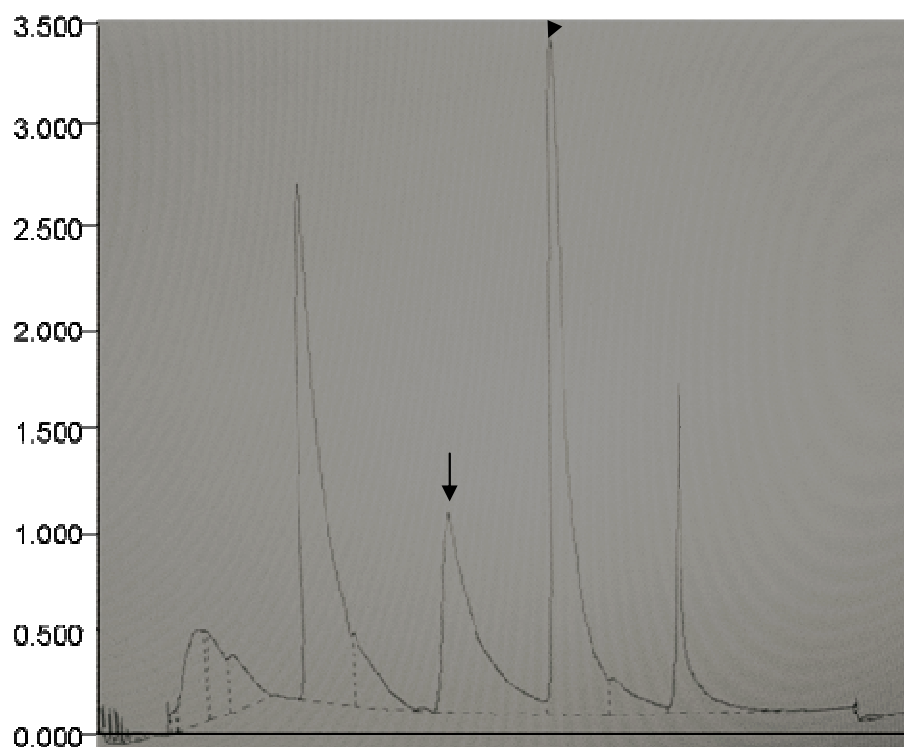


Figura 27 - Cromatograma típico da aplicação da fração F 30/60 fervida em coluna de fase reversa μ RPC C2/C18 ST 4.6/100 (GE-Healthcare, 1,6 mL) acoplada a um sistema HPLC (Waters®). A amostra foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 0,05 M, pH 7,21 e a eluição das proteínas realizada por aplicação de concentrações crescentes de acetonitrila (32,0; 41,6; 48,0; 60,0 e 80,0%). O fluxo utilizado foi de 0,5 mL por minuto e a coleta dos picos manualmente realizada. A maior parte da atividade inibitória se concentrou nos picos 3 e 4 - setas - (esquerda para a direita) eluídos com 48,0 e 60,0 % de acetonitrila, respectivamente. A leitura das absorbâncias foi realizada a 230 nm. Os demais picos ou não apresentaram atividade ou apresentaram em níveis muito baixos.

6.4 - Bioensaios

6.4.1 - Ensaio de Inibição de Mobilidade e Mortalidade

Neste experimento, diferentes alíquotas do extrato bruto normal, extrato bruto fervido, F 3060 normal, F 3060 fervida, PIHPLC e PIIHPLC foram utilizadas a fim de se avaliar o possível efeito destas amostras sobre -1) A mobilidade juvenis de segundo estágio de nematóides pertencentes à espécie *M. javanica* raça 1 e 2) Avaliação do possível efeito nematicida das amostras testadas.

Quanto ao parâmetro mobilidade, a máxima interferência obtida foi causada pela fração F 30/60 fervida, quando 40 µg de proteína foram incubados com os juvenis (Figura 28). No entanto, quando uma dose maior, 60 µg, desta mesma fração, foram incubados, ela mostrou-se letal, causando um percentual de mortalidade de cerca de 91,0 % (Figura 29). Em resumo, intensificação do efeito desta fração sobre os juvenis, quando a administração de uma dose maior da mesma era realizada, foi observada. Ou seja, até certo limiar, em torno de 40 µg, ela mostrou-se um bom agente nematostático e, já com 60 µg, mostrou forte ação nematicida. Interessante notar que esta mesma fração F 30/60, não fervida, apresentou tanto efeitos nematostáticos, como nematicidas, reduzidos, quando comparada à F 30/60 fervida, em todas as doses aplicadas (Figuras 28 e 29).

Um importante dado extraído destes experimentos, que nos permite sugerir que os inibidores de proteinases cisteínicas presentes nos materiais avaliados sejam as moléculas responsáveis pelos efeitos observados, é a correlação que existe entre o aumento observado na taxa de mortalidade, à medida que a purificação deste ou destes inibidores progride, até chegar aos picos do HPLC.

A figura 30 mostra a atividade inibitória de proteinases cisteínicas, presente nas frações F 30/60 não fervida e fervida, até PIHPLC e PIIHPLC. Esta atividade está expressa em termos de atividade específica, uma vez que é mais adequada à demonstração da concentração (pureza) dos inibidores, com relação às demais proteínas presentes nos materiais avaliados.

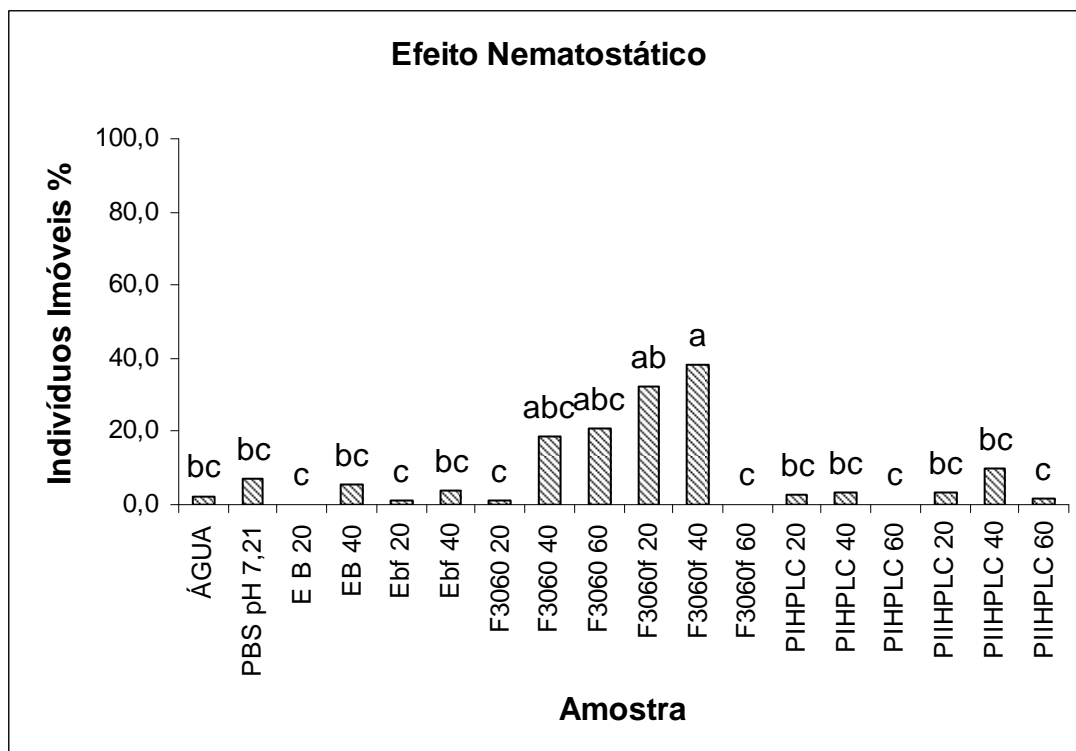


Figura 28 - Efeito nematostático de diferentes amostras (extrato bruto não fervido e fervido, F 30/60 não fervida e fervida, PIHPLC e PIIHPLC) sobre juvenis de segundo estágio de nematóides da espécie *M. javanica*, raça 1. Análise realizada 24 h após incubação das diferentes frações com os juvenis (As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05).

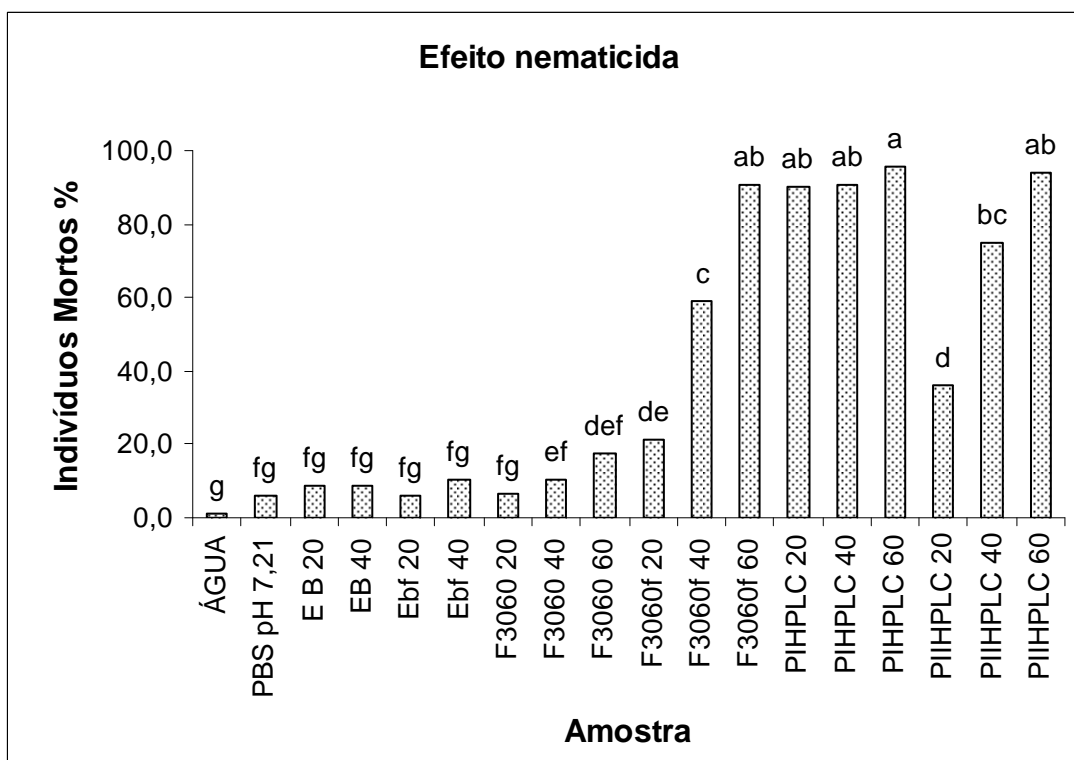


Figura 29 - Efeito nematicida de diferentes amostras (extrato bruto não fervido e fervido, F 30/60 não fervida e fervida, PIHPLC e PIIHPLC) sobre juvenis de segundo estágio de nematóides da espécie *M. javanica*, raça 1. Análise realizada 24 h após incubação das diferentes frações com os juvenis. (As análises estatísticas foram realizadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 0,05).

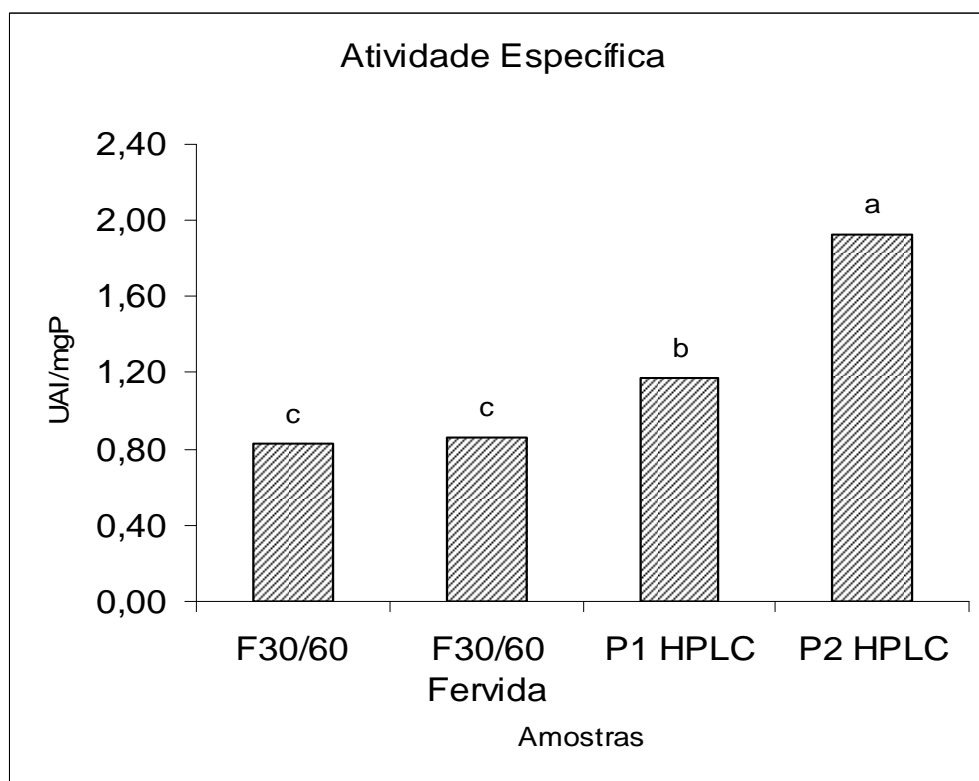


Figura 30 - Atividade inibitória de proteinases cisteínicas da fração F 30/60 não fervida, F 30/60 fervida, pico 1 do HPLC (PIHPLC) e pico 2 do HPLC (PIIHPLC). A atividade está expressa em termos de atividade específica, que denota o grau relativo de pureza das amostras.

Aparentemente, a amostra PIHPLC é a mais potente, visto que na dose de 20 µg de proteína ela já é capaz de causar 90 % de mortalidade dos juvenis.

A amostra PIIHPLC parece ser menos potente que a PIHPLC, mas na dose mais elevada, 60 µg de proteína, ela foi capaz de matar na mesma proporção que PIHPLC. Interessante notar que, apesar de F 30/60 fervida, na dose de 60 µg ter matado na mesma proporção que PIIHPLC nesta mesma dose, com 40 µg ela, F 30/60, já não foi tão potente, matando cerca de 59,1 % dos juvenis, enquanto que PIIHPLC, nesta mesma dose, foi capaz de matar 75,1 % dos juvenis (Figura 29). Como já citado, juntos, estes dados corroboram para a atribuição dos efeitos observados aos inibidores de proteinases cisteínicas.

6.4.2 - Avaliação Microscópica da Interação de uma Fração Específica com a Estrutura Interna e Externa de J2 de *M. javanica*, raça 1

Uma vez observados efeitos nematostáticos e nematicidas das frações e picos cromatográficos oriundos de extratos de raízes de Feijão-de-corda, surgiu a curiosidade de se avaliar como se dava a interação entre estas proteínas e juvenis infectantes de *M. javanica* raça 1.

Para tanto, experimentos envolvendo o acoplamento de um composto fluorescente (FITC) às proteínas e posteriormente incubação destas com os juvenis para avaliações microscópicas foram realizados.

Neste caso, porém, a utilização dos picos provenientes do HPLC não foi possível, dados seus baixíssimos rendimentos. Desta forma, apenas a fração F 30/60 fervida foi testada.

Os tempos de análises foram de 6 e 24 horas após incubação, uma vez que o efeito de mortalidade, nas condições experimentais utilizadas, foi bem observado com 24 horas de incubação.

A figura 31 mostra fotos representativas das observações microscópicas com 6 e 24 horas de incubação. O aumento utilizado foi de 200 vezes e os nematóides foram fotografados sob fluorescência.

Os controles não emitiram fluorescência (resultado não mostrado). Neste experimento foi possível observar que as proteínas são, de alguma forma, internalizadas pelos juvenis, o que é evidenciado pela emissão de fluorescência no

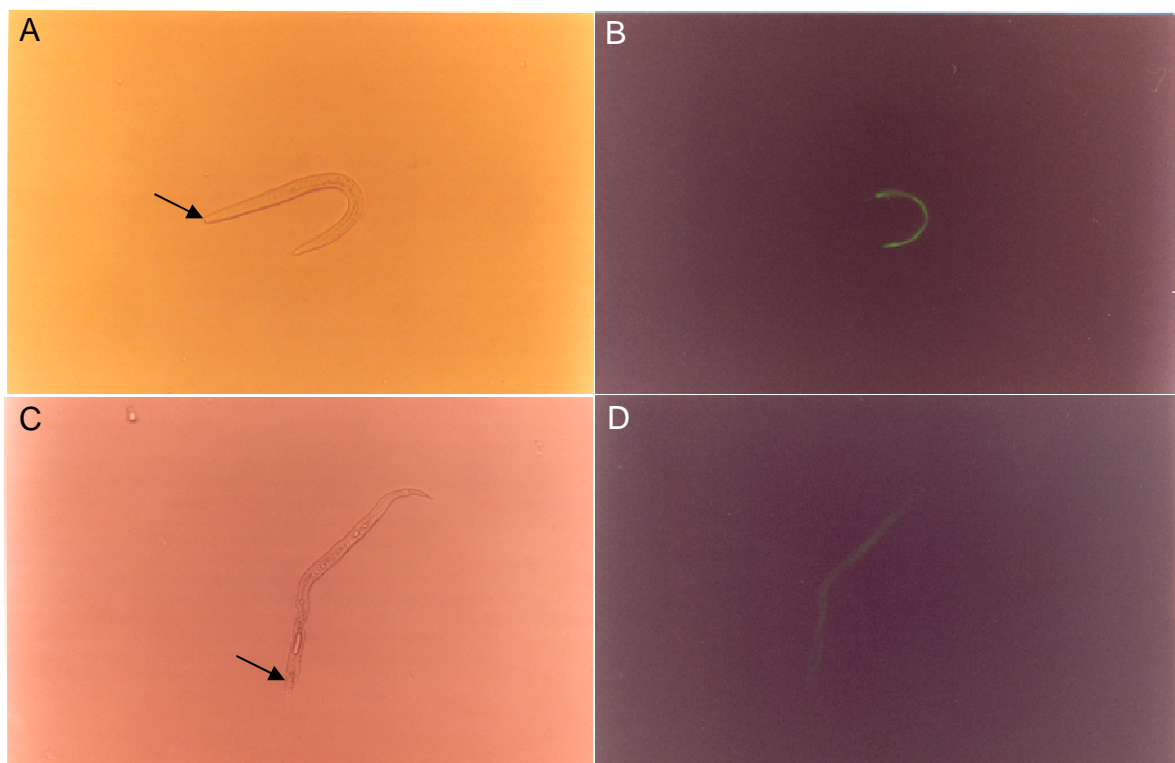


Figura 31 - Visualização, por fluorescência, da interação entre as proteínas presentes na fração F 30/60 fervida e estruturas presentes no trato digestório de juvenis de segundo estágio de *M. javanica* raça 1. A- Nematóide observado após 6 horas de incubação com F 30/60 fervida. B- Mesmo nematóide, agora visto através da emissão de fluorescência. C- Nematóide observado 24 horas após incubação com F 30/60 fervida. D- Mesmo indivíduo sendo observado por meio da emissão de fluorescência. As setas indicam as extremidades anteriores dos juvenis.

seu trato digestório. No entanto, aparentemente, com o passar das 24 horas de incubação, estas proteínas parecem se difundir por todo o corpo do animal, o que justificaria a presença de fluorescência no juvenil como um todo. Pelo menos nos aumentos utilizados (até 1000 x), a visualização de fluorescência na superfície do nematóide não foi detectada.

7.0 Discussão

Em seu trabalho, ANDRADE (2003), mostrou que plantas de feijão-de-corda, genótipo CE 31, quando desafiadas com o nematóide das galhas, *M. incognita*, apresentavam, ao longo do tempo, aumento significativo nos níveis de várias proteínas relacionadas à defesa, dentre as quais, estavam os inibidores de proteinases cisteínicas. Além disso, esse aumento parecia se correlacionar com o fato deste genótipo de feijão ter se mostrado resistente ao nematóide.

Vários trabalhos têm relatado a ação dos inibidores de proteases, especialmente inibidores de proteinases serínicas (serpinas) e cisteínicas (cistatinas), na defesa das plantas contra nematóides, insetos, fungos e, até mesmo, alguns vírus (AOKI *et al.*, 1995; GUTIERREZ-CAMPOS *et al.*, 1999; WALKER *et al.*, 1999; PERNAS *et al.*, 1999; LAWRENCE e KOUNDAL, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2002; KIGGUNDU *et al.*, 2003; SAMACK e SMIGOCKI, 2003; LILLEY *et al.*, 2004; WEN *et al.*, 2004; MOSOLOV e VALUEVA, 2005; AGUIAR *et al.*, 2006; HABIB e FAZILI, 2007).

Desta forma, este trabalho teve o objetivo de estabelecer um protocolo de extração de inibidores de proteinases cisteínicas de raízes de feijão-de-corda, genótipo CE-31, bem como a obtenção de frações enriquecidas destes inibidores e avaliação de sua atividade sobre a mobilidade de nematóides pertencentes à espécie *M. javanica*, além do possível efeito nematicida destas frações. Em adição, análises microscópicas a fim de identificar os possíveis locais de interação destas proteínas com os J2 de *M. javanica*, raça1, foram realizadas.

Assim, técnicas de purificação de proteínas envolvendo a extração, fracionamento com sulfato de amônio e aplicação das frações ativas em colunas cromatográficas específicas foram, inicialmente, utilizadas.

A purificação de proteínas de diversas naturezas, incluindo os inibidores de proteases, para posterior avaliação de possíveis atividades biológicas, seja sobre fitopatógenos ou insetos-praga, seja sobre células cancerígenas ou situações correlacionadas é um fato bastante comum na literatura corrente. Isso se deve principalmente à necessidade de que soluções alternativas no controle de pragas (no caso das plantas) e/ou no estudo do câncer, por exemplo, além de outros

problemas biológicos sejam descobertas ou desenvolvidas e, posteriormente, utilizadas (KENNED, 1998; WEN *et al.*, 2005).

Um dos primeiros passos envolvidos na purificação dos inibidores de proteinases cisteínicas de raízes de feijão-de-corda consistiu no aquecimento prévio dos extratos totais. A forte estabilidade térmica demonstrada pelos inibidores estudados no presente trabalho, suportando fervura, 96 ± 2 °C, por período de 15 minutos com apenas leve perda de atividade inibitória, não é um achado novo, pois esta é uma propriedade já bastante conhecida dos inibidores de proteases, em especial aqueles que apresentam várias pontes dissulfeto (S-S). As pontes S-S dão maior rigidez à estrutura tridimensional da proteína, permitindo estabilização da mesma quando da elevação da temperatura do meio. Um exemplo bem conhecido deste fato é o dos inibidores de dupla-cabeça, tipo Bowman-Birk, (MOSOLOV e VALUEVA, 2005; HABIBI e FAZILI, 2007). Baseados nesta propriedade de termo estabilidade, muitos outros trabalhos relacionados à purificação de inibidores utilizam também o processo de aquecimento, tanto como forma de eliminar a interferência das proteases endógenas nas determinações dos níveis de inibidores, como no enriquecimento das frações contendo os mesmos, (BRZIN *et al.*, 1998; SANTINO *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

No entanto, para as fitocistatinas, a presença de pontes S-S não explicaria tal estabilidade térmica, visto que, uma das propriedades clássicas do grupo, é a ausência de cisteína livre, o que impossibilitaria a formação das pontes S-S (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Desta forma, outras razões estruturais podem estar envolvidas nesta termo estabilidade.

Alguns trabalhos têm apontado a presença de muitos aminoácidos carregados na superfície da proteína, como uma possível explicação para tal estabilidade. A presença desta superfície muito carregada poderia possibilitar o estabelecimento de fortes interações do tipo, aminoácido – aminoácido, bem como, interações entre aminoácidos e moléculas de água, particularmente interações do tipo dipolo. Desta forma, este mecanismo poderia compensar o movimento termal e conseqüente desarranjo estrutural ocasionado pelas altas temperaturas (SZILÁGYI e ZÁVODSZKY, 2000; TANAKA *et al.*, 2004). Além destes fatores outros trabalhos apontam para uma soma de um conjunto de propriedades físico-químicas, incluindo,

as já citadas, como a principal explicação para a estabilidade térmica apresentada por certas proteínas (TRIVEDI, *et al.*, 2006). Contudo, é importante destacar que estes estudos são mais gerais e foram realizados com proteínas presentes em organismos termofílicos, principalmente, bactérias.

Apesar de a purificação de um inibidor de proteinases cisteínicas não ter sido efetivamente concluída neste trabalho, os ensaios com nematóides apontam para uma ação deletéria destas proteínas contra nematóides da espécie *M. javanica*. É lógico, contudo, que os experimentos realizados não nos dão suporte suficiente para que um mecanismo de ação completo seja proposto. Na verdade, o que se tem é um quadro geral onde frações protéicas ricas em inibidores de proteinases cisteínicas oriundas de extratos totais de raízes de feijão-de-corda são capazes de afetar negativamente a sobrevivência de nematóides da espécie *M. javanica*.

Filtrados de diferentes espécies de fungos, algumas nematófugas, quando avaliados quanto a seu potencial em afetar parâmetros como mobilidade, eclosão e causar mortalidade de juvenis de *M. incognita*, mostraram alguns efeitos semelhantes e outros diferentes dos aqui descritos. Com relação à mobilidade, por exemplo, os filtrados fúngicos mais potentes foram capazes de causar percentual máximo, acima de 90 %, de J2 imóveis em pouco mais de uma hora. No nosso caso, porém, esta análise foi realizada apenas 24 h após incubação e os maiores efeitos observados foram de, aproximadamente, 40 %. Contudo, quanto ao percentual de mortalidade, os filtrados fúngicos mais potentes causaram máximo percentual de mortalidade, acima de 90 %, após 36 h de incubação. É importante ressaltar que neste mesmo trabalho, alguns filtrados fúngicos só foram capazes de causar o máximo de mortalidade, apenas 13 dias após incubação das amostras com os juvenis (COSTA *et al.*, 2001). No nosso caso, as análises foram realizadas 24 h após incubação e, neste período de tempo, 90 % de mortalidade foi obtida com o PIHPLC, já na menor dose utilizada na incubação com os J2, 20 µg de proteína. Efeito semelhante foi observado para PIIHPLC e F 30/60 fervida, neste mesmo tempo, porém, em doses mais elevadas, 40 e 60 µg de proteínas, em ambos os casos.

Comparando com nossos dados, estes valores mostram que as frações ricas em cistatinas oriundas de raízes de feijão-de-corda parecem ser mais potentes,

quanto ao efeito nematicida, que os filtrados fúngicos testados e menos potentes, com relação ao efeito nematostático. No entanto, comparação mais profunda destes dados não pode ser feita, visto que no trabalho com filtrados fúngicos, nenhuma correlação entre possíveis proteínas, presentes nestes filtrados, e os efeitos observados é sugerida. Fato que também torna difícil que alguma comparação, quanto à concentração das substâncias aplicadas e os efeitos nematicidas e nematostáticos observados, seja realizada. Além disso, como já citado, as análises foram realizadas em tempos diferentes.

Trabalho semelhante, agora analisando a ação de extratos totais aquosos de 15 espécies de plantas do gênero *Crotalaria* também foi realizado (JOURAND *et al.*, 2004). Neste trabalho a avaliação dos possíveis efeitos sobre a mobilidade e mortalidade de nematóides foi feita com extratos aquosos totais de raízes e partes aéreas das diferentes espécies de *Crotalaria*. Apesar de nenhuma caracterização bioquímica das amostras ter sido realizada os autores comentam, neste trabalho, a possibilidade de que alcalóides e outros componentes de baixa massa molecular tenham sido os principais responsáveis pelas atividades nematicidas e nematostáticas diferentemente observadas (JOURAND *et al.*, 2004).

No nosso caso, a possibilidade de que tais moléculas e não os inibidores sejam os principais responsáveis pelas atividades observadas é, em parte, refutada, visto que vários processamentos dos extratos brutos, incluindo fervuras, centrifugações, diálises em tubos para diálise de 12 KDa, precipitação com sulfato de amônio e cromatografia de fase reversa foram realizados. Em teoria, estes componentes de baixa massa molecular dificilmente estariam presentes nas frações testadas.

Estas evidências reforçam consideravelmente a sugestão da participação efetiva dos inibidores de proteinases cisteínicas nos efeitos observados. Além do que já foi mencionado, outro importante fato que corrobora com esta hipótese, foi o achado de que justamente as frações mais concentradas em inibidores foram as que apresentaram efeitos mais deletérios sobre os nematóides. Entretanto, como já bastante enfatizado, os experimentos realizados não nos permitem afirmar se os efeitos observados sobre os nematóides sejam devidos à atividade inibitória de proteinases cisteínicas *per si*, fato já descrito na literatura. Esta é uma questão que

levanta mais discussões.

Trabalho utilizando uma fitocistatina recombinante de cevada mostrou que os efeitos deletérios sobre o crescimento micelial do fungo fitopatogênico *Botrytis cinerea*, não eram correlacionados a atividade inibitória de proteinases cisteínicas. Mesmo quando os aminoácidos essenciais para a total funcionalidade do sítio ativo contra a papaína foram alterados, inativando quimicamente o inibidor, a atividade antifúngica foi mantida. Quando, porém, determinados aminoácidos, não relacionados com a atividade anti-papainásica foram modificados, sendo conservada a atividade inibitória, os efeitos como proteína antifúngica foram perdidos. O que evidenciou plenamente que a atividade biológica observada não estava ligada à atividade inibitória de proteinases cisteínicas da molécula (MARTÍNEZ *et al.*, 2003).

Não se pode descartar a possibilidade de que fato semelhante tenha ocorrido no presente trabalho. Entretanto, mesmo que tenha ocorrido, tal fato não diminui, em nenhum aspecto, a relevância da participação dos inibidores de proteinases cisteínicas de raízes de feijão-de-corda, no mecanismo de defesa da planta. Caso fosse demonstrado que a atividade nematicida observada neste trabalho estivesse correlacionada a outro motivo, ou domínio da proteína, que não aquele diretamente envolvido com inibição de proteases, esta seria uma excitante descoberta e, talvez, esta característica pudesse, até mesmo, conferir, aos inibidores em estudo, ampliação de seu espectro de ação sobre diferentes patógenos e pragas de plantas.

As análises microscópicas, decorridas 6 h de incubação entre as proteínas presentes na fração F 30/60, previamente submetidas à conjugação com FITC, e os juvenis de segundo estágio de *Meloidogyne javanica*, revelaram que estas proteínas foram, de alguma forma, internalizadas pelos juvenis e, aparentemente, se ligaram especificamente ao intestino dos vermes (Figura 21), região posterior do corpo. A interação das proteínas com a superfície do nematóide, nas magnitudes utilizadas, não foi observada.

Isso nos leva a sugerir que o mecanismo de ação destas proteínas se dê, pelo menos em parte, por meio de alterações fisiológicas provocadas quando da sua interação com estruturas internas dos J2.

8.0 Conclusão

Os dados acumulados no presente trabalho sugerem a participação efetiva dos inibidores de proteinases cisteínicas de raízes de feijão-de-corda nos efeitos observados, atividade nematostática e nematicida, sobre o nematóide *Meloidogyne javanica*. Além disso, estes resultados nos levam a eleger estas biomoléculas como candidatas, em potencial, ao desenvolvimento de estratégias alternativas no controle de pragas vegetais, particularmente, com relação a esta espécie de nematóide.

9.0 - Referências Bibliográficas

ABAD, P., FAVERY, B., ROSSO, M.N., CASTAGNONE-SERENO, P. Root-knot nematode parasitism and host response. **Molecular Plant Pathology**. v. 4 (4), p. 217-224, 2003.

ABE, M., ABE, K., KURODA, M., ARAI, S. Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. Molecular cloning and expression studies. **European Journal of Biochemistry**. v. 209, p. 933-937, 1992.

ABE, K., EMORI, Y., KONDO, H., SUSUKI, K., ARAI, S. Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (Oryzacystatin) Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 262 (35), p. 16793-16797, 1987.

AGUIAR, J., FRANCO, O.L., RIGDEN, D.J., BLOCH-JUNIOR, C., MONTEIRO, A.C.S., FLORES, V.M.Q., JACINTO, T., XAVIER-FILHO, J., OLIVEIRA, A.E.A., GROSSI-DE-SÁ, M.F., FERNANDES, K.V.S. Molecular modeling and inhibitory activity of cowpea cystatin against bean bruchid pests. **Proteins: Structure, Function and Bioinformatics**. v. 63, p. 662-670, 2006.

AKPINAR, O., A.N. HAEJUNG. Purification and determination of inhibitory activity of recombinant soyacystatin for surimi application. **Molecular Nutritional Food Research**. .v. 49, p. 247-255, 2005.

ANDRADE, N.C. Resistência do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) walp.] a *Meloidogyne incognita* (kofoid e White) Chitwood: Aspectos Anatômicos Bioquímicos e Moleculares. Tese de Doutorado em Bioquímica. **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC**, Fortaleza, 2003.

AOKI, H., AKAIKE, T., ABE, K., KURODA, M., ARAI, S., OKAMURA, R.I., NEGI, A., MAEDA, H. Antiviral effect of oryzacystatin, a proteinase inhibitor in rice, against herpes simplex virus type 1 *in vitro* and *in vivo*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, p. 846-849, 1995.

ARAI, S., MATSUMOTO, I., EMORI, Y., ABE, K. Plant seed cystatins and their target enzymes of endogenous and exogenous origin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 6612-6617, 2002.

ARAÚJO, J.P.P. e WATT, E.E. O caupi no Brasil. **IITA/EMBRAPA**. Brasilia-DF, p.722. 1988.

ATKINSON, H.J., JOHNSTON, K.A., ROBBINS, M. Prima facie evidence that a phytocystatin for transgenic plant resistance to nematodes is not a toxic risk in human diet. **Nutrient Interactions and Toxicity Research Communication**. v. , p. 431-434, 2004.

BAKER, B., ZAMBRISKI, P., STASKAWICZ, B., DINESH-KUMAR, S.P. Signaling in plant-Microbe interactions. **Science**. v. 276, p. 726-733, 1997.

BARRET, A.J. The cystatins: A new class of peptidase inhibitors. **Trends in Biochemistry Science**. v. 12, p. 193-196, 1987.

BEZAWADA, C., SAHA, S., JENKINS, J.N., CREECH, R.G., McCARTY, J.C. Breeding and genetics, ssr marker(s) associated with root-knot nematode resistance gene(s) in cotton. **The Journal of Cotton Science**. v. p. 179-184, 2003.

BLUM, H. et al. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BOLTER, C. J. Methyl jasmonates induces papain inhibitor(s) in tomato leaves. *In*: OLIVEIRA, A. S., XAVIER-FILHO, J., SALES, M. P. Cysteine Proteinases and Cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 91-104, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRITO, L.O., LÓPES, A.R., PARRA, J.R.P., TERRA, W.R., SILVA-FILHO, M.C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**. v. 128, p. 365-375, 2001.

BRZIN, J., POPOVIC, T., RITONJA, A., PUIZDAR, V., KIDRIC, M. Related cystatin inhibitors from leaf and from seed *Phaeolus vulgaris* L. **Plant Science**, v. 138, p. 17-26, 1998.

BUCHANAN, B., GRUÍSSEM, W., JONES, R. Signal Perception and Transduction. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. – Ed. American Society of Plant Physiologists, p. 2000.

BYRD Jr, D.W., KIRKPATRICK, T., BARKER, K.R. An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **Journal of Nematology**. v.15 (1), p.142-143, 1983.

COSTA, M.J.N., CAMPOS, V.P., PFENNING, L.H., OLIVEIRA, D.F. Toxicidade de filtrados fúngicos à *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia brasileira**. v. 26 (4), p. 749-755, 2001.

CHITWOOD, D.J. Phytochemical based strategies for nematode control. **Annual Review of Phytopathology**. v.40, p. 221-249, 2002.

DAVIS, E.L., HUSSEY, R.S., BAUM, T.J. Getting to the roots of parasitism by nematodes. **TRENDS in Parasitology**. v. 20 (3), p. 134-141, 2004.

DENAULT, J.B., SALVESEN, G.S. Caspases: Keys in the ignition of cell death. **Chemical Reviews**. v. 102, p. 4489-4499, 2002.

DIOP, N.N., KIDRIC, M., REPELLIN, A., GAREIL, M., ARCY-LAMETA, A. D., THI, A.T.P., FODIL, Y. Z. A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) leaves. **FEBS letters**, v. 577, p. 545-550, 2004.

DUBEY, V.K., PANDE, M., SINGH, B.K., JAGANNADAHAN, M.V. Papain-Like proteases: Applications of their inhibitors. **African Journal of Biotechnology**. v. 6 (9), p. 1077-1086, 2007.

DUBIN, G. Proteinaceous cysteine protease inhibitors. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 62, p. 653-669, 2005.

EHLERS, J.D., HALL, A.E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) **Filed Crops Research**. v. 53, p. 187-204, 1997.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. Disponível em <http://www.cpatu.embrapa.br/novidades_caupi.htm. Acesso dia 5 ago. 2007.

FERY, R.L. New Opportunities in *Vigna*. Trends in New Crops and New Users. J. Janick and A. Whipkey, (eds.) ASHS Press, Alexandria, VA. 2002

FLOR, H.H. Host-parasite interaction in flax rust. Its genetics and other implications. **Phytopathology** v. 45, p. 680-685, 1955.

FREIRE-FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. *In*: ARAUJO, J.P.P. de e WATT, E. E. (eds.) **O caupi no Brasil**, p. 27-46. Brasília: IITA/EMBRAPA, p. 722. 1988.

FREIRE-FILHO., F.R., LIMA, J.A.A., RIBEIRO, V.Q. Feijão-caupi: Avanços tecnológicos. Brasília, DF : Embrapa Informação Tecnológica, 519 p. 2005.

FREITAS, L. G., OLIVEIRA, R. D. L., FERRAZ, S. **Introdução à nematologia** UFV Viçosa, 1999.

GHEYSEN, G., FENOLL, C. Gene expression in nematode feeding sites. **Annual Review of Phytopathology**. v. 40, p. 191-219, 2002.

GIANINAZZI, S., MARTIN, C., VALLÉE, J.C. Hypersensibilité aux virus, température et protéines solubles chez le *Nicotiana xanthi* nc. Apparition de nouvelles macromolécules lors de la répression de la synthèse virale. **CR Academy of Science of Paris**, v. 270, serie D, p. 2383-2386, 1970.

GIANOTTI, A., RIOS, W.M., SOARES-COSTA, A., NOGAROTO, V., CARMONA, A.K., OLIVA, M.L.V., ANDRADE, S.S., HERIQUE-SILVA, F. Recombinant expression, purification, and functional analysis of two novel cystatins from sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Protein Expression and Purification**. v. 47, p. 483-489, 2006.

GOELLNER, M., WANG, X., DAVIS, E.L. Endo- β -1,4-glucanase expression in compatible plant-nematode interactions. **The Plant Cell**. v. 13, p. 2241-2255, 2001.

GRAHAM, T.L., GRAHAM, M.Y. Role of hypersensitive cell death in conditioning elicitation competency and defense potentiation. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 55, p. 13-20, 1999.

GRUDKOWSKA, M., ZAGDANSKA, B. Multifunctional roles of plant cysteine proteinases. **Acta Biochimica Polonica**. v. 51 (3), p. 602-629, 2004.

GRUNDLER, F.W., BÖCKENHOFF, A. Physiology of Nematode Feeding and Feeding Sites. *In*: OWEN, K.J., GREEN, C.D., DEVERALL, B.J. A benzothiadiazole applied to foliage reduces the development of egg deposition by *Meloidogyne* spp. in glasshouse-grown grapevine roots. **Australasian Plant Pathology**, v. 31, p. 47-53, 2002.

GUTIERREZ-CAMPOS, R., TORRES-ACOSTA, J.A., SAUCEDO-ARIAS, L.J., GOMEZ-LIM, M.A. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. **Nature Biotechnology**. v. 17, p. 1223-1226, 1999.

HABIB, H., FAZILI, K.M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**. v. 2 (3), p. 068-065, 2007.

HOAGLAND, D.R., ARNON, D.I. (1950). The water culture method for growing plants without soil. **California Agriculture Experimental Station of University of California, Berkeley**, v. 347p. 139, 1950.

HOWARD, G.C. Labeling proteins with fluorochromes, *In*: G. C. Howard (Ed.) **Methods in Nonradioactive Detection**, Appleton & Lange, Norwalk, Connecticut, (1993), pp. 39-46.

HSIANG, L.H.T., GOOGWIN, P.H. Role of two cysteine proteinase in susceptible response of *Nicotiana bnethamiana* to *Colletotrichum destrutivum* and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae* pv. tomato. **Plant Science**. v. 170, p. 1001-1009, 2006.

HUSSEY, R. S., BARKER, K. R. A comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. **Plant Disease Reporter**. v. 57, p. 1025-1028, 1973.

IVANOV, D., EMONET, C., FOATA, F., AFFOLTER, M., DELLY M., FISSEHA, M., BLUM-SPERISEN, S., ARIGONI, F. A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase like serine proteases. *In*: HABIB, H., FAZILI, K.M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants. **Biotechnology and Molecular Biology Review**. v. 2 (3), p. 068-065, 2007.

JAUBERT, S., MILAC, A.L., PETRESCU, A.J., ALMEIDA-ENGLER, J., ABAD, P., ROSSO, M.N. *In planta* secretion of a calreticulin by migratory and sedentary stages of root-knot nematode. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 18 (12), p. 1277-1284, 2005.

JOSHI, B. N., SAINANI, M.N., BASTAWADE, K.D., GUPTA, V.S., RANJEKAR, P.K. Cysteine Protease Inhibitor from Pearl Millet: A New Class of Antifungal Protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 246, p. 382-387, 1998.

JOURAND, P., RAPIOR, S., FARGETTE, M., MATEILLE, T. Nematostatic activity of aqueous extract of west african *Crotalaria* species. **Nematology**. v. 6 (5), p. 765-771, 2004.

KENNED, A.R. The Bowman-birk inhibitor from soybeans as an anticarcinogenic agent. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 68 (6), p. 1406-1412, 1998.

KIGGUNDU, A., PILLAY, M., VILJOEN, A., GOLD, C., TUSHEMEREIRWE, W., KUNERT, K. Enhancing banana weevil (*Cosmopolitis sordidus*) resistance by plant genetic modification: A perspective. **African Journal of Biotechnology**. v. 2 (12), p. 563-569, 2003.

KOMBRINK,E., SCHMELZER, E. The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. **European Journal of Plant Pathology**. v. 107, p. 69-78, 2001.

KOUZUMA, Y., KAWANO, K., KIMURA, M., YAMASAKI, N., KADOWAK, T., YAMAMOTO. Purification, characterization, and sequencing of two cysteine proteinase inhibitors, sca and scb, from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. **Journal of Biochemistry**. v. 119, p., 1106-1113, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAWRENCE, P. K., KOUNDAL, K. R., Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **EJB Eletronic Journal of Biotechnology**, v.5, p. 93-109, 2002.

LECAILLE, F., KALETA, J., BRÖMME, D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: Their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. **Chemical Review**. v. 1002, p. 4459-4488, 2002.

LILLEY, C. J., DEVLIN, P., URWIN, P. E., ATKINSON H. J. Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants. **Parasitology Today** v. 10, p.414-417, 1999.

LILLEY, C.J., URWIN, P.E., JOHNSTON, K.A., ATKINSON, H.J. Preferential expression of a plant cystatin at nematode feeding sites confers resistance to *Meloidogyne incognita* and *Globodera pallida*. **Plant Biotechnology Journal**. v. 2, p. 3-12, 2004.

LIPKE, H., FRENKEL, G. S., LIENER, I. F. Effects of soybean inhibitors on growth of *Tribolium confusum*. In: LAWRENCE, P. K., KOUNDAL, K. R., Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **EJB Eletronic Journal of Biotechnology**, v.5, p. 93-109, 2002.

MAGGENLI, A. General Nematology. In: WILLIAMSON, V.M., HUSSEY, R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant Cell**. v. 8, p. 1735-1745, 1996.

MAI, W.F., NULLIN, P.G. Plant parasitic nematodes: A pictorial key to genera. 5th. Ed. p. 277, 1996.

MARÉCHAL R., MASCHERPA J. M., STAINER, F. Etude taxonomique d'un groupe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base données morphologiques et polliniques, traitées pour l'analyse informatique. **Boissiera**. v. 28, p. 1-273, 1978.

MARTÍNEZ, M., LÓPEZ-SOLANILLA, E., RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P., CARBONERO, P., DÍAZ, I. Inhibition of plant-pathogenic fungi by the barley cystatin Hv-CPI (gene *lcy*) is not associated with its cysteine-proteinase inhibitory properties. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 16 (10) p. 876-883, 2003.

MARTINS, A.S. Benzotriazole (BTH) na indução de resistência do feijão-de-corda [*Vigna unguiculata* (L.) walp.] ao nematóide *Meloidogyne incognita*, raça 1. Tese de Doutorado em Bioquímica. **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFC**, Fortaleza, 2007.

MAUCH, F., MEEHL, J.B., STAEHELIN, L.A. Ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanases accumulate specifically in the lower epidermis and along vascular strands of bean leaves. **Planta** v. 186, p. 367-375, 1992.

MAURICIO, R., RAUSHER, M.D., BURDICK, D.S. Variation in defense strategies of plants: are resistance and tolerance mutually exclusive? *In*: STOTZ, H.U., PITTENDRIGH, B.R., KROYMANN, J., WENIGER, K., FRITCHE, J., BAUKE, A., MITCHELL-OLDS, T. Induced plant defense response against chewing insects. Ethylene signaling reduces resistance of *Arabidopsis* against egyptian cotton worm but not diamondback moth. **Plant Physiology**. v. 124, p. 1007-1017, 2000.

MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: Current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**. v. 107, p. 13-18, 2001.

MICHAUD, D. Gel electrophoresis of proteolytic enzymes. **Analytica Chimica Acta**. v. 372, p. 173-185, 1998.

MOSOLOV, V.V., VALUEVA, T.A.. Proteinase inhibitors and their function in plants: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 41 (3), p. 227-246, 2005.

OLIVEIRA, A. S. Purificação e caracterização de um inibidor de proteinases cisteínicas de sementes de Algaroba (*Prosopis juliflora*). Dissertação de Mestrado. **Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Natal, 2000.

OLIVEIRA, A.S., PEREIRA, R.A., LIMA, L.M., MORAES, A.H.A., MELO, F.R., FRANCO, O.L., BLOCH-JUNIOR, C., GROSSI-DE-SÁ, M.F., SALES, M.P. Activity toward bruchid pest of a Kunitz-type inhibitor from seeds of the algaroba tree (*Prosopis juliflora* D.C.). **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 72, p. 122-132, 2002.

OLIVEIRA, A.S., XAVIER-FILHO, J. SALES, M.P. Cysteine proteinases and cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 46 (1), p. 91-104, 2003.

OZERETSKOVSKAYA, O.L., VARLAMOV, V.P., VASYUKOVA, N.I., CHALENKO, G.I., GERASIMOVA, N.G., PANINA, Y.S. Influence of systemic signal molecules on the rate of spread of the immunizing effect of elicitors over potato tissues. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 40 (2), p. 213-216, 2004.

PADULOSI, S e NG, N. Q. Origin, taxonomy, and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Em: SINGH, B. B., RAJ, M., DASHIELL, K. E., JACKAI, L. E. N. (eds.). **Advances in Cowpea Research**. International Institute of Tropical Agriculture (IITA) e Japan International Research Center for Agricultural Sciences (JIRCAS). IITA, Ibadan, Nigeria, Sayce Publishing, Devon, p. 1-11, 1997.

PERNAS, M., LÓPEZ-SOLANILLA, E., SÁNCHEZ-MONGE, R., SALCEDO, G., RODRÍGUEZ-PALENZUELA, P. Antifungal activity of a plant cystatin. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 12 (7), p. 624-627, 1999.

PERNAS, M., SÁNCHEZ-MONGUE, R., GÓMEZ, L., SALCEDO, G. A chestnut seed cystatin differentially effective against cystein proteinases from closely related pests. **Plant Molecular Biology**, v. 38, p. 1235-1242, 1998.

PERRY, R.N. Chemoreception in plant parasitic nematodes. **Annual Review of Phytopathology**. v. 34, p. 181-199, 1996.

PIO-RIBEIRO, G., FILHO, F. M. A. Doenças do Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) In: KIMATI, H., AMORIM, A., BERGAMIM FILHO, A., CAMARGO, L. E. A., REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia**. Volume 2 - Doenças de Plantas cultivadas. 3ª edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo SP, 1997.

RIPOLL, C., FAVERY, B., LECOMTE, P., VAN DAMME, E, PEUMANS W., ABAD, P., JOUANIN, L. Evaluation of the ability of lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis*) to protect plants against root-knot nematodes. **Plant Science**, v. 164, p. 517-523, 2003.

SAMACK, D.A., SMIGOCKI, A.C. Expression of oryzacystatin I and II in alfafa increases resistance to the root-lesion nematode. **Phytopathology**. v. 93 (7), p. 799-804, 2003.

SANTINO, A., GALLO, A., LEONE, A., POLTRONIERI, P., ZACHEO, G. Purification and characterization of a novel papain inhibitor from common bean (*Phaseolus vulgaris*) seed. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 293-298, 1998.

SCHÄGGER, H., VON JAGOWO, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-poliacrilamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 KDa. **Analytical Biochemistry**. v. 166, p. 368-379, 1987.

SCHROEDER, N.E., MacGUIDWIN, A.E. Incorporation of a fluorescent compound by live *Heterodera glycines*. **Journal of Nematology**, v. 39(1), p. 43-49, 2007.

SHULK, R. H., MURDOCK, L. L. Lipoxygenase trypsin inhibitor and lectin from soybean: effects on larval growth of *Manduca Sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *In*: LAWRENCE, P. K., KOUNDAL, K. R., Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **EJB Eletronic Journal of Biotechnology**, v.5, p. 93-109, 2002.

SILVA, G.S. Ocorrência e controle de fitonematóides no feijão caupi no Meio-Norte do Brasil. *In*: Embrapa Meio-Norte. **A cultura do feijão caupi no meio-norte do Brasil**. Teresina:, 263p. 2000.

SILVA, G.H., OLIVEIRA, D.F., CAMPOS, V.P. Purificação de metabólitos fúngicos com efeitos tóxicos sobre *Meloidogyne incognita*. **Fitopatologia Brasileira**. v. 27(6) p 175-181, 2002.

SILVEIRA, J.A.G., COSTA, R.C.L., OLIVEIRA, J.T.A. Drought-induced effects and recovery of nitrate assimilation and nodule activity in cowpea plants inoculated with *Bradyrhizobium spp.* under moderate nitrate level. **Brasilian Journal of Microbiology** v. 32, p. 187-194, 2001.

SZILÁGYI, A., ZÁVODSZKY, P. Structural differences between mesophilic moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey. **Structure**. v. 8, p. 493-504, 2000.

TANAKA, Y., TSUMOTO, K., YASUTAKE, Y., UMETSU, M. How oligomerization contributes to the thermostability of an archaeon protein. Protein 1-isoaspartyl-O-methyltransferase from *Sulfolobus tokodaii*. **Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 32957-32967, 2004.

TRIVEDI, S., GEHLOT, H.S., RAO, S.R. Protein thermostability in Archaea and Eubacteria. **Genetics and Molecular Research**. v. 5 (4), p. 816-827, 2006.

URWIN, P. E., ATIKINSON, H. H., WALLER, D. A., MCPHERSON, M. J. Engineered oryzacystatin-I expressed in transgenic hairy root confers resistance to *Globodera pallida*. In: URWIN, P. E., LILLEY, C. J., MCPHERSON, M. J., ATKINSON, H. J. Resistance to both cyst and root-knot nematodes conferred by transgenic *Arabidopsis* expressing a modified plant cystatin. **The Plant Journal**, v. 12, p. 455-461, 1997.

VAIN, P. WORLAND, B., CLARKE, M.C., RICHARD, G., BEAVIS, M., LIU, H., KOHLI, A., LEECH, M., SNAPE, J., CHRISTOU, P., ATKINSON, H. Expression of an engineered cysteine proteinase inhibitor (Oryzacystatin-I Δ D86) for nematode resistance in transgenic rice plants. **Theoretical and Applied Genetic**. v. 96, p. 266-271, 1998.

VAN DER HORN, R.A., JONES, J.D.G. The plant proteolytic machinery and its role in defense. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 7, p. 400-407, 2004.

VAN LOON, L.C. Induced Resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. **European Journal of Plant Pathology**. v. 103, p. 753-765, 1997.

VAN LOON, L.C., REP, M., PIETERSE, C.M.J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review Phytopathology**. V. 44, p. 135-62, 2006.

VAN LOON, L.C., VAN KAMMEN, A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var 'Samsun' and 'Samsun NN'. Changes in protein constitution after infection with TMV. **Virology**. v. 40, p. 199-211, 1970.

VANHOLME, B., MEUTTER, J.D., TYTGAT, T., VAN MONTAGO, M., COOMANS, A., GHEYSEN, G. Secretions of plant parasitic nematodes: A molecular update. **Gene**. v. 332, p. 13-27, 2004.

VERDCOURT, B. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the flora of tropical East Africa. IV. **Kew Bullrtin**, v. 24: 507-569, 1970.

WALKER, A.J., URWIN, P.E., ATKINSON, H.J., BRAIN, P., GLEN, D.M. SHEWRY, P.R. Transgenic *Arabidopsis* leaf tissue expressing a modified oryzacystatin shows resistance to the field slug *Deroceras reticulatum* (Müller). **Transgenic Research**. v. 8, p. 95-103, 1999.

WALSH, T. A., STRICKLAND, J.A. Proteolysis of the 85-Kilodalton crystalline cystein proteinase inhibitor from potato release functional cystatin domains. *In*: OLIVEIRA, A. S., XAVIER-FILHO, J., SALES, M. P. Cysteine Proteinases and Cystatins. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 91-104, 2003.

WEN, C.Y., HUANG, S.C., Lin-SHIAU, S.Y., Lin, J.K. Bowman-birk inhibitors abates proteasome function and suppress the proliferation of mcf7 breast cancer cells through accumulation of map kinase phosphatase-1. **Carcionogenesis**. v. 26 (7), p. 1296-1306, 2005.

WEN, R., ZHANG, S.C., MICHAUD, D., SANFAÇON, H. Inhibitory activity of cystatins on proteolytic activities of the Pul pox potyvirus cysteine proteinases. **Virus Research**. v. 105, p. 175-182, 2004.

WILLIAMSON, V.M., HUSSEY, R.S. Nematode pathogenesis and resistance in plants. **The Plant Cell**. v. 8, p. 1735-1745, 1996.

WU, J., HAARD, N.F. Purification and characterization of a cystatin from the leaves of methyl jasmonate treated tomato plants. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 127, p. 209-220, 2000.

WYSS, U., GRUNDLER, F.M.W., MUNCH, A. The parasitic behavior of second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* in roots of *Arabidopsis thaliana*. **Nematologica** v. 38, p. 89-92, 1992.

XAVIER-FILHO, J. The Biological roles of serine and cysteine proteinase inhibitors in plants. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, p. 1-6, 1992.

YANG, A.H., YEH, K.W. Molecular cloning, recombinant gene expression, and antifungal activity of cystatin from taro (*Colocasia esculenta* cv. Kaosiung no. 1). **Planta**. v. 221, p. 493-501, 2005.

YEATES, G.W., BONGERS, T., De GOEDE, R.G.M., FREACKMAN, D.W., GEORGIEVA, S.S. Feeding habits in soil nematodes families and genera – an outline for soil ecologists. **Journal of Nematology** v. 25, p. 315-331, 1993.

ZHAO, Y., BOTELLA, M.A., SUBRAMANIAN, L., NIU, X., NIELSON, S.S., BRESSAN, R.A., HASEGAWA, P.M. Two wound-inducible soybean cysteine proteinase inhibitors have greater insect digestive proteinase inhibitory activities than a constitutive homolog. **Plant Physiology**. v. 111, p. 1299-1306, 1996.

ZHU-SALZMAN, K., KOIWA, H., SALZMAN, R.A., SHADE, R.E., AHN, J.E. Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a tree-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. **Insect Molecular Biology**. v. 12 (2), p. 135-145, 2003.

ZINOV'EVA, S.V., VASYUKOVA, N.I., OZERETSKOVSKAYA, O.L. Biochemical aspects of plant interactions with phytoparasitic nematodes: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 40 (2), p. 111-119, 2004.

10.0 – Anexos

Arquivo analisado:
ANÁLISE ESTATÍSTICA DA MASSA RADICULAR - EXPERIMENTO TIME-COURSE

Variável analisada: MASSA

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DAP	3	15.833333	5.277778	12.978	0.0019
erro	8	3.253333	0.406667		
Total corrigido	11	19.086667			
CV (%) =	19.13				
Média geral:	3.3333333	Número de observações:		12	

Teste Tukey para a FV DAP

DMS: 1,66853037979681 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,368178700572909

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
10	1.766667	a1
15	2.700000	a1
20	4.400000	a2
25	4.466667	a2

Arquivo analisado:
ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TEOR DE PROTEÍNAS POR RAIZ - EXPERIMENTO TIME-COURSE

Variável analisada: PRAIZ

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DAP	3	13.636667	4.545556	11.680	0.0027
erro	8	3.113333	0.389167		
Total corrigido	11	16.750000			
CV (%) =	17.57				
Média geral:	3.5500000	Número de observações:		12	

Teste Tukey para a FV DAP

DMS: 1,63223485559161 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,360169713082905

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
10	2.166667	a1
15	2.900000	a1 a2
25	4.300000	a2 a3
20	4.833333	a3

Arquivo analisado:
ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ATIVIDADE TOTAL POR MILILITRO DE EXTRATO - EXPERIMENTO TIME-COURSE

Variável analisada: UAIML

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DAP	3	0.040167	0.013389	0.391	0.7627
erro	8	0.273733	0.034217		
Total corrigido	11	0.313900			
CV (%) =	10.54				
Média geral:	1.7550000	Número de observações:		12	

Teste Tukey para a FV DAP

DMS: 0,483986981556304 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,106796795624005

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
15	1.706667	a1
10	1.710000	a1
20	1.753333	a1
25	1.850000	a1

Arquivo analisado:
ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ATIVIDADE ESPECÍFICA - EXPERIMENTO TIME-COURSE

Variável analisada: UAIMGP

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
TEMPO	3	4.028967	1.342989	6.342	0.0165
erro	8	1.694133	0.211767		
Total corrigido	11	5.723100			
CV (%) =	9.42				
Média geral:	4.8850000	Número de observações:		12	

Teste Tukey para a FV TEMPO

DMS: 1,20404752917396 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,265685695679856

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
10	4.176667	a1
15	4.700000	a1 a2
20	4.880000	a1 a2
25	5.783333	a2

Arquivo analisado:
ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ATIVIDADE POR GRAMA DE MASSA FRESCA DE RAIZ - EXPERIMENTO TIME-COURSE

Variável analisada: UAIGMF

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DAP	3	10.881092	3.627031	6.120	0.0181
erro	8	4.741200	0.592650		
Total corrigido	11	15.622292			
CV (%) =	16.74				
Média geral:	4.5991667	Número de observações:		12	

Teste Tukey para a FV DAP

DMS: 2,01425279467506 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,444465971700872

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
10	3.426667	a1
15	4.340000	a1 a2
20	4.553333	a1 a2
25	6.076667	a2

Arquivo analisado:
ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ATIVIDADE TOTAL POR RAIZ - EXPERIMENTO TIME-COURSE

Variável analisada: UAITOTAL

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
DAP	3	552.944900	184.314967	11.839	0.0026
erro	8	124.549067	15.568633		
Total corrigido	11	677.493967			
CV (%) =	29.47				
Média geral:	13.3883333	Número de observações:		12	

Teste Tukey para a FV DAP

DMS: 10,3238117247493 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 2,27805716443737

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
10	4.710000	a1
15	10.090000	a1 a2
20	15.743333	a2 a3
25	23.010000	a3

Arquivo analisado:
ANÁLISE ESTATÍSTICA PROTEÍNAS TOTAIS DIFERENTES AMOSTRAS - FRACIONAMENTO COM SULFATO DE AMÔNIO

Variável analisada: MGPTOTAL

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	6	83.786495	13.964416	153.938	0.0000
erro	14	1.270000	0.090714		
Total corrigido	20	85.056495			
CV (%) =	11.49				
Média geral:	2.6204762	Número de observações:		21	

Teste Tukey para a FV AMOSTRA

DMS: 0,839948755446201 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,17389104415724

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
60/90	0.250000	a1
30/60	0.596667	a1 a2
0/30	1.360000	a2
0/60	2.510000	a3
0/90	2.873333	a3
Ebf	4.553333	a4
E B	6.200000	a5

Arquivo analisado:
ANÁLISE ESTATÍSTICA DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DE DIFERENTES MATERIAIS - FRACIONAMENTO COM
SULFATO DE AMÔNIO

Variável analisada: UAIMGP

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	6	191.759067	31.959844	60.420	0.0000
erro	14	7.405400	0.528957		
Total corrigido	20	199.164467			
CV (%) =	13.59				
Média geral:	5.3533333	Número de observações:		21	

Teste Tukey para a FV AMOSTRA

DMS: 2,02826731109255 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 0,419903617058781

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
0/30	2.413333	a1
0/60	3.560000	a1
30/60	3.723333	a1
0/90	3.730000	a1
60/90	3.940000	a1
E B	9.510000	a2
Ebf	10.596667	a2

Arquivo analisado:
ANÁLISE ESTATÍSTICA DO EFEITO DAS AMOSTRAS SOBRE A MOBILIDADE DE JUVENIS

Variável analisada: PERCENTUAL

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	17	6698.492593	394.028976	9.794	0.0000
erro	36	1448.340000	40.231667		
Total corrigido	53	8146.832593			
CV (%) =	75.24				
Média geral:	8.4296296	Número de observações:		54	

Teste Tukey para a FV AMOSTRA

DMS: 19,4262754087415 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 3,66204253874195

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
PIHPLC 60	0.000000	a1
F3060f 60	0.000000	a1
E B 20	0.000000	a1
F3060 20	1.066667	a1
Ebf 20	1.266667	a1
PIIHPLC 60	1.400000	a1
µGUA	2.233333	a1 a2
PIHPLC 20	2.766667	a1 a2
PIHPLC 40	3.233333	a1 a2
PIIHPLC 20	3.333333	a1 a2
Ebf 40	3.766667	a1 a2
EB 40	5.666667	a1 a2
PBS pH 7,21	7.200000	a1 a2
PIIHPLC 40	9.900000	a1 a2
F3060 40	18.733333	a1 a2 a3
F3060 60	20.866667	a2 a3 a4
F3060f 20	32.033333	a3 a4
F3060f 40	38.266667	a4

Arquivo analisado:
ANÁLISE ESTATÍSTICA DO EFEITO DAS AMOSTRAS SOBRE A MORTALIDADE DE JUVENIS

Variável analisada: PERCENTUAL

Opção de transformação: Variável sem transformação (Y)

TABELA DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
AMOSTRA	17	74369.580926	4374.681231	111.073	0.0000
erro	36	1417.886667	39.385741		
Total corrigido	53	75787.467593			
CV (%) =	15.50				
Média geral:	40.4796296	Número de observações:		54	

Teste Tukey para a FV AMOSTRA

DMS: 19,2209583757248 NMS: 0,05

Média harmonica do número de repetições (r): 3
Erro padrão: 3,62333827387308

Tratamentos	Médias	Resultados do teste
µGUA	1.033333	a1
Ebf 20	6.200000	a1 a2
PBS pH 7,21	6.233333	a1 a2
F3060 20	6.666667	a1 a2
EB 40	8.566667	a1 a2
E B 20	8.666667	a1 a2
Ebf 40	10.100000	a1 a2
F3060 40	10.666667	a1 a2
F3060 60	17.700000	a1 a2 a3
F3060f 20	21.300000	a2 a3
PIIHPLC 20	35.833333	a3
F3060f 40	59.100000	a4
PIIHPLC 40	75.100000	a4 a5
PIHPLC 20	89.966667	a5 a6
PIHPLC 40	90.800000	a5 a6
F3060f 60	90.966667	a5 a6
PIIHPLC 60	94.233333	a5 a6
PIHPLC 60	95.500000	a6