



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JAKELINY AKEMY YAMAMOTO DE OLIVEIRA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE
PROTEASES PRODUZIDAS PELO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana* CG432
ATIVADO EM INSETOS BROCA-DO-CAFÉ**

Londrina
2008

JAKELINY AKEMY YAMAMOTO DE OLIVEIRA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE
PROTEASES PRODUZIDAS PELO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana* CG432
ATIVADO EM INSETOS BROCA-DO-CAFÉ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Geni Varéa-Pereira

Londrina
2008

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48p Oliveira, Jakeliny Akemy Yamamoto de.
Purificação e caracterização estrutural de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* CG432 ativado em insetos broca-do-café / Jakeliny Akemy Yamamoto de Oliveira. – Londrina, 2008.
63f. : il.

Orientador: Geni Varéa-Pereira.
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2008.
Inclui bibliografia.

1. Enzimas proteolíticas – Purificação – Teses. 2. *Beauveria bassiana* – Teses. 3. Broca-do-café – Teses. I. Varéa-Pereira, Geni. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 663.1

JAKELINY AKEMY YAMAMOTO DE OLIVEIRA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE
PROTEASES PRODUZIDAS PELO FUNGO
ENTOMOPATOGÊNICO *Beauveria bassiana* CG432
ATIVADO EM INSETOS BROCA-DO-CAFÉ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elza Louko Ida
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Geni Varéa-Pereira
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 28 de março de 2008.

DEDICATÓRIA

A Deus por ter me capacitado
Ao meu esposo e ao meu filho
pelo amor, dedicação e pelo
irresgátavel carinho com que
sempre me cercaram.

AGRADECIMENTOS

É com muito carinho que escrevo esta sessão de agradecimentos, pois as pessoas que aqui menciono tornaram possível a realização deste trabalho, fizeram parte do meu dia a dia neste período e significaram muito para minha formação.

A Deus por tudo que tem me concedido e por ter suprido a todas as minhas necessidades e ter me fortalecido sempre com a sua graça.

Agradeço a minha orientadora Geni Várea-Pereira por ter me aceitado e não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua paciência e dedicação

Ao meu esposo Renato Cruz de Oliveira Junior que incondicionalmente esteve ao meu lado me apoiando, incetivando e auxiliando em todas as circunstâncias.

Ao meu filho Renato Cruz de Oliveira Neto que muitas vezes ficou sem a minha presença para que eu pudesse concluir o Mestrado.

Aos meus pais Izelite e Jorge pela grande torcida, amor e por ter sempre me apoiado, incentivado e auxiliado nos estudos.

Aos meus sogros Renato e Marisa pelo constante apoio, auxilio e carinho que sempre demonstraram.

A Cristiane Pires por ter se dedicado ao meu filho com muita paciência e amor.

A Bruna e ao Peterson por colaborarem com muito amor e carinho sempre que necessário.

A Gislaine Quitério pela torcida e orações

Ao pesquisador do IAPAR Humberto Josue de Oliveira Ramos e ao pesquisador Luiz Pereira da Embrapa-Café que me acolheram e deram suporte técnico para conclusão da pesquisa.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia que contribuíram para a minha formação.

Às sugestões das professoras: Dalva Tomoe Miyagui, Mara Lúcia Luiz Ribeiro e Elza louko Ida.

Ao Nelson Janeiro pela sua paciência e pelo constante auxílio no preparo de soluções, material e tudo que fosse necessário.

Ao auxílio técnico e apoio de Jurandir Pinto Pereira.

A prontidão e eficiência da secretária Elda.

Aos colegas do Curso: Michele, Elaine, Virginia, Flávia, Adriana, Alexandre, Josana, Dayse e Analice pelo agradável convívio e cooperação.

Gostaria de agradecer a Vanessa e Danieli que contribuíram no início dos experimentos para que eu pudesse prosseguir.

Ficam aqui registrados em papel meus sinceros agradecimentos, mas muito mais importante, ficam guardadas em meu coração de forma muito especial, todas essas pessoas que marcaram de forma tão singular esta etapa de minha vida. Muito obrigada.

OLIVEIRA, Jakeliny Akemy Yamamoto. **Purificação e caracterização estrutural de proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* CG432 ativado em insetos broca-do-café.** 2008. 65f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008.

RESUMO

Beauveria bassiana é um fungo entomopatogênico isolado de insetos mortos na natureza e tem sido amplamente estudado devido a sua capacidade de infectar e matar várias espécies de insetos. Os fungos apresentam uma vantagem em relação a outros entomopatógenos, pois não precisam ser ingeridos para causar a infecção. Conídios infectantes penetram no exoesqueleto do inseto por meio da ação de enzimas hidrolíticas como proteases, quitinases e lipases produzidas em resposta a constituição da cutícula do inseto. O objetivo deste trabalho foi purificar e caracterizar as proteases extracelulares produzidas pela cepa brasileira de *B. Bassiana* CG432 previamente reativada em adultos de broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). Para obtenção das proteases, a cepa CG432 foi cultivada em meio líquido basal contendo 1% de glucose, 0,5% de extrato de levedura e inoculadas a 1% com uma suspensão 10^8 conídios/mL, a 28°C e 150 rpm. Os cultivos foram interrompidos no terceiro dia. A purificação e caracterização das proteases extracelulares foram realizadas por ultrafiltração e cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G-100. A atividade das proteases foi determinada em tampão glicina-NaOH 5 mM pH 9,5 por detecção de peptídeos solúveis liberados a 37°C/30 min sobre soro albumina bovina pelo método de Hartree. O fator de purificação obtido foi de 43, massa molecular de 23 kDa e 26 kDa por meio de eletroforese bidimensional PAGE-SDS, e ponto isoelétrico de 4,5, 56 % de ácido aspártico por cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa ODS-C18 e eluente tampão acetato-metanol (38:62). As proteases foram caracterizadas como serino proteases, com resíduos de cisteína, pois foram inibidas por fluoreto fenil-metil-sulfonil e ácido *p*-cloromercúriobenzóico. As proteases do Pico II apresentaram K_m 4×10^{-4} M sobre substrato tipo-subtilisina.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*. Proteases. Purificação. Caracterização estrutural.

OLIVEIRA, Jakeliny Akemy Yamamoto. **Purification and structural characterization of proteases produced by entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* cepa CG432 activated insects coffee berry borer.** 2008. 65p. Dissertation (Master's degree in Biotechnology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2008

ABSTRACT

Beauveria bassiana is an entomopathogenic fungi isolation of death insects in nature and have been widely studied which had its capacity of infect and killing many insects species. Fungus present advantage regarding to other entomopathogens, therefore they do not need to be ingested to cause infection. Conidia to infect penetrating in insect exoskeleton by hydrolytic enzymes action as proteases and chitinases and lipases produced in response organization insect cuticle. The objective of this work was purified and characterizes extracellular proteases produced by the strain Brazilian *B. bassiana* CG432, previously reactivated on adults of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). To obtainment proteases the strain CG432 was cultivated in basal liquid medium containing 1% glucose and 0.5% yeast extract and inoculated 1% with a suspension 10^8 conidia/mL, at 28°C, at 150 rpm. The cultures were interrupted in third day. The purification and characterization from structure of extracellular proteases was realized by ultrafiltration, chromatography in gel Sephadex G-100. The activity proteases in buffer glycine-NaOH 5mM pH 9.5 for detection of free soluble peptides liberated 37°C/30min on serum bovine albumen for the method of Hartree. The factor of purification obtained was 43, molecular mass of 23 and 26k Da by means of eletroforese bidimensional PAGE-SDS, and isoelectric point of 4.5, 56 % of acid aspártic for liquid chromatography of high efficiency in column reversa phase ODS-C18 and eluente buffer acetate-methanol (38:62). The proteases were characterised proteases serine with residue cysteine on the basis of inhibition by phenylmethylsulphonyl fluoride and *p*-chlormercuribenzoic acid. Peak II proteases showed K_m 4×10^{-4} M on subtilisin-like substrate.

Keyword: *Beauveria bassiana*. Proteases. Purification. Structural characterization.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1 CONTROLE BIOLÓGICO	12
2.2 <i>BEAUVERIA BASSIANA</i>	13
2.3 PROCESSO DE INFECÇÃO E FATORES DE VIRULÊNCIA	14
2.3.1 PRODUÇÃO DE TOXINAS	17
2.3.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS	18
2.4 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEASES	20
2.5 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL 2D	22
2.6 MÉTODOS DE COLORAÇÃO	23
2.7 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	24
2.8 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 MICRORGANISMO E ATIVAÇÃO DO INÓCULO	27
4.2 OBTENÇÃO DE EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS (ELC)	27
4.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEASES	28
4.3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE PROTEASES	28
4.3.1.2 ESPECIFICIDADE DAS PROTEASES	29
4.3.1.3 ATIVIDADE INIBIDORA DAS PROTEASES	29
4.3.1.4 CINÉTICA DAS PROTEASES	30
4.3.2 CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE EM GEL PAGE NATIVA	30
4.3.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DA PROTEASE	31
4.3.4 CARACTERIZAÇÃO POR ELETROFORESE PAGE-2D	32
4.3.5 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DAS PROTEASES	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34

REFERÊNCIAS	35
ANEXO	42
ANEXO A – Artigo 1. Identification of proteases produced by entomopathogenic fungi <i>Beauveria bassiana</i> (Bals) Vuill cepa CG432 previously activated in coffee berry borer alive (<i>Hypothenemus hampei</i>)	43

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos cem anos têm-se observado os efeitos nocivos causados ao homem, animais e ambiente como resultado da aplicação dos inseticidas químicos para o controle de pragas na agricultura. Além disso, as pragas têm ocasionado prejuízos econômicos elevados devido à queda da produtividade e qualidade do produto. Um exemplo é a broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, que representa um grande problema entomológico em todas as regiões cafeeiras do mundo, ocasionando perdas de 10% a 80% na produção e estima-se que provoque danos da ordem de 500 milhões de dólares em todo o mundo (CABWEB internet, 2006).

O controle dos insetos-praga baseia-se no uso de inseticidas, mas a sua utilização intensiva e repetida induz à resistência do inseto ao produto químico (ALVES, 1998), fato que demonstra que o controle através dos agentes naturais é a forma mais indicada. Pois, o controle biológico é uma técnica que utiliza inimigos naturais no combate às pragas (ALVES, 1998). Vários microrganismos podem ser utilizados no controle de insetos-praga nas lavouras. Entre os diferentes agentes naturais de controle está o fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* que tem sido considerado o mais eficiente agente de controle microbiano para essa praga (MACLEOD, 1954) e têm sido amplamente estudado quanto ao mecanismo de ação, produção de enzimas, variabilidade genética e especificidade quanto ao inseto hospedeiro.

O fungo *B. bassiana* infecta o inseto por meio da penetração na cutícula por força mecânica e ação de enzimas extracelulares, como proteases, quitinases e lipases que hidrolisam complexos poliméricos de proteínas, quitina e lípidos que são os maiores constituintes da cutícula do inseto. A produção de proteases extracelulares pela cepa brasileira de *B. bassiana* CG432 pode ser elevada por meio da reativação desta cepa em insetos adultos da broca-do-café (ITO *et al.*, 2007). Vários autores demonstraram a capacidade infectiva de *B. bassiana* e seu potencial como agente de controle da broca do cafeeiro (JIMÉNEZ-GÓMEZ, 1992; GONZÁLEZ-GARCIA; FLÓREZ; BUSTILLO, 1993; LA ROSA *et al.*, 1997).

O fungo entomopatogênico *B. bassiana* tem se mostrado um agente microbiano promissor para o controle de insetos-pragas, por isso tem sido amplamente estudado quanto ao mecanismo de ação, produção de enzimas e toxinas, variabilidade genética e especificidade quanto ao inseto hospedeiro.

O melhoramento das técnicas de eletroforese bidimensional-2D, espectrometria de massa e bioinformática fornecem novas ferramentas para a caracterização das proteínas, permitindo analisar as proteases extracelulares produzidas pelo fungo entomopatogênico reativado em insetos broca-do-café (*Hypothenemus hampei*).

Assim o objetivo deste trabalho foi extrair, purificar, caracterizar e analisar as propriedades cinéticas das proteases extracelulares produzidas por *B. bassiana* CG432 visando entender o funcionamento e expressão dos genes para uma futura utilização do fungo no controle biológico da broca-do-café nas lavouras de café na tentativa de eliminar a utilização dos inseticidas químicos devido aos seus efeitos nocivos e cumulativos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTROLE BIOLÓGICO

Alguns insetos são considerados pragas na agricultura porque ocasionam grandes prejuízos econômicos por atacarem as lavouras de milho, soja, algodão, café etc. O controle desses insetos geralmente é realizado pelo emprego de agrotóxicos que ocasionam grandes problemas ao homem, meio ambiente e animais. Além disso, este tipo de controle seleciona insetos resistentes e faz com que a quantidade de inseticida aplicado seja cada vez maior, elevando assim os custos da produção. Esta disparidade entre a disponibilidade de pesticidas químicos e o número de pragas a ser controlado está gerando necessidades crescentes de novos métodos e técnicas de controle (ALVES, 1998).

Como alternativa para a redução da utilização de inseticidas químicos tem-se o controle biológico, que pode ser descrito como o método que utiliza inimigos naturais como nematóides, protozoários, bactérias e fungos no controle de pragas e considerado atóxico (ALVES, 1998). Dentre os microrganismos, os fungos são considerados os mais promissores para o controle de insetos, pois apresentam a vantagem de invadir o inseto através da sua cutícula externa (GOETTEL; JOHNSONA; INGLIS, 1995), enquanto os demais patógenos precisam ser ingeridos para iniciar a doença.

As vantagens da utilização de controle biológico estão na especificidade, não prejudicando insetos considerados ecologicamente importantes, diminuições do desenvolvimento de resistência; seletividade dos patógenos; facilidade de multiplicação e dispersão; efeitos secundários nas próximas gerações dos insetos, como a diminuição da oviposição e viabilidade dos ovos e o uso associado com inseticidas químicos. Mas há algumas desvantagens como a ação inseticida lenta, dificuldade para manutenção da viabilidade e virulência e a necessidade de condições ambientais favoráveis para seu emprego como temperatura, umidade, luminosidade e radiação (ALVES, 1998).

Em torno de 80% das doenças em insetos são provocadas por fungos entomopatogênicos, os quais se distribuem em cerca de 90 gêneros e mais

de 700 espécies. Os principais gêneros são *Beauveria*, *Metarhizium*, *Paecilomyces*, *Nomurea*, *Verticilium* e *Entomophthora*. (TANADA, 1993).

2.2 *BEAUVERIA BASSIANA*

Os fungos consistem em um grupo de microrganismos distintos filogeneticamente. São eucariontes heterotróficos e apresentam estrutura unicelular (leveduras) ou hifas (filamentosos) e sua reprodução pode ser sexual e ou assexual (esporos) (LACAZ *et al.*, 1991).

Os fungos entomopatogênicos mais comuns da classe dos Hifomicetos são *Aspergillus*, *Beauveria*, *Culinomyces*, *Hirsutella*, *Metarhizium*, *Nomuraea*, *Paecilomyces* e *Verticilium* (ALVES, 1998). Os membros desta classe são caracterizados pela forma micelial que produzem esporos latentes assexuados e são denominados conídios. Estes esporos são resistentes a condições ambientais extremas e participam do estágio infectivo do ciclo de vida dos fungos (THOMAS; KHACHATOURIAN; INGLEDEW, 1987).

O gênero *Beauveria* compreende diversas espécies, sendo *Beauveria bassiana* a mais empregada como agente de controle microbiano (BUTT; JACKSON; MAGAN, 2001). A *B. bassiana* é um fungo Deuteromiceto (FERRON, 1978) pertencente à divisão Ascomycota, classe Hifomiceto e de ocorrência cosmopolita (ALVES, 1998).

Foi Vuillemin (1912) que denominou o gênero *Beauveria* e selecionou a espécie *bassiana*. O fungo *B. bassiana* é encontrado naturalmente em algumas plantas e no solo por todo o mundo. É conhecido por fungos muscardine branca por, eventualmente, infectar larvas de insetos (TANADA, 1993). No solo ocorre como saprófita.

B. bassiana apresenta ampla distribuição geográfica e é parasita natural de um grande número de artrópodes, ocorrendo em mais de 200 espécies de insetos, além de ácaros. Em condições de laboratório pode colonizar a maioria dos insetos, sendo que no campo ocorre de forma enzoótica e epizoótica em coleópteros, lepidópteros e hemípteros, e em ocorrências enzoóticas sobre dípteros, himenópteros e ortópteros (ALVES, 1998).

Destaca-se a ação entomopatogênica de *B. bassiana* sobre insetos hospedeiros economicamente importantes como a broca-do-café, *Hypothenemus hampei*, a broca do colmo do milho, *Ostrinia nubilalis*, traça das frutas, *Laspeyresia pomonella*, o besouro japonês de plantas lenhosas, *Popillia japonica*, o besouro colorado da batata, *Leptinotarsa decemlineata*, o percevejo das gramíneas, *Blissus leucopterus* e a lagarta da couve, *Pieris brassicae* (TANADA, 1993).

O fungo *B. bassiana* produz pelo menos três estruturas reprodutivas, conídio aéreo, blastóporos e conídios submersos, as quais, apresentam diferentes propriedades morfológicas e bioquímicas (THOMAS; KHACHATOURIAN; INGLEDEW, 1987; JEFFS; KHACHATOURIANS, 1997). Os conídios aéreos são produzidos em células conidiogênicas a partir de hifas e micélio em superfícies sólidas (HEGEDUS *et al.*, 1992), sendo normalmente empregados como agente infeccioso em práticas de controle biológico. Os blastóporos representam um estado vegetativo, produzidos em meios ricos em nutrientes e são liberados a partir da hifa em crescimento (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1987). Já a produção de conídios submersos depende das condições nutricionais (THOMAS; KHACHATOURIAN; INGLEDEW, 1987). Assim, os seus esporos têm sido aplicados no campo como agente de controle biológico de insetos pragas (FURLONG; PELL, 2001).

2.3 PROCESSO DE INFECÇÃO E FATORES DE VIRULÊNCIA

As doenças fúngicas dos insetos representam um importante aspecto da interação entre fungos entomopatogênicos e seus hospedeiros (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1990).

Para que haja contato entre conídios e insetos têm-se o auxílio de agentes como o vento e a água. Os conídios de muitos fungos a inseto patogênicos aderem fortemente à cutícula do inseto. O mecanismo de ataque dos esporos é realizado devido a forças hidrofóbicas não específicas (BOUCIAS; PENDLAND; LATGE, 1988). Mas existem sistemas de reconhecimento específico como as glicoproteínas e enzimas que foram detectadas sobre a superfície dos conídios. O ataque dos fungos ocorre em razão da interação hidrofóbica entre a cutícula do

inseto e os fascículos organizados em camadas nos conídios (BOUCIAS; PENDLAND, 1991). Estas camadas são formadas pela união de proteínas hidrofóbicas ou hidrofobinas na estrutura aérea dos fungos que protegem os esporos da desidratação do ambiente (KERSHAW; TALBOT, 1998). As substâncias mucilagenosas também favorecem a um ataque passivo em Entomophthorales e alguns deuteromicetos. Há relatos de que muitos fungos entomopatogênicos como *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces farinosus*, *Nomurae rileyi* secretam mucilagem durante a formação do tubo germinativo e/ou apressório. Em muitos casos, a secreção desta mucilagem é devido à ligação do apressório a superfície da cutícula. Esta mucilagem é higroscópica e possivelmente deve criar um ambiente favorável para a liberação de enzimas extracelulares por estas estruturas (BOUCIAS; PENDLAND, 1991).

O desenvolvimento dos fungos depende de condições favoráveis como temperatura, nutrientes e umidade. A temperatura ótima para a sobrevivência do fungo ocorre entre 20 e 30°C (ALVES, 1998), umidade relativa em torno de 90%, sendo que esta é essencial para a esporulação e desenvolvimento do micélio na superfície do cadáver, embora a liberação dos conídios de *B. bassiana* e *Metarhizium anisopliae* seja estimulada também pela escuridão e vibração (TANADA, 1993).

A cutícula dos insetos forma uma barreira contra organismos que não possuem a capacidade de penetração como no caso dos vírus, bactérias e protozoários que necessitam ser ingeridos. Já os fungos entomopatogênicos invadem seus hospedeiros através da cutícula, rompendo esta barreira por mecanismos enzimáticos (proteases, quitinases e lipases) e físicos devido à pressão mecânica da hifa (St LEGER, 1995a). A cutícula do inseto é a primeira barreira para os fungos patogênicos e divide-se em duas camadas. A fina camada externa, chamada epicutícula, contém lipídeos e proteínas. A segunda camada, chamada procutícula, é a mais espessa, sendo composta de exocutícula e endocutícula, que são constituídas principalmente de fibrilas de quitinas embebidas na matriz proteica, juntamente com lipídeos e quinonas (ANDERSEN, 2002). As proteínas são os componentes estruturais predominantes da cutícula do inseto (St LEGER; JOSHI; ROBERTS, 1998) e podem representar até 70% da sua composição (CLARKSON; CHARNLEY, 1996). As cadeias de quitina são unidas por pontes de hidrogênio representando cerca de 20-50% do peso seco da cutícula e estão sempre

associadas às proteínas (CHAPMAN, 1998). Os lipídeos constituem cerca de 7% do peso da cutícula, sendo o ácido esteárico e o ácido graxo mais abundantes (KHACHATOURIANS, 1996).

Os propágulos dos fungos em contato com o hospedeiro iniciam uma série de relações que podem ser reações compatíveis (infecção) ou incompatíveis (resistência). A incompatibilidade ou resistência caracteriza-se quando um propágulo, ao aterrisar no inseto, não induz nenhuma reação pela ausência de reconhecimento entre o fungo e o inseto. Já em reações compatíveis (infecção) tem-se o reconhecimento do fungo e a penetração tegumentar (Figura 1) e ocorre devido à força mecânica exercida pelo crescimento do tubo germinativo com concomitante produção de enzimas hidrolíticas extracelulares no hospedeiro, seguindo pela produção de substâncias mucilagenosas adesivas, formação de apressório na superfície da cutícula e penetração infecciosa na epicutícula, procutícula, epiderme e colonização do inseto na hemocele e hemolinfa (TANADA, 1993).

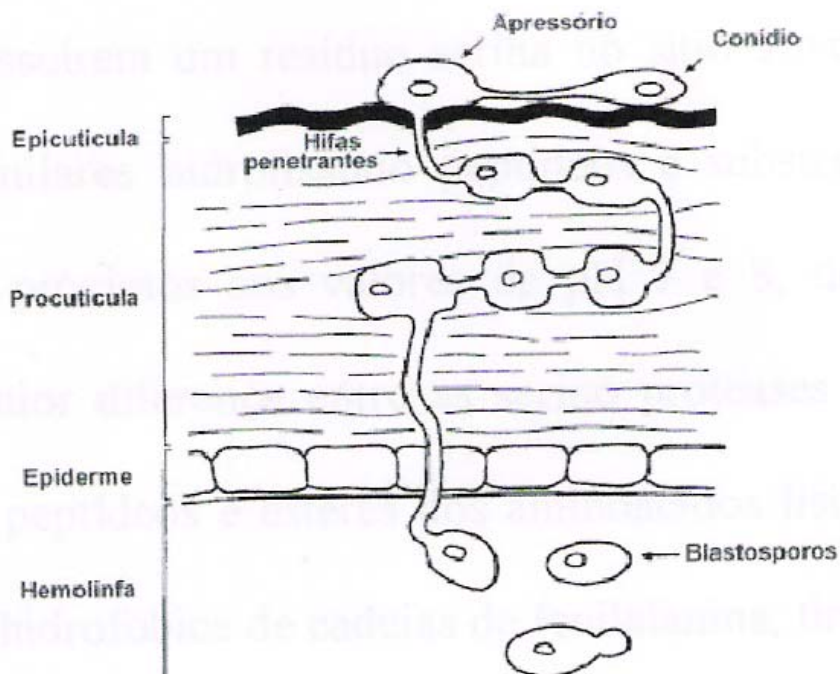


Figura 1 – Estrutura da cutícula de inseto e modo de penetração pelo fungo, reproduzido a partir de Clarkson e Charnley (1996).

Após chegar na hemocele, o fungo se reproduz, pois consegue combater as defesas imunológicas do inseto através do desenvolvimento de protoplastos e formação de estruturas leveduriformes (CLARKSON; CHARNLEY, 1996).

A infecção resulta na ruptura da cutícula do inseto hospedeiro para crescimento do fungo e para formação dos esporos e sua disseminação (BATKO; WEISER, 1965; SOPER, 1974). A morte do inseto ocorre durante a colonização da hemocele, que sofre a depleção de nutrientes ou inanição (TANADA, 1993).

Após a morte do inseto, o micélio se desenvolve saprofiticamente e recobre toda a superfície do corpo, iniciando pelos espiráculos e áreas intersegmentais, sendo reconhecido por uma formação pulverulenta de conídios sobre o corpo do inseto. Este processo é chamado de mumificação (ALVES, 1998; KACHATOURIANS, 1996; TANADA, 1993). Sobre o inseto morto ocorre a presença de grande quantidade de conidióforos e conídios, e internamente, formam-se estruturas fúngicas e produção de toxinas na forma de cristais. Além da presença das toxinas, a morte do hospedeiro ocorre devido a alterações patológicas na hemocele, ação histolítica, bloqueio mecânico do aparelho digestório e outros danos físicos devido ao crescimento vegetativo do fungo. Um processo de infecção semelhante foi descrito para *M. anisopliae* var. *anisopliae* (St LEGER *et al.*, 1991).

2.3.1 PRODUÇÃO DE TOXINAS

Os fungos entomopatogênicos possuem a capacidade de sintetizar toxinas que são utilizadas no ciclo das relações patógeno-hospedeiro (ALVES, 1998).

As toxinas podem ser divididas em não peptídicas e peptídicas. No grupo de toxinas não peptídicas estão pigmentos como os amarelos tenelina e bassianina, e o pigmento vermelho oosporina. As toxinas peptídicas podem ser depsipeptídios cíclicos como a beauvericina e a dextruxina (TANADA, 1993). A *B. bassiana* produz vários compostos tóxicos incluindo as beauvericinas (ARBOLEDA; DELGADO; VALENCIA, 2003), bassianina e oosporeina (JEFFS; KHACHATOURIANS, 1997) e *M. anisopliae* produzem numerosos depsipeptídeos

cíclicos, como a dextruxinas que conduzem para a imunossupressão ou uma paralisia tetânica (KHACHATOURIANS, 1996). A morte do inseto hospedeiro pode resultar de uma combinação de ações tal como a depleção de nutrientes, obstrução física ou a invasão dos órgãos e toxicose (TANADA, 1993).

Em experimentos com *B. bassiana* foi observado um grande número de conídios germinados com produção de uma toxina capaz de causar paralisia no inseto e foi tóxica em aplicação tópica e durante a ingestão pelos insetos (DRESNER, 1950). Pode-se constatar que a *B. bassiana* provocou alterações patofisiológicas em *Heliothis armigera* tal como a diminuição da respiração devido ao aumento do metabolismo, provavelmente ocasionado pela presença de toxinas (SHARMA; AGARWAL; TAJAK, 1994).

2.3.2 PRODUÇÃO DE ENZIMAS

Muitos patógenos podem produzir enzimas que degradam a cutícula de seus hospedeiros, que é constituída de proteínas, quitinas e lipídeos (St LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1987a). As proteases representam uma das principais enzimas pelo fato da proteína ser um componente estrutural predominante da cutícula do inseto e por participarem dos primeiros passos de penetração da barreira cuticular, constituindo-se em um fator crucial na patogenicidade (St LEGER *et al.*, 1988).

St Leger, Charnley e Cooper (1986) observaram que *M. anisopliae*, *B. bassiana* e *V. lecanii* cresceram em meio líquido com cutícula de gafanhoto triturado e secretaram primeiramente esterases e enzimas proteolíticas (endoproteases, aminopeptidases e carboxipeptidase) nas primeiras 24 horas seguidas pela N-acetilglucosaminidase. A quitinase foi produzida de três a cinco dias em níveis basais, e depois aumentou rapidamente. A ordem de síntese das enzimas é justificada pela seqüência dos constituintes cuticulares. A quitinase é uma enzima induzível e, na cutícula, a quitina é mascarada pela proteína; então o aparecimento tardio da quitinase foi resultante da indução pela quitina após a degradação das proteínas cuticulares. Este fato foi comprovado pela microscopia de fluorescência.

Apesar das proteases iniciarem a degradação, permitindo que a quitinase penetre a cutícula, há evidências *in vitro* de que proteases e quitinases atuem sinergicamente na solubilização da cutícula (St LEGER *et al.*, 1996).

Um grande número de proteases é necessário para a digestão da complexa cutícula do inseto (St LEGER, 1995a). Entre estas, cita-se as proteases tipo-subtilisina (Pr1) e do tipo-tripsina (Pr2) (St LEGER; CHARNLEY; COOPER *et al.*, 1987b). Estas proteases fazem parte do grupo das serino proteases por possuírem um resíduo serina no sítio ativo. Tripsina e subtilisina são cineticamente similares hidrolisando peptídeos e substratos sintéticos. Seus picos de atividade são observados em pH 7 e 8, decaindo em pH mais ácido. A maior diferença entre as serino proteases é a especificidade, sendo a tripsina específica para peptídeos e ésteres dos aminoácidos lisina e arginina e a subtilisina específica para a fração hidrofóbica de cadeias de fenilalanina, tirosina e triptofano (FERSHT, 1977).

As proteases do tipo-subtilisina (Pr1) produzida pelo *M. anisopliae* durante o processo de infecção apresentou velocidade de hidrólise maior do que a do tipo-tripsina (Pr2) para a degradação da cutícula do inseto (St LEGER *et al.*, 1996). Proteases do tipo-subtilisina produzidas pelo *M. anisopliae* representam o melhor modelo de determinante de patogenicidade em fungos entomopatogênicos (St LEGER, 1995a).

St Leger *et al.* (1988) constataram que durante a infecção de *Manduca sexta* por *M. anisopliae*, a presença de inibidor de Pr1 reduziu a taxa de mortalidade do inseto e que não houve penetração do fungo através da cutícula, embora tenha ocorrido germinação e formação de apressórios na superfície cuticular. O papel da Pr1 é de grande importância pelo fato de ser a principal protease produzida por estruturas infectivas (apressórios e tubo germinativo) durante a infecção (St LEGER *et al.*, 1989). A secreção de Pr2 por estruturas de infecção (apressório) na superfície da cutícula de *M. sexta* e pela hifa penetrante, sugere que esta enzima pode ter um papel complementar ao da Pr1 na degradação de proteínas cuticulares (St LEGER *et al.*, 1996).

2.4 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PROTEASES

Urtz e Rice (2000) purificaram e caracterizaram uma protease extracelular de *B. bassiana* 111892 através de cromatografia de troca-iônica e gel de eletroforese preparativa tendo uma recuperação de 14,7% e um fator de purificação de 92,6. A massa molecular foi de 31,5 kDa em PAGE- SDS e em cromatografia de filtração em gel apresentou uma massa molecular de 22 kDa. Esta diferença de massa molecular provavelmente ocorreu em razão da eluição da protease ser mais lenta do que o esperado na coluna de filtração em gel. Apresentou ponto isoelétrico de 7,5 e foi inibida por PMSF e quimostatina indicando que é uma protease do tipo serino e com atividade de quimotripsina.

Bidochka e Khachatourians (1987) verificaram que a protease extracelular produzida pela *B. bassiana* GK2016 foi purificada pela precipitação em sulfato de amônio de 60 a 75%, gel filtração Bio-Gel P-10 e Bio-Gel P-60 apresentou um fator de purificação de 18 vezes em relação ao extrato bruto. A massa molecular da protease foi estimada em 35 kDa pela eletroforese em gel PAGE-SDS. A atividade ótima ocorreu em pH 8,5 a 37°C e foi rapidamente inativada a 50°C. A sua atividade enzimática foi de uma endopeptidase, pois hidrolisou elastina, caseína e gelatina, mas foi menos ativa com soro albumina bovina e não apresentou atividade sobre o substrato de protease tipo-tripsina (Pr2). Com a inibição pelo PMSF, classificou-se a protease extracelular como uma serino protease. As serino proteases são amplamente distribuídas entre os fungos e suas massas moleculares variam de 18,5 kDa para 35 kDa.

St Leger, Charnley e Cooper (1987a) separaram duas quimoelastases e três proteases tipo-tripsina dos filtrados do cultivo do fungo *Metarhizium anisopliae*. Mas, purificaram apenas duas proteínas pela precipitação em sulfato de amônio entre 86 a 94%, focalização isoelétrica e cromatografia de afinidade. Obteve-se uma quimoelastase tipo-Pr1 com um ponto isoelétrico de 10,3 e massa molecular 25 kDa e tripsina tipo-Pr2 com um ponto isoelétrico de 4,42 e massa molecular 28,5 kDa. Com a inibição das enzimas pelo PMSF foi possível demonstrar que ambas as enzimas possuíam resíduos serina e histidina no sítio ativo. Estas enzimas foram distinguidas por suas atividades para os substratos Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-NA (Pr1) e Bz-Phe-Val-Arg-NA (Pr2) e o pH ótimo foi 8,0 e 9,0,

respectivamente. Em relação à especificidade das proteases para os substratos, Pr1 apresentou maior atividade que Pr2 para a cutícula de gafanhoto e soro albumina bovina.

Os fungos *Aspergillus terreus*, *Trichophyton vanbreuseghemii* e *Dactylella shizishanna* secretaram proteases com características similares às da *B. bassiana* e *M. anisopliae*. Uma serino protease alcalina extracelular de *Aspergillus terreus* IJIRA 6,2 foi purificada em cromatografia de DEAE-Sephadex A25, fosfocelulose, hidroxapatita, caseína-Sepharose, filtração em gel Sephacril-S-300 e gradiente de centrifugação da densidade do glicerol. A enzima foi purificada pela aparente homogeneidade através de uma combinação de eletroforese em gel de poli-acrilamida (PAGE) contendo 0,1% de SDS com ou sem substrato (gelatina) e subsequente regeneração de sua atividade local pela remoção do SDS. A atividade enzimática foi visualizada no zimograma e no filme de raio-X. A eluição da proteína com atividade de protease teve uma massa molecular de 37 kDa na eletroforese em gel PAGE-SDS. O coeficiente de sedimentação foi de 3,2 s, que é consistente com a massa molecular de 37 kDa e demonstrou ser uma proteína globular. A atividade máxima da protease foi observada em pH 8,5 e em 37°C. A protease purificada foi ativa entre pH 5,5 e 9,5 e foi estável em 60°C. A inibição das enzimas pelo fluoreto fenil-metil-sulfonil (PMSF) e quimostatina demonstrou que a enzima pertence ao grupo das serino proteases (CHAKRABARTI; MATSUMURA; RANU, 2000).

Moallaei *et al.* (2006) purificaram parcialmente uma proteinase sintetizada pelo *Trichophyton vanbreuseghemii* pela precipitação em sulfato de amônio em 80% seguida pela cromatografia de troca-iônica com uma recuperação de 25,8% e um fator de purificação de 3,63. Na eletroforese SDS-PAGE pode-se constatar uma massa molecular aparente de 37 kDa. A atividade de proteinase foi ótima em pH 8 e permaneceu entre o pH 7 e 11. Além disso, a enzima parcialmente purificada apresentou uma atividade queratinolítica indicado pelo teste azure de queratina. A atividade da proteinase para o substrato sintético Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-NA demonstrou pertencer ao grupo das serino proteases.

Wang *et al.* (2006) verificaram a produção de uma serino protease extracelular pelo fungo *Dactylella shizishanna* que foi purificada e caracterizada pela cromatografia de troca catiônica e cromatografia de interação hidrofóbica. A massa molecular foi de aproximadamente 35 kDa estimado por SDS-PAGE. A atividade

ótima da protease (Ds1) foi em pH 10 a 55°C. A protease purificada foi sensível ao PMSF, demonstrando pertencer à família das serino proteases. A Ds1 foi efetiva na degradação da caseína, leite desnatado e menos efetiva na hidrólise de soro albumina bovina, gelatina e cutícula de nematóide, porém não demonstrou efeito na degradação do colágeno. Na análise da atividade nematicida do extrato bruto e da protease purificada constatou-se que o extrato bruto apresentou efeito nematicida maior, sugerindo que as outras enzimas têm um papel importante no processo de infecção.

2.5 ELETROFORESE BIDIMENSIONAL 2D

Existem duas etapas principais na análise proteômica: a primeira etapa consiste em isolar e separar as proteínas de um sistema biológico, geralmente utilizando eletroforese bidimensional ou cromatografia líquida multidimensional acoplada a espectrometria de massa e a segunda etapa consiste na identificação das proteínas separadas, geralmente por espectrometria de massa e bioinformática (CAGNEY *et al.*, 2003; ABBOT, 1999).

Atualmente a eletroforese bidimensional é o modo mais direto para mapear o proteoma de um organismo (LOPEZ, 1999; CAHILL *et al.*, 2001). Este procedimento pioneiro foi descrito por O'Farrel (1975) e Klose (1975) e tem a capacidade de separar milhões de proteínas do extrato celular total.

Na eletroforese bidimensional as proteínas são separadas de acordo com seu ponto isoelétrico (pI) por focalização isoelétrica (IEF) na primeira dimensão e de acordo com sua massa molecular por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS – PAGE) na segunda dimensão (O'FARREL, 1975).

A IEF separa as proteínas conforme o ponto isoelétrico. Após esta etapa, as proteínas são reduzidas, alquiladas e é feita a segunda dimensão (SDS-PAGE) que separa as proteínas conforme a massa molecular. As análises das imagens são feitas utilizando programas computacionais. As proteínas de interesse são removidas do gel bidimensional, digeridas com tripsina e submetidas a análises

espectrométricas para posterior identificação através de seqüências disponíveis em bases de dados (PANDEY; MANN, 2000).

O desenvolvimento das tiras de gradiente de pH imobilizado (IPGs), nas quais um determinado gradiente de pH é imobilizado em uma matriz de poliacrilamida, permitiu melhor reprodutibilidade dos géis de isoeletofocalização e resolveu alguns problemas que ocorriam quando a focalização isoeletrica era feita segundo O'Farrel (1975). Esta técnica foi aprimorada por GÖRG e atualmente é o método mais utilizado para a realização da primeira dimensão (DUNN; GÖRG, 2001).

A eletroforese bidimensional é um método de separação eficiente porque todas as proteínas em uma amostra são separadas simultaneamente fornecendo informações úteis sobre ponto isoeletrico, massa molecular, expressão gênica, abundância relativa e modificações pós-traducionais, verificadas pela alteração da mobilidade eletroforética (PANDEY; MANN, 2000).

2.6 MÉTODOS DE COLORAÇÃO

Há uma grande variedade de métodos de coloração que podem ser utilizados para visualizar as proteínas separadas através de eletroforese bidimensional. Os métodos de coloração mais utilizados são *Coomassie Brilliant Blue*, prata e fluorescência.

Coomassie possui sensibilidade para detectar de 30 a 100 ng de proteína sendo menos sensível que a coloração com prata e os métodos de fluorescência. Exige uma quantidade de amostra maior para que as proteínas sejam devidamente visualizadas e permite uma melhor quantificação do teor relativo de cada proteína (PATTON, 2002). A coloração com prata possui sensibilidade para detectar 0,1 ng de proteína por ponto protéico presente no gel bidimensional. Entretanto, a prata apresenta desvantagens, como a falta de linearidade e a coloração negativa em regiões com altas concentrações de proteínas, devido à saturação (DUNN; GÖRG, 2001).

A coloração por fluorescência é atualmente a melhor alternativa devido a sua alta sensibilidade e linearidade, além de ser totalmente compatível com

espectrometria de massa por apresentar melhor recuperação peptídica (PATTON, 2002; KÖPKE, 2007).

As proteínas também podem ser detectadas através de técnicas de auto-radiografia. Para isto é necessário que a amostra seja constituída de proteínas marcadas radioativamente *in vivo*, utilizando, por exemplo, os isótopos ^{35}S , ^{14}C , ^3H , ou, no caso de fosfoproteínas, ^{32}P .

2.7 ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

A espectrometria de massa determina a massa molecular através da relação carga/massa de íons gerados a partir da molécula analisada. A possibilidade de identificar rapidamente um grande número de proteínas através de espectrometria de massa foi um enorme avanço na área da proteômica. Em 2002, John B. Feen e Koichi Tanaka receberam o prêmio Nobel em química pelo aprimoramento das técnicas de ionização brandas utilizadas em ionização por eletronspray (ESI) e ionização por remoção a laser assistida por matriz (MALDI), respectivamente. Estas técnicas são consideradas brandas pela sua capacidade de gerar íons a partir de macromoléculas não voláteis sem ou com muito pouca fragmentação da molécula analisada.

Atualmente MALDI e ESI são as tecnologias utilizadas para ionização das proteínas e sua subsequente identificação (KÖPKE, 2007). O equipamento MALDI, acoplado a um analisador de massas tipo tempo de voo (ToF), é normalmente utilizado para a realização da impressão digital de peptídeos (PMF) de proteínas e outras moléculas (AEBERSOLD; GOODLET, 2001). A amostra cristalizada com a matriz é irradiada por um feixe de luz a laser, ao qual é conduzido para a sublimação e ionização de peptídeos. Ao redor de 100-500 nanosegundos após a pulsação a laser um forte campo de aceleração é desviado para que conceda uma energia cinética fixa para os íons produzidos pelo processo MALDI. Estes íons passam para um tubo e são voltados para um espelho ou refletidos para corrigir a diferença da energia inicial. A proporção carga/massa está relacionada ao tempo em que os íons alcançam o detector (MANN; HENDRICKSON; PANDEY, 2001).

A tripsina, normalmente utilizada para a digestão das proteínas, faz clivagem específica C-terminal adjacente aos resíduos de arginina e lisina, gerando um conjunto de peptídeos únicos cujas massas são determinadas por espectrometria de massa (SHEVCHENKO *et al.*, 1996; CAGNEY *et al.*, 2003) e que podem ser considerados como impressão digital daquela molécula (QUADRONI; JAMES, 2001). Por exemplo, peptídeos com uma arginina C-terminal geralmente resulta em sinais maiores do que peptídeos com lisina C-terminal. Os dados da massa peptídica obtidos para cada amostra são então colocados contra um banco de dados para correlacionar as massas peptídicas com massas peptídicas conhecidas derivadas da digestão de proteínas únicas (MOLLOY; WITZMANN, 2002).

2.8 IDENTIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS

A identificação de uma proteína através dos valores das massas moleculares de seus peptídeos é realizada por comparação “in silico” através de pesquisa em banco de dados disponíveis como o Mascot, PepTident, ProFound, Ms-Fit, MultIdent, TagIdent, ou CombSearch.

O programa ProFound faz uso de um algoritmo computacional que compara as massas determinadas para peptídeos proteolíticos com as massas calculadas para todas as clivagens enzimaticamente possíveis dos produtos de cada região codificadora de proteína predita pela seqüência genômica de organismos presentes em base de dados. A proteína é identificada baseando-se na avaliação dessa comparação. Este programa está disponível na Internet (<<http://prowl.rockefeller.edu>>). As diversas bases de dados utilizadas são o “Genbank”, o “SwissProt Database”, o “Protein Database” e o “EMBL”.

A identificação é influenciada pela quantidade de proteína na amostra, grau de modificação pós-traducional, qualidade das buscas automáticas e presença da proteína nos bancos de dados (KÖPKE, 2007).

O conhecimento do genoma de um organismo é de grande importância para permitir a identificação exata das proteínas pelo padrão de peptídeos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Purificar e caracterizar proteases extracelulares do fungo *B. bassiana* cepa CG432 ativado em broca-do-café.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Ativar o fungo *B. bassiana* CG432 em insetos da broca-do-café.
- Cultivar o fungo ativado para a produção de proteases.
- Purificar as proteases.
- Caracterizar a estrutura das proteases.
- Analisar as propriedades cinéticas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO E ATIVAÇÃO DO INÓCULO

A cepa de *B. bassiana* CG432 procedente da EMBRAPA/Cenargen e armazenada no Banco de Entomopatógenos do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina foi isolada da família Membracidae (Homoptera), na cidade de Natal, estado do Rio Grande do Norte, região Nordeste do Brasil. A ativação do fungo foi realizada conforme descrito por Ito *et al.* (2007). Insetos vivos de broca-do-café, previamente esterilizados em solução de hipóclorito de sódio a 0,5% foram imersos por 6 segundos em suspensão aquosa dos conídios de *B. bassiana* CG432, acondicionados em placas de petri e incubados em câmara BOD a 25°C por 10 dias para mumificação do inseto. Após a morte os conídios resultantes da colonização dos insetos mortos foram isolados por meio de 3 repicagens em meio de cultura sólido contendo 1% de glucose, 0,5% de extrato de levedura, 0,16% de NaNO₃, 0,11% de Na₂HPO₄.7H₂O, 0,1% de KCl, 0,06% de MgSO₄.7H₂O, 0,04% de KH₂PO₄ e 2% de ágar e utilizados para preparo do inóculo contendo 10⁸ conídios ativados por mL de água destilada estéril e 0,02% de Tween 80.

4.2 OBTENÇÃO DE EXTRATO LIVRE DE CÉLULAS (ELC)

Foram realizados 6 cultivos submersos em duplicata a 28°C, 150 rpm e 1% de inóculo contendo 10⁸ conídios recém-ativados/mL em frascos erlenmeyer de 1000 mL contendo 250 mL de meio líquido com a mesma composição utilizada para o isolamento do fungo ativado e controle sem inóculo (ITO *et al.*, 2007). Os cultivos foram interrompidos no terceiro dia através da filtração à vácuo em banho de gelo e centrifugação a 8000 g por 20 minutos. Os

sobrenadantes reunidos formaram o extrato livre de células (ELC) e foi utilizado como fonte de proteases.

4.3 PURIFICAÇÃO DAS PROTEASES

As proteínas do extrato livre de células foram filtradas e concentradas por ultrafiltração em equipamento Stirred Cell (Amicon) utilizando membranas de porosidade controlada de 100 kDa (PBHK polietersulfona Millipore) e 3 kDa (YM3 celulose regenerada Millipore), respectivamente. O concentrado $C_{3\text{kDa}}$ contendo 8 mg de proteínas foi diafiltrado por três vezes com 250 mL de tampão fosfato 5 mM, pH 7 e fracionado por cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G-100 em coluna de vidro (2 x 104 cm) utilizando como eluente o mesmo tampão da diafiltração e fluxo 18 mL/h. As frações de 3 mL, coletadas a cada 10 minutos, foram monitoradas quanto à presença de proteínas por leitura de absorvância em comprimento de onda de 280 nm. Houve separação de três frações protéicas (I, II e III) e as frações do pico II com atividade de proteases foram reunidas e após o volume foi reduzido até 10 mL por liofilização e diálise exaustiva contra água deionizada em membrana de 12 kDa e foram quantificadas quanto ao teor de proteínas pelo método de Bradford (1976) e atividade de proteases sobre soro albumina bovina e substratos específicos de proteases tipo-subtilisina e tipo-tripsina.

4.3.1 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS PROTEASES

Alíquotas de 500 μL do ELC contendo 100 μg de proteínas e das frações obtidas da purificação foram incubadas a 37°C por 1 hora com 250 μL do tampão glicina-NaOH 5 mM pH 9,5 e 250 μL de soro albumina bovina 5 mg/mL. A reação foi interrompida com 250 μL de ácido tricloroacético 10% e centrifugada a

3000 g por 15 minutos. A concentração de peptídeos solúveis do sobrenadante foi determinada pelo método de Hartree (1972) utilizando equação de regressão ($y=0,00192x + 0,079$ $R^2=0,998$) obtida da curva de calibração construída com soro albumina bovina e absorvância de 650 nm. Uma unidade de atividade proteases (UP) foi definida como μg de peptídeos solúveis liberados pela ação das proteases por mL do ELC nas condições da reação.

4.3.1.2 ESPECIFICIDADE DAS PROTEASES

Alíquotas de 50 μL do Pico II obtido da cromatografia em gel filtração contendo 10 μg de proteínas foram incubadas com 400 μL de tampão Tris-HCl 15 mM pH 8,5 e 50 μL dos substrato específicos de proteases tipo-subtilisina ou tipo-tripsina Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida e N-Benzoil-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilida 1 mM, respectivamente a 28°C por 30 minutos (TIAGO *et al.*,2004). A reação foi interrompida pela adição de 250 μL de ácido acético 30% e centrifugada a 1250 g por 5 minutos. A concentração do cromogênico *p*-nitroanilina do sobrenadante foi determinada por leitura de absorvância em 410 nm e equação de regressão ($y=0,0394 + 0,003$; $R^2=0,9996$) obtida da curva de calibração construída com 0,1 a 5 $\mu\text{g/L}$ de *p*-nitroanilina. Uma unidade de atividade de protease tipo-subtilisina e tipo-tripsina foi definida como μg de *p*-nitroanilina liberada por mL do Pico II nas condições da reação.

4.3.1.3 ATIVIDADE INIBIDORA DAS PROTEASES

As soluções de inibidores serino-proteases (Fluoreto Fenil-Metil-Sulfonil), metalo proteases (Ácido Etileno Diamino Tetracético), cisteíno-proteases (HgCl_2 , *p*-hidroximercuriobenzeno e ácido *p*-cloromercurobenzóico) e aspartato proteases (Ácido Indol Acético) em concentração final de 10 mM na reação, foram pré-incubadas com alíquotas de 50 μL do Pico II e 350 μL de tampão Tris-HCl 0,1 M

(pH 8,5) antes da adição de ambos substratos específicos de proteases tipo-subtilisina ou tipo-tripsina. Após foram adicionados os substratos específicos de proteases tipo-subtilisina ou tipo-tripsina 1 mM, respectivamente. A reação foi interrompida pela adição de 250 μ L de ácido acético 30% e centrifugada a 1250 g por 5 minutos. A concentração do cromogênico *p*-nitroanilina do sobrenadante foi determinada por leitura de absorvância em 410 nm e equação de regressão ($y=0,0394 + 0,003x$; $R^2=0,9996$) obtida da curva de calibração construída com 0,1 a 5 μ g/L de *p*-nitroanilina. Uma unidade de atividade de protease tipo-subtilisina e tipo-tripsina foi definida como μ g de *p*-nitroanilina liberada por mL do Pico II nas condições da reação.

4.3.1.4 CINÉTICA DAS PROTEASES

O valor de K_m das proteases do Pico II foi determinado nas mesmas condições descritas no 4.3.1.2 utilizando concentrações de 0,25 a 1,5 mM do substrato de proteases tipo-subtilisina e determinado pelo gráfico de Lineweaver-Burke.

4.3.2 CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS POR ELETROFORESE EM GEL PAGE NATIVA

Alíquotas de 50 μ L do Pico II obtida pela Sephadex G-100 contendo 10 μ g de proteínas foram analisadas por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10% em condições nativas em tampão TRIS-HCl 3,78 M pH 8,9 a 100 mV (DAVIS, 1964). As bandas protéicas foram reveladas pela complexação com nitrato de prata (NIELSEN; BROWN, 1984). Zimogramas em gel PAGE nas mesmas condições adicionados de 0,02% de gelatina (Difco) foram revelados por coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250.

4.3.3 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DA PROTEASE

A composição de aminoácidos da protease foi quantificada pela metodologia do Yang *et al.* (2002). Alíquotas de 100 μL do Pico II obtido da cromatografia de exclusão molecular contendo 20 μg de proteínas foi hidrolisada por ácido clorídrico 6 M e aquecimento em mufla a 120°C durante 24 horas em ampola de vidro, duplamente lacrada e analisada quanto à composição de aminoácidos através de cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE (Shimadzu modelo CR10), utilizando coluna de fase reversa ODS-C18 (250 x 4,6mm) acoplada a pré-coluna idêntica. A eluição foi realizada em fase móvel constituída por solução acetato de sódio 25 mM e metanol (38:62) cujo pH foi ajustado para 6,8 com ácido acético 5%, a temperatura ambiente, utilizando detector de fluorescência operando em 420 nm para a excitação e 483 nm para emissão (Shimadzu modelo RF135).

Os tempos de retenção obtidos pela análise da amostra foram comparados com os tempos de retenção de soluções-padrão dos aminoácidos ácido aspártico, ácido glutâmico, alanina, arginina, asparagina, cistina/cisteína, fenilalanina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, prolina, serina, treonina, tirosina, triptofano e valina submetidos à derivatização com o 2,3-dicarboxaldeídonaftaleno (NDA) e cianeto de potássio (KCN) em substituição ao *o*-ftaldeído (OPA). A derivatização dos padrões foi realizada por aquecimento a 65°C durante 25 minutos em microtubos para centrífuga (Eppendorf) utilizando 20 μL das soluções de cada aminoácido isoladamente a 0,4 mg/mL e em mistura de 50 mg/mL, utilizando HCl 0,1M, 40 μL de tampão borato 50 mM (pH 8,5), 20 μL de KCN 5 mM e 20 μL de NDA. A concentração de aminoácidos da amostra foi determinada através de curvas de calibração correspondente a cada solução de aminoácido padrão e expressa $\mu\text{g/mL}$.

4.3.4 CARACTERIZAÇÃO POR ELETROFORESE PAGE-2D

Alíquotas de 100 μ L do Pico II obtido da cromatografia de exclusão molecular com atividade de proteases contendo 20 μ g de proteínas foram submetidas à isoeletrofocalização e PAGE-2D segundo Dunn e Gorg (2001). Utilizou-se tiras de 13 cm de gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado de 3-10 durante 4 horas utilizando voltagens crescentes de 500, 1000, 12500 e 14000 a cada hora.

Após a isoeletrofocalização, as tiras de gradiente de pH imobilizado foram imersas em 20 mL de solução de tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,8, contendo uréia 6 mol/L, glicerol 30% (p/v), SDS 2% (p/v), solução de azul de bromofenol 0,25% (p/v) e 50 mg de ditioneitol, durante 15 minutos. Em seguida foram colocadas no mesmo tampão de equilíbrio, adicionados de 200 mg de iodoacetamida por 15 minutos. Logo após foram lavadas em tampão de corrida. A segunda dimensão SDS-PAGE a 12,5% (Cuba "Protean II" Bio-Rad) foi conduzida a 12°C a 15 mA/gel e 30 mA/gel sequencialmente (LAEMMLI, 1970).

4.3.5 ANÁLISE ESPECTROMÉTRICA DAS PROTEASES

O preparo das amostras para análise por meio de MALDI-ToF foi feito conforme o seguinte protocolo, modificado de WESTERMEIER (2004). Para remoção dos corantes, os fragmentos de géis obtidos da eletroforese PAGE-2D contendo as proteínas foram transferidos para eppendorfs e receberam 30 μ L de solução de bicarbonato de amônio 75 mmol/L em etanol 40%. A suspensão foi agitada em vortex e deixada em repouso durante 10 minutos. Este procedimento foi repetido até descoloração total do gel, o que exigiu 8 repetições para o fragmento levemente corado e 10 repetições para o fragmento corado mais intensamente.

Os fragmentos de géis foram desidratados com 3 lavagens de 25 μ L de acetonitrila (ACN) 100% e em seguida os géis foram secados em dessecador à vácuo por 25 minutos.

Para digestão da enzima os géis foram reidratados com solução contendo tripsina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em tampão bicarbonato de amônio 50 mmol/L pH 8,0. A solução com enzima foi aplicada fria (4°C), as amostras permaneceram em banho de gelo por 45 minutos e em seguida foram colocadas em estufa a 37°C por 12 horas.

Após este período iniciou-se a etapa de extração. Foi retirado o sobrenadante e colocado em outro eppendorf. Depois foram adicionados 50 μL de metanol 60% e ácido trifluoroacético (TFA) 1% no gel e realizada a sonicação a 40°C por 10 minutos e depois colocado no agitador (vortex) por 2 minutos e centrifugação a baixa rotação (spin) sendo em seguida retirado o sobrenadante. Este procedimento foi realizado por duas vezes. Em seguida adicionou-se 50 μL de ACN 50% e TFA 1% no gel e realizada a sonicação a 40°C por 10 minutos e depois vortex por 2 minutos e spin, sendo, em seguida, retirado o sobrenadante. Este procedimento foi realizado por duas vezes. Depois, adicionou-se 50 μL ACN 100% no gel e foi realizado a sonicação a 40°C por 10 minutos e depois vortex por 2 minutos e spin sendo em seguida retirado o sobrenadante. Este procedimento foi realizado por duas vezes. As amostras foram armazenadas a -70°C para depois serem enviadas para o Laboratório da Universidade Federal do Paraná para a análise espectrométrica sob responsabilidade do pesquisador Doutor Humberto Ramos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos estão apresentados no artigo 1, que consta na parte de anexos:

Annex A Article 1: Identification of proteases produced by entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. strain CG432 previously activated in coffee berry borer alive (*Hypothenemus hampei*)

REFERÊNCIAS

ABBOT, A. News briefing: A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis. **Nature**, London, v.402, p.715-720, 1999.

AEBERSOLD, R.; GOODLET, D.R. Mass spectrometry in proteomics. **Chemical Reviews**, Washington ,v.101, n. 2, p.269-295, 2001.

ALVES, B.S. **Controle microbiano de Insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ,1998.

ANDERSEN, S.O. Characteristic properties of proteins from preecdysial cuticle of larvae and pupae of the mealworm *Tenebrio molitor*. **Insect. Biochem. Mol. Biol.** ,v.32, p.1077-1087, 2002.

ARBOLEDA, J.W.; DELGADO, F.B.; VALENCIA, A.J. Efecto de la toxina beauvericina sobre *Hypothenemus hampei*. **Manejo Integrado de Plagas y Agroecologia**, v.68, p. 71-76, 2003.

BATKO, A.; WEISER, J. On the taxonomic position of the fungus discovered by Strong, Wells, and Apple: *Strongwellsea castrans* gen. Et sp. nov. (Phycomycetes; Entomophthoraceae). **J. Invertebr. Pathol.**, v.7, p.455-463, 1965.

BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, GG. Purification and Properties of an Extracellular Protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1679-1684, 1987.

BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, GG. Identification of *Beauveria bassiana* Extracellular Protease as a Virulence Factor in Pathogenicity toward the Migratory Grasshopper, *Melanoplus sanguinipes*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.56, p.362-370, 1990.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C.; LATGE, J.P. Nonspecific factors involved in attachment of entomopathogenic Deuteromycetes to host insect cuticle. **Applied Environmental Pathology**, v.54, p. 1795-1805, 1988.

BOUCIAS, D.G.; PENDLAND, J.C. Attachment of mycopathogens to cuticle: the initial event of mycoses in arthropod hosts. In: Cole, G.T., Hoch, H.C.(Eds). The fungal Spore and Disease Initiation in Plants and Animals. **Plenum Press**, New York, p.101-127, 1991.

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

BUTT, T.M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. Fungal biological control agents: progress, problems and potential. In: BUTT, T. M.; JACKSON, C.; MAGAN, N. **Fungi as biocontrol agents**. Wallingford, Oxford, USA: CABI Publishing, 2001.

CABWEB.INTERNET,2006.Disponível:<Pest.cabweb.org/archive/pestofmonth/pest9710.htm> Acesso em: 30 jul. 2006.

CAGNEY, G.; AMIRI, S.; PREMAWARADENA, T.; LINDO, M.; EMILI, A. In silico proteome analysis to facilitate proteomics experiments using mass spectrometry. **Proteome Science**, v.1, p.1-15, 2003.

CAHILL, D.J.; NORDHOFF, E.; O'BRIEN, J.; KLOSE, J.; EICKHOFF, H.; LEHRACH, H. Bridging genomics and proteomics. In: PENNINGTON, S.R; DUNN, M.J (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. BIOS Scientific Publishers Limited, 2001. p.1-22.

CHAPMAN, R.J. Integument. In: **The insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge University Press, 1998, p.415-440.

CHAKRABARTI, S.K.; MATSUMURA, N.; RANU, R.S. Purification and characterization of an extracellular alkaline serine protease from *Aspergillus terreus*(IJIRA 6.2). **Current microbiology**, v.40, p. 239-244, 2000.

CLARKSON, J.M.; CHARNLEY, A.K. New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. **Trends in Microbiology**, v.4, n.5, p.197-203, May, 1996.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II; method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.121, p.404-427, 1964.

DRESNER, E. The toxic effect of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. on insects. **Journal New York Entomology Societ**, v.58, n.4, p.269-278, 1950.

DUNN, M.J.; GÖRG, A. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis for proteome analysis. In: PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. BIOS Scientific Publishers Limited, 2001.

FERSHT, A. The three-dimensional structure of enzymes. In: FERSHT, A. **Enzyme structure and mechanism**. W. H. Freeman Company, 1977, p.3-32.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. **Annual Revision Entomology**, v. 23, p. 409-442, 1978.

FURLONG, M.J.; PELL, J.K. Horizontal Transmission of entomopathogenic fungi by the diamondback moth. **Biological Control**, v.22, p.288-299, 2001.

GOETTEL, M. S.; JOHNSON, D. L.; INGLIS, G. D. The role of fungi in the control of grasshoppers. **Canadian Journal of Botany**, v.73, p.71-75, 1995.

GONZÁLEZ-GARCIA, M.T., FLÓREZ F. J.P.; BUSTILLO A.E. Desarrollo de un bioensayo para evaluar la patogenicidad de *Beauveria bassiana* sobre *Hypothenemus hampei*. **Cenicafé**, v.44, p. 93-102, 1993.

HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, p. 422-427, 1972.

HEGEDUS, D.D.; BIDOCHKA, M.J.; MIRANPURI, G.S.; KHACHATOURIANS, G.G. A comparison of the virulence, stability, and cell-wall-surface characteristics of three spore types produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.36, p. 785-789, 1992.

ITO, E. T.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D.T.; PINOTTI, M.H.P.; NEVES, P.M.O.J. Production of extracellular proteases by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Brazilian Journal of Biology and Biotechnology**, v.50, n.2, p.217-223, 2007.

JEFFS, L.B.; KHACHATOURIANS, G.G. Toxic properties of *Beauveria bassiana* pigments on erythrocyte membranes. **Toxicon**, v.35, n.8, p. 1351-1356, 1997.

JIMÉNEZ-GÓMES, J. Patogenicidad de diferentes aislamientos de *Beauveria bassiana* a la broca del café. **Cenicafé** v.43, p.84-98, 1992.

KERSHAW, M.J., TALBOT, N.J. Hydrophobins and repellents: proteins with fundamental roles in fungal morphogenesis. **Fungal Genet. Biol.** v.23, p.18-33, 1998.

KHACHATOURIANS, G.G. Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. In _____: **The Mycota VI: human and animal relationships**. Howard/Miller (Eds). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996.

KLOSE, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. **Humangenetik**, v.26, p.231-243, 1975.

KÖPKE, A. **Proteomics – a new drug discovery tool**. Disponível em: <<http://www.wita-proteomics.com>> Acesso em: 10 nov. 2007.

LA ROSA W.; ALATORRE R.; TRUJILLO J.; BARRERA J. F. Virulence of *Beauveria bassiana* (Deuteromycetes) strains against the coffee berry borer (Coleoptera: Scolytidae). **J. Econ. Entomol.** v.40, p.1534-1538, 1997.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; BERKE, N.S.; MITCHELL, R. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. Sarvier, São Paulo, 1991.

LAEMMLI, U.K. SDS-PAGE. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LOPEZ, M.F. Proteome analysis I. Gene products are where the biological action is. **J. Chromatography B**, v.722, p.191–202, 1999.

MACLEOD, D. M. Investigations on the genera *Beauveria* Vuill. and *Tritirachium* Limber. **Canadian Journal Botany**, v.32, p. 818-890, 1954.

MANN, M.; HENDRICKSON R. C.; PANDEY, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. **Annu Rev Biochem.**, v.70, p.437-473, 2001.

MOALLAEI, H.; ZAINI, F.; LARCHER, G.; BEUCHER, B. Partial purification and characterization of a 37kDa extracellular proteinase from *Trichophyton vanbreuseghemii*. **Mycopathologia**, v.161, 369-375, 2006.

MOLLOY, M.P.; WITZMANN F.A. Proteomics: Technologies and applications. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, v.1, p. 23-29, 2002.

NIELSEN, B.L., BROWN, L. R. The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.141, n.2, 311-315, Sep., 1984.

O'FARREL, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. **J. Biol. Chem.**, v.250, p.4007-4021, 1975.

PANDEY, A.; MANN, M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature**, v.405, p.837-846, 2000.

PATTON, W.F. Detection technologies in proteome analysis. **J. Chromatography B**, v.771, p.3-31, 2002.

QUADRONI, M.; JAMES, P. Enhancing high-throughput proteome analysis: the impact of stable isotope labeling. In: PENNINGTON, S.R; DUNN, M.J (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. BIOS Scientific Publishers Limited, 2001. p.151-169.

SHARMA, S.; AGARWAL, G.P.; TAJAK, R. C. Pathophysiological alterations caused in *Heliothis armigera* by toxic metabolites of *B. bassiana* (Bals) Vuill. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.32, n. 3, p. 168-171, 1994.

SHEVCHENKO, A.; JENSEN, O.N.; PODTELEJNIKOV, A.V.; SAGLIOCCO, F.; WILM, M.; VORM, O.; MORTENSEN, P.; SHEVCHENKO, A.; BOUCHERIE, H.; MANN, M. Linking genome and proteome by mass spectrometry: Large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. **Proc. Natl. Acad. Sci.**v.93, p.14440-14445, 1996.

SOPER, R.S. The genus *Massospora entomopathogenic* for cicadas. Part 1 Taxonomy of the genus. **Mycotaxon**, v.1, p.13-40, 1974.

St LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Cuticle-Degrading Enzymes of Entomopathogenic Fungi: synthesis in culture on cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology** ,v.48, p. 85-95, 1986 .

St LEGER, R.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Caracterização of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives Biochemistry Biophysites**, v.253, p. 221-232, 1987a.

St LEGER, R.J.; COOPER, R.M.; CHARNLEY, A.K. Distribution of chymoelastase and trypsin-like enzymes in five species of entomopathogenic deuteromycetes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.258, p. 121-131, 1987b.

St LEGER, R.J.; DURRANDS, P.K.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.52, p. 285-293, 1988.

St LEGER, R.J.; BUTT, T. M.; STAPLES, R. C.; ROBERTS, D.W. Synthesis of proteins including a cuticle-degrading protease during differentiation of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v.13, p. 253-262, 1989.

St LEGER, R.J.; GOETTEL, M.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R. C. Penetration events during infection of host cuticle by *Metarhizium anisopliae*. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 58, p. 168-179, 1991.

St LEGER, R.J. The role of cuticle-degrading proteases in fungal pathogens of insects. **Canadian Journal of Botany** v.73 suppl.1 S1119-S1125, 1995a.

St LEGER, R.J.; JOSHI, L.; BIDOCHKA, M.J.; RIZZO, N.W.; ROBERTS, D.W. Characterization and ultrastructural localization of chitinases from *Metarhizium anisopliae*, *M. flavoviride* and *Beauveria bassiana* during fungal invasion of host (*Manduca sexta*) cuticle. **Applied and Environmental Microbiology**, v.62, p.907-912, 1996.

St LEGER, R.J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D.W. Ambient pH is a major determinant in the expression of cuticle-degrading enzymes and hydrophobin by *Metarhizium anisopliae*. **Appl. Environ. Microbiol.** v.64, p.709-713, 1998.

TANADA, Y. Fungal infections. In: **Insect Pathology**. Academic Press, p.318-387, 1993.

TIAGO, P. V.; FUNGARO, M. H. P.; FARIA, M. F.; FURLANETO, M. C. Effects of double-stranded RNA in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Paecilomyces fumosoroseus* on protease activities, conidia production, and virulence. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p. 335-339, 2004.

THOMAS, K.C.; KHACHATOURIAN, G.G.; INGLEDEW, W.M. Production and properties of *Beauveria bassiana* conidia cultivated in submerged culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 33, p.12-20, 1987.

URTZ, B. E.; RICE, W. C. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v. 104, p. 180-186, 2000.

WANG, R.B.; YANG, J.K.; LIN, C.; ZHANG, Y.; ZHANG, K.Q. Purification and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Dactylella shizishana*. **Applied microbiology**, v.42, p.589-594, 2006.

YANG, J.Z.; BASTIAN, K.C.; MOORE, R.D.; STOBAUGH, J.F.; BORCHARDT, R.T. Quantitative analysis of a model opioid peptide and its cyclic prodrugs in rat plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography B**, v.780, p.269-281, 2002.

ANEXO

Annex A

Article 1: Identification of proteases produced by entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. strain CG432 previously activated in coffee berry borer alive (*Hypothenemus hampei*)

Identification of proteases produced by entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill cepa CG432 previously activated in coffee berry borer alive (*Hypothenemus hampei*)

Oliveira, Jakeliny A. Y.¹; Ito, Eliana T. ¹; Cruz, Michele C. B.¹; Sugahara, Vanessa H.¹; Ramos Humberto J.²; Pereira, Luiz F. P.²; Pinto, Jurandir P.³; Trevisan, Dalva³; Varéa-Pereira, Geni ^{4*}

¹State University of Londrina Biotechnology Graduate Program - students; ²IAPAR-Embrapa ³Chemistry Department; ⁴Biochemistry and Biotechnology Department; *Corresponding author gpvarea@uel.br State University of Londrina Exact Sciences Center – PR, Zip code 86051-990, PO Box 6001, phone (43) 33714270.

RESUMO

Conídios de fungos entomopatogênicos atravessam o exoesqueleto do inseto pela ação mecânica do tubo germinativo e produção de múltiplas isoformas de proteases, quitinases e lipases em resposta à composição da cutícula do inseto. Desta forma o objetivo deste trabalho foi extrair, purificar e caracterizar a estrutura de proteases produzidas em cultivo submerso por *Beauveria Bassiana* CG432 previamente ativada em adultos vivos de broca-do-café (*Hypothenemus hampei*). Uma suspensão contendo 10^8 conídios ativados/mL foi inoculada a 1% em meio de cultura líquido constituído por 1% glucose, 0,5% de extrato de levedura, 0,16% NaNO_3 , 0,11% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% KCl, 0,06% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 0,04% KH_2PO_4 a 28°C, 150 rpm por 3 dias. O extrato livre de células (ELC) obtido da centrifugação a 8000 g por 20 minutos foi fracionado e concentrado por ultrafiltração em membrana de porosidade controlada 100 kDa e 3 kDa, respectivamente. A cromatografia de gel filtração em Sephadex G-100 separou um pico proteico (Pico II) contendo 56% de resíduos do aminoácido ácido aspártico por HPLC em coluna de fase reversa ODS-C18, com atividade específica 43 vezes superior ao extrato livre de células sobre soro albumina bovina, atividade de protease tipo-subtilisina e uma única banda proteica revelada por nitrato de prata e Coomassie Brilliant Blue em zimograma sobre gelatina por eletroforese PAGE em condições nativas. A homogeneidade do Pico II foi confirmada pela revelação de uma única banda na determinação do pH isoelétrico igual a 4,5, porém a determinação da massa molecular separou 2 bandas de 23 e 26 kDa por eletroforese PAGE-2D. As proteases foram caracterizadas como serino proteases com resíduo cisteína importante para a atividade, pois foram inibidas por fluoreto fenil-metil-sufonil e ácido *p*-cloromercúriobenzóico. As proteases do Pico II apresentaram K_m 4×10^{-4} M sobre substrato tipo-subtilisina.

Palavras-chave: *Beauveria bassiana*, proteases, purificação, caracterização estrutural

ABSTRACT

Conidia of entomopathogenic fungi can penetrate the insect exoskeleton both by mechanic action of the germinative tube and by production of multiple proteases, chitinases, and lipases in response to the composition of the insect cuticle. Therefore the purpose of this work was to purify and characterize the structure of the proteases produced by the fungus *Beauveria bassiana* CG432, previously activated in adults of coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) grown under submerged culture conditions . A suspension containing 10^8 activated conidia/mL was inoculated to a 1% culture medium composed by 1% glucose, 0.5% yeast extract, 0.16% NaNO_3 , 0.11% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% KCl, 0.06% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.04% KH_2PO_4 , at 28°C and 150 rpm for 3 days. The cell-free extract, obtained by centrifugation at $8000g$ for 20 minutes was fractionated and concentrated by ultrafiltration using controlled porosity membranes of 100 kDa and 3 kDa, respectively. Gel filtration chromatography on Sephadex G-100 isolated one protein peak (peak II), which contained 56% of residues of the aminoacid aspartic acid, characterized by HPLC using an ODS-C18 reverse phase column. The peak protein showed specific activity 43 times superior when compared to the free-cell extract in bovine serum albumin, subtilisin-like protease activity, and a single protein band reveled by Brilliant Coomassie Blue on a gelatin zimogram PAGE electrophoresis, by native conditions. The homogeneity of peak II was confirmed by revelation of a single band during determination of the isoelectric pH 4.5, but molecular mass determination by PAGE-2D electrophoresis showed 2 bands of 23 and 26 kDa. Proteases were characterized as serine proteases with cysteine residues important to activity, since they had been inhibited by phenylmethylsulphonyl fluoride and *p*-chlormercuribenzoic acid. Peak II proteases showed K_m of 4×10^{-4} M on subtilisin-like substrate.

Keywords: *Beauveria bassiana*, proteases, purification, structural characterization

1 INTRODUÇÃO

Fungos entomopatogênicos causam doença e morte natural de insetos e por isto são considerados importantes agentes de proteção das plantas contra insetos-praga e apresentam grande potencial de utilização no controle biológico de interesse comercial (ALVES, 1998).

A infecção dos insetos ocorre por via tegumentar através da ação conjunta da força mecânica exercida pelo crescimento do tubo germinativo do fungo e a produção de enzimas hidrolíticas que degradam os polímeros estruturais da sua cutícula. Esta é revestida por lipídeos, formada por um arcabouço constituído por 55 a 80% de proteínas (HEPBURN, 1985; NEVILLE, 1975) de natureza hidrofílica na cutícula mole, mais interna e hidrofóbica na cutícula dura mais externa, envolvendo microfibrilas de quitina, com cerca de 2,5 a 3,0 μ m de diâmetro, que perfazem de 20-50% do peso seco da cutícula (CHAPMAN, 1998).

Proteases produzidas pelo fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* foram citadas inicialmente como toxinas produzidas em cultivo submerso com dose letal (DL_{50}) de 26,1 mg de proteínas por inseto tratado (KUCERA; SAMSINAKOVA, 1968). A seguir a ação de proteases, quitinases e lipases têm sido relacionadas com a degradação da cutícula de insetos a partir do cultivo de *B. bassiana* (GUPTA *et al.*, 1992) e *Metarhizium anisopliae* (St LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1986a), outro deuteromiceto entomopatogênico extensivamente estudado e adotado como sistema modelo comparativo de outros fungos entomopatogênicos. Bidochka e Khachatourians (1990) demonstraram que cepas mutantes deficientes para a produção de proteases apresentaram redução da virulência sobre larvas migratórias (*Melanoplus sanguinipes*).

A influência da natureza de diferentes substratos, adição de cutícula de insetos e outros nutrientes sobre a produção de enzimas degradadoras de cutícula tem elucidado os mecanismos de hidrólise (St LEGER; COOPER; CHARNLEY, 1986b), adsorção (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1994) e regulação de proteases extracelulares responsáveis pela virulência dos fungos entomopatogênicos. Múltiplas isoformas de proteases produzidos por *M. anisopliae* com pH ótimo de 8 a 9,5 e pl entre 9 e 10 tipo-subtilisina (Pr1) e tipo-tripsina (Pr2) foram caracterizadas como serino-proteases (St LEGER; CHARNLEY; COOPER,

1987a), metaloproteases (St LEGER, BIDOCHKA; ROBERTS, 1994) e cisteíno-proteases (COLE; CHARNLEY; COOPER, 1993).

Diferentes cepas de *B. bassiana* também produziram proteases tipo-subtilisina, Pr1Bb (JOSHI; St LEGER; BIDOCHKA, 1995) e tipo-tripsina, BBP (URTZ; RICE, 2000), e as Proteases I e II produzidas em meio de cultura enriquecidos com larvas moídas de *Apis mellífera* e plasma sanguíneo, respectivamente (CHRZARNOWSKA; BANAS; KOLACZKOWSKA, 2001).

A atividade lipolítica e proteolítica foi relacionada com a patogenicidade de *B. bassiana* e *M. anisopliae* sobre insetos de broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) (GIRALDO-CARDOZO *et al*, 2001).

A cepa brasileira de *B. bassiana* CG432, selecionada como maior produtora de conídios e causadora de mortalidade de broca-do-café (NEVES; HIROSE, 2005) produziu proteases extracelulares em menor tempo de cultivos submersos, quando previamente ativadas em insetos vivos de broca-do-café (ITO *et al.*, 2007).

Considerando que a multiplicidade das enzimas degradadoras de cutícula é influenciada pela natureza dos substratos disponíveis para o crescimento e virulência dos fungos entomopatogênicos, foi avaliado a *B. bassiana* como o agente de controle biológico para a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*), um dos inseto-praga das lavouras de café. O objetivo deste trabalho foi extrair, purificar e analisar parâmetros estruturais e cinéticos de proteases produzidas pela cepa brasileira de *B. bassiana* CG432 previamente ativada em insetos vivos de broca-do-café na tentativa de elucidar o preciso papel das proteases relacionada a especificidade no processo de infecção do inseto.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo e ativação do inóculo

A cepa de *B. bassiana* CG432 procedente da EMBRAPA/Cenargen e armazenada no Banco de Entomopatógenos do Departamento de Agronomia da Universidade Estadual de Londrina foi isolada da família Membracidae (Homoptera), na cidade de Natal, estado do Rio Grande do Norte, região Nordeste do Brasil. A ativação do fungo foi realizada conforme descrito por Ito *et al.* (2007). Insetos vivos de broca-do-café, previamente esterilizados em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% foram imersos em suspensão aquosa dos conídios de *B. bassiana* CG432 por 6 segundos, acondicionados em placas de petri e incubados em câmara BOD a 25°C por 10 dias. Após a morte dos insetos os conídios resultantes da colonização foram isolados através de 3 repicagens em meio de cultura sólido contendo 1% de glucose, 0,5% de extrato de levedura, 0,16% de NaNO₃, 0,11% de Na₂HPO₄.7H₂O, 0,1% de KCl, 0,06% de MgSO₄.7H₂O, 0,04% de KH₂PO₄ e 2% de ágar e utilizados para o preparo inóculo contendo 10⁸ conídios ativados por mL de água destilada estéril e 0,02% de Tween 80.

2.2 Obtenção de extratos livres de células (ELC)

Foram realizados 6 cultivos submersos em duplicata a 28°C, 150 rpm com 1% de inóculo contendo 10⁸ conídios recém-ativados/mL em frascos erlenmeyer de 1000 mL contendo 250 mL de meio líquido com a mesma composição utilizada para o isolamento do fungo ativado e controle sem inóculo (ITO *et al.*, 2007). Os cultivos foram interrompidos no terceiro dia através da filtração à vácuo em banho de gelo e centrifugação a 8000 g por 20 minutos. Os sobrenadantes reunidos formaram o ELC e foi utilizado como fonte de proteases.

2.3 Purificação das proteases

As proteínas do ELC foram filtradas e concentradas por ultrafiltração em equipamento Stirred Cell (Amicon) utilizando membranas de porosidade controlada de 100 kDa (PBHK polietersulfona Millipore) e 3 kDa (YM3 celulose regenerada Millipore), respectivamente. O concentrado C_{3kDa} contendo 8 mg de proteínas foi diafiltrado por três vezes com 250 mL de tampão fosfato 5 mM, pH 7 e fracionado por cromatografia de exclusão molecular em gel Sephadex G-100 em coluna de vidro (2 x 104 cm) utilizando como eluente o mesmo tampão da diafiltração e fluxo 18 mL/h. As frações de 3 mL, coletadas a cada 10 minutos, foram monitoradas quanto à presença de proteínas por leitura de absorvância em comprimento de onda 280 nm. Houve separação de três frações protéicas (I, II e III) e as frações do pico II com atividade de proteases foram reunidas e após o volume foi reduzido até 10 mL por liofilização e diálise exaustiva contra água deionizada em membrana de 12 kDa, foram quantificadas quanto ao teor de proteínas pelo método de Bradford (1976) e atividade de proteases sobre soro albumina bovina e substratos específicos de proteases tipo-subtilisina e tipo-tripsina.

2.3.1 Determinação da atividade das proteases

Alíquotas de 500 µL do ELC contendo 100 µg de proteínas e das frações obtidas da purificação foram incubadas a 37°C por 1 hora com 250 µL do tampão glicina-NaOH 5 mM pH 9,5 e 250 µL de soro albumina bovina 5 mg/mL. A reação foi interrompida com 250 µL de ácido tricloroacético 10% e centrifugada a 3000 g por 15 minutos. A concentração de peptídeos solúveis do sobrenadante foi determinada pelo método de Hartree (1972) utilizando equação de regressão ($y=0,00192x + 0,079$ $R^2=0,998$) obtida da curva de calibração construída com soro albumina bovina e absorvância de 650 nm. Uma unidade de atividade proteases (UP) foi definida como µg de peptídeos solúveis liberados pela ação das proteases por mL do ELC nas condições da reação.

2.3.1.2 Especificidade das proteases

Alíquotas de 50 µL do Pico II obtido da cromatografia em gel filtração contendo 10 µg de proteínas foram incubadas com 400 µL de tampão Tris-HCl 15 mM pH 8,5 e 50 µL dos substrato específicos de proteases tipo-subtilisina ou tipo-tripsina Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida e N-Benzoil-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilida 1 mM, respectivamente a 28°C por 30 minutos (TIAGO *et al.*,2004). A reação foi interrompida pela adição de 250 µL de ácido acético 30% e centrifugada a 1250 *g* por 5 minutos. A concentração do cromogênico *p*-nitroanilina do sobrenadante foi determinada por leitura de absorvância em 410 nm e equação de regressão ($y=0,0394 + 0,003x$; $R^2=0,9996$) obtida da curva de calibração construída com 0,1 a 5 µg/L de *p*-nitroanilina. Uma unidade de atividade de protease tipo-subtilisina e tipo-tripsina foi definida como µg de *p*-nitroanilina liberada por mL do Pico II nas condições da reação.

2.3.1.3 Atividade inibidora das proteases

As soluções de inibidores serino-proteases (Fluoreto Fenil-Metil-Sulfonil), metalo proteases (Ácido Etileno Diamino Tetracético), cisteíno-proteases (HgCl₂, *p*-hidroximercuriobenzeno e ácido *p*-cloromercurobenzóico) e aspartato proteases (Ácido Indol Acético) em concentração final de 10 mM na reação, foram pré-incubadas com alíquotas de 50 µL do Pico II e 350 µL de tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,5) antes da adição de ambos substratos específicos de proteases tipo-subtilisina ou tipo-tripsina. Após foram adicionados os substratos específicos de proteases tipo-subtilisina ou tipo-tripsina 1 mM, respectivamente. A reação foi interrompida pela adição de 250 µL de ácido acético 30% e centrifugada a 1250 *g* por 5 minutos. A concentração do cromogênico *p*-nitroanilina do sobrenadante foi determinada por leitura de absorvância em 410 nm e equação de regressão ($y=0,0394 + 0,003x$; $R^2=0,9996$) obtida da curva de calibração construída com 0,1 a 5 µg/L de *p*-nitroanilina. Uma unidade de atividade de protease tipo-subtilisina e tipo-

tripsina foi definida como μg de *p*-nitroanilina liberada por mL do Pico II nas condições da reação.

2.3.1.4 Cinética das proteases

O valor de K_m das proteases do Pico II foi determinado nas mesmas condições descritas no 2.3.1.2 utilizando concentrações de 0,25 a 1,5 mM do substrato de proteases tipo-subtilisina e determinado pelo gráfico de Lineweaver-Burke.

2.3.2 Caracterização de proteínas por eletroforese em gel PAGE nativa

Alíquotas de 50 μL do Pico II obtidos pela cromatografia de exclusão molecular contendo 10 μg de proteínas foram analisadas por eletroforese descontínua em gel de poliacrilamida (PAGE) a 10% em condições nativas em tampão TRIS-HCl 3,78 M pH 8,9 a 100 mV (DAVIS, 1964). As bandas protéicas foram reveladas pela complexação com nitrato de prata (NIELSEN; BROWN, 1984). Zimogramas em gel PAGE nas mesmas condições adicionados de 0,02% de gelatina (Difco) foram revelados por coloração com Coomassie Brilliant Blue R-250.

2.3.3 Análise da composição de aminoácidos da protease

A composição de aminoácidos da protease foi quantificada pela metodologia do Yang *et al.* (2002). Alíquotas de 100 μL do Pico II obtido da cromatografia de exclusão molecular contendo 20 μg de proteínas foi hidrolisada por ácido clorídrico 6 M e aquecimento em mufla a 120°C por 24 horas em ampola de vidro, duplamente lacrada e analisada quanto à composição de aminoácidos por

meio de cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE (Shimadzu modelo CR10), utilizando coluna de fase reversa ODS-C18 (250 x 4,6mm) acoplada a pré-coluna idêntica. A eluição foi realizada em fase móvel constituída por solução acetato de sódio 25 mM e metanol (38:62) cujo pH foi ajustado para 6,8 com ácido acético 5%, a temperatura ambiente, utilizando detector de fluorescência operando em 420 nm para a excitação e 483 nm para emissão (Shimadzu modelo RF135).

Os tempos de retenção obtidos pela análise da amostra foram comparados com os tempos de retenção de soluções-padrão dos aminoácidos e submetidos à derivatização com o 2,3-dicarboxaldeídonaftaleno (NDA) e cianeto de potássio (KCN). A derivatização dos padrões e da amostra foi realizada por aquecimento a 65°C por 25 minutos em microtubos para centrífuga (Eppendorf) utilizando 20 µL das soluções de cada aminoácido isoladamente a 0,4 mg/mL e em mistura de 50 mg/mL, utilizando HCl 0,1 M, 40 µL de tampão borato 50 mM (pH 8,5), 20 µL de KCN 5 mM e 20 µL de NDA. A concentração de aminoácidos da amostra foi determinada através de curvas de calibração correspondente a cada solução de aminoácido padrão e expressa em µg/mL.

2.3.4 Caracterização por eletroforese PAGE-2D

Alíquotas de 100 µL do Pico II com atividade de proteases, contendo 20 µg de proteínas, foram submetidas à isoeletrofocalização e PAGE-2D segundo Dunn e Gorg (2001). Utilizou-se tira de 13 cm de gel de poliacrilamida com gradiente de pH imobilizado 3-10 e foi submetida à isoeletrofocalização em aparelho IPGphor por 4 horas utilizando voltagens crescentes de 500, 1000, 12500 e 14000 a cada hora.

Após a isoeletrofocalização, a tira de gradiente de pH imobilizado foi imersa em 20 mL de solução de tampão de equilíbrio Tris-HCl 50 mmol/L pH 8,8, contendo uréia 6 mol/L, glicerol 30% (p/v), SDS 2% (p/v), solução de azul de bromofenol 0,25% (p/v) e 50 mg de ditioneitol, por 15 minutos. Em seguida foram colocadas no mesmo tampão de equilíbrio, adicionados de 200 mg de iodoacetamida por mais 15 minutos. Logo após foi lavada em tampão de corrida e

colocada em adesão na parte superior do gel. A segunda dimensão SDS-PAGE a 12,5% (Cuba “*Protean II*” Bio-Rad) foi conduzida a 12°C a 15 mA/gel e 30 mA/gel sequencialmente (LAEMMLI, 1970).

2.3.5 Análise Espectrométrica das Proteases

O preparo das amostras para análise por meio de MALDI-ToF foi feito conforme o seguinte protocolo, modificado de WESTERMEIER (2004). Para remoção dos corantes, os fragmentos de géis obtidos da eletroforese PAGE-2D contendo as proteínas foram transferidos para eppendorfs e receberam 30 µL de solução de bicarbonato de amônio 75 mmol/L em etanol 40%. A suspensão foi agitada e deixada em repouso durante 10 minutos. Este procedimento foi repetido até descoloração total do gel, o que exigiu 8 repetições para o fragmento levemente corado e 10 repetições para o fragmento corado mais intensamente.

Os fragmentos de géis foram desidratados com 3 lavagens de 25 µL de acetonitrila (ACN) 100% e em seguida os géis foram secados em dessecador à vácuo por 25 minutos.

Para digestão da enzima os géis foram reidratados com solução contendo tripsina (10 µg/mL) em tampão bicarbonato de amônio 50 mmol/L pH 8,0. A solução com enzima foi aplicada fria (4°C), as amostras permaneceram em banho de gelo por 45 minutos e em seguida foram colocadas em estufa a 37°C por 12 horas.

Após este período iniciou-se a etapa de extração. Foi retirado o sobrenadante e colocado em outro eppendorf. Depois foram adicionados 50 µL de metanol 60% e ácido trifluoroacético (TFA) 1% no gel e realizada a sonicação a 40°C por 10 minutos e depois colocado no agitador (vortex) por 2 minutos e centrifugação a baixa rotação (spin) sendo em seguida retirado o sobrenadante. Este procedimento foi realizado por duas vezes. Em seguida adicionou-se 50 µL de ACN 50% e TFA 1% no gel e realizada a sonicação a 40°C por 10 minutos e depois vortex por 2 minutos e spin, sendo, em seguida, retirado o sobrenadante. Este procedimento foi realizado por duas vezes. Depois, adicionou-se 50 µL ACN 100%

no gel e foi realizado a sonicação a 40°C por 10 minutos e depois vortex por 2 minutos e spin sendo em seguida retirado o sobrenadante. Este procedimento foi realizado por duas vezes. As amostras foram armazenadas a -70°C para depois serem enviadas para o Laboratório da Universidade Federal do Paraná para a análise espectrométrica sob responsabilidade do pesquisador Doutor Humberto Ramos.

3 RESULTADOS

3.1 Purificação das proteases

A cromatografia de gel filtração do concentrado C_{3kDa} (obtido da ultrafiltração) em Sephadex G-100 separou três frações protéicas (I, II e III) sendo que o Pico II (Figura 1) apresentou atividade de proteases sobre soro albumina bovina, apresentando fator de purificação 43 vezes superior ao ELC (Tabela 1). Considerando que as proteases de *B. bassiana* anteriormente caracterizadas, apresentaram massas moleculares em torno de 30 kDa, a ultrafiltração removeu proteínas maiores que 100 kDa (descartadas) e concentrou proteínas com massas moleculares entre 3 e 100 kDa, incluindo as proteases de interesse na membrana 3 kDa (C_{3kDa}), com boa margem de segurança. Além disso, a diafiltração do concentrado C_{3kDa} realizada no mesmo equipamento, removeu metabólitos de baixa massa molecular como uma alternativa á diálise geralmente realizada por períodos de tempo prolongados. A eficiência da ultrafiltração foi confirmada porque a coluna de gel Sephadex G-100, separou além do pico II apenas um pico de proteínas maiores que as proteases (Pico I) e outro pico com proteínas menores (Pico III), que possivelmente foram retiradas pela diálise do Pico II em membranas com exclusão molecular de 12 kDa. Urtz e Rice (2000) utilizaram ultrafiltração em membrana de exclusão 10 kDa anterior a uma única etapa de cromatografia por gel filtração de proteases de *B. bassiana* e obtiveram fator de purificação 48. Pré-tratamento de ELC de *B. bassiana* por fracionamento com 60 a 75% de saturação com sulfato de amônio (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1987) e com acetona a concentração

final de 80% (CHRZANOWSKA; BANAS; KOLACZKOWSKA, 2001) necessitaram de duas etapas cromatográficas para obter purificação de 17,8 e 49 vezes, respectivamente.

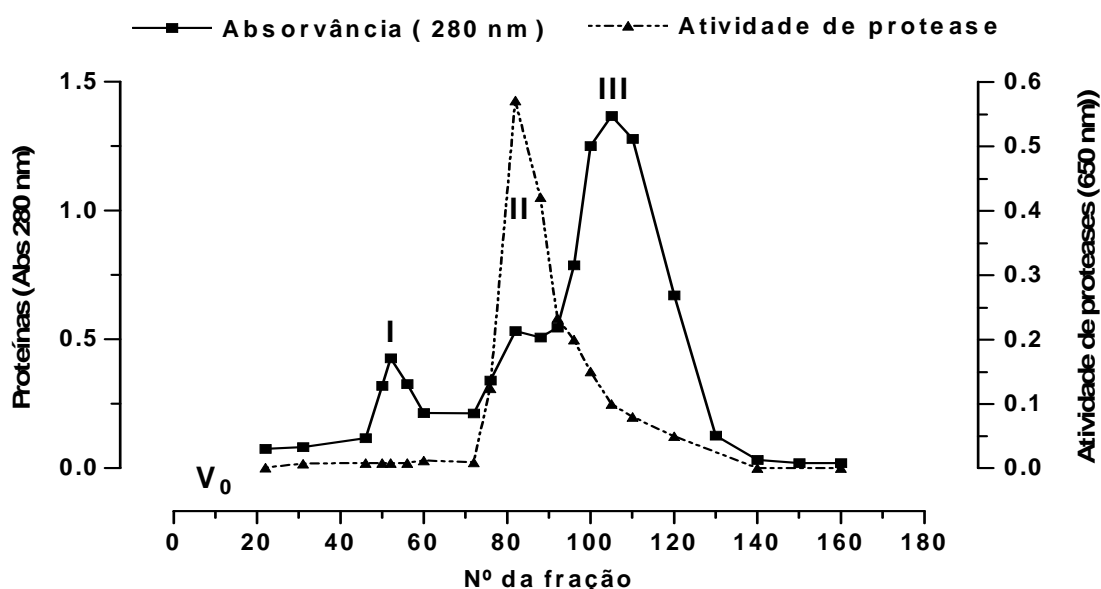


Figura 1 Cromatografia de gel filtração em Sephadex G-100 da fração C_{3kDa} concentrada por ultrafiltração contendo 8 mg de proteínas. Eluição em tampão fosfato 5 mM pH 7,0, fluxo 18 mL/hora, frações de 3 mL. Atividade de protease em tampão TRIS-Glicina pH 9,5 sobre soro albumina bovina. Pico II (frações 76-110). Volume morto (V_0) igual a 60 mL definido em solução de Blue-Dextran 5 mg/mL representado no gráfico (frações 0 a 20).

Tabela 1 Purificação de proteases extracelulares produzidas pelo fungo *B.bassiana* CG432 ativadas em broca-do-café.

Fases	Volume (mL)	Proteína (mg)	Atividade proteases	Rendimento (%)	Atividade específica ^d	Fator de purificação
ELC	1400	163,5	15 ^a	100	0,09	1
Ultrafiltração p/ concentração (C_{3kDa})	5	8,0	9,1 ^a	61	1,1	12
Sephadex (Pico II)	10	2,2	8,5 ^a	57	3,9	43
		2,2	19 ^b	-	8,6	-
		2,2	3,0 ^c	-	1,5	-

^a μ g de peptídeos solúveis liberados da hidrólise do substrato soro albumina bovina

μ g de *p*-nitroanilina cromogênica liberada da hidrólise dos substratos específicos de proteases tipo-subtilisina^b (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida) e tipo-tripsina^c (N-benzoil-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilida)

^dAtividade / mg de proteínas da fração

As proteases do pico II apresentaram maior atividade proteolítica sobre o substrato específico de proteases tipo-subtilisina (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida) com K_m 4×10^{-4} M que atividade específica sobre o substrato específico de proteases tipo-tripsina (N-Benzoil-Phe-Val-Arg-*p*-nitroanilida). As proteases foram caracterizadas como serino-proteases contendo resíduos do aminoácido cisteína importantes para a atividade, pois foram inibidas por pré-incubação com PMSF e pCMB, respectivamente. Além disso, as proteases não foram caracterizadas como metalo e aspartato proteases, pois não foram inibidas por EDTA e AIA (Tabela 2).

Tabela 2 – Atividade residual sobre substrato específico de proteases tipo subtilisina (Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida) das proteases do Pico II pré-incubadas com inibidores de proteases a 10 mM.

Inibidor	Atividade de proteases residual (%)
PMSF	6,25
pCMB	7,14
EDTA	98,13
AIA	100

PMSF (Fluoreto Fenil-Metil-Sulfonil) – Inibidor de serino-proteases
 pCMB (*p*-cloromercuriobenzoato) – Inibidor de cisteíno-proteases
 EDTA (Ácido Etileno Diamino Tetracético) – Inibidor de metalo-proteases
 AIA – (Ácido Indol Acético)- Inibidor de aspartato proteases

A eletroforese PAGE em condições nativas demonstrou aparente homogeneidade do Pico II, pois revelou somente uma banda protéica por coloração com nitrato de prata (Figura 2A) e em zimograma com substrato gelatina revelada com Coomassie Brilliant Blue G-250 (Figura 2B). Tal homogeneidade foi confirmada pela revelação de uma única banda com ponto isoelétrico (pI) igual a 4,5 durante a isoeletrofocalização realizada na primeira dimensão da eletroforese PAGE-2D (Figura 3). Entretanto, e apesar dos resultados evidentes de purificação do Pico II, a determinação da massa molecular, em condições dissociantes, realizada na segunda dimensão da eletroforese PAGE-2D revelou dois fragmentos protéicos (spots) com massas moleculares de 23 e 26 kDa. Estes spots foram enviados para análise espectrométrica ainda em execução na Universidade Federal do Paraná. O

pI ácido, influenciado pela elevada porcentagem de resíduos de ácido aspártico (Tabela 3) é a principal característica estrutural que difere as proteases do Pico II de isoformas de proteinases tipo-subtilisina Pr1 com pI entre 9,3 e 10,2 produzidas por *M. anisopliae*, enquanto que a atividade tipo-subtilisina é a principal característica cinética que as difere das isoformas de proteases tipo-tripsina ácidas (Pr2) com pI entre 4,4 e 4,9 (St LEGER; BIDOCHKA; ROBERTS, 1994).

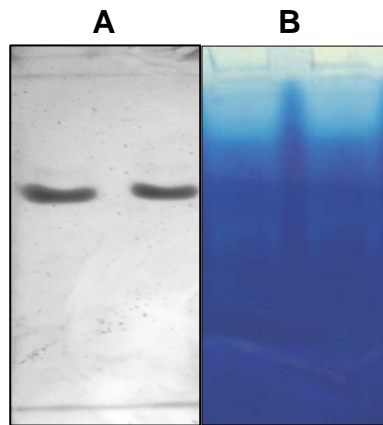


Figura 2 Eletroforese PAGE nativa a 10% de acrilamida da protease purificada de *B. bassiana* do Pico II. A). Revelação de proteínas por precipitação com nitrato de prata. B) Revelação da atividade sobre gelatina com Comassie Blue G-250. Resultados em duas repetições.

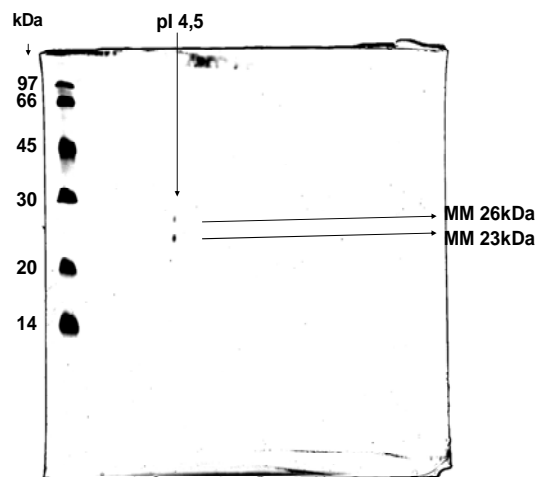


Figura 3 Eletroforese PAGE em condições desnaturantes das proteases do pico II purificada de *B. bassiana*. Primeira dimensão: IPG de 13 cm (Bio-rad) pH 3-10. Segunda dimensão: SDS-PAGE com concentração de acrilamida de 12,5%. Bandas reveladas por Comassie G-250. pH isoeletrico (pI) e Massa Molecular (MM) calculados pelo programa ImageMaster 2D Platinum

Tabela 3 -Tempo de retenção por Cromatografia líquida de alta eficiência e concentração de aminoácidos liberados pela hidrólise de proteases purificadas produzidas pelo fungo *B. bassiana* CG432 ativado em broca-do-café.

Aminoácidos	Tempo retenção (min)	Concentração (µg/mL)	Concentração (%)
Ácido Aspártico	2,7	24,47	56,56
Isoleucina	32,7	4,85	11,21
Glutamina	5,3	3,61	8,34
Cistina	7,5	3,44	7,95
Triptofano	12,0	2,33	5,40
Leucina	35,8	1,09	2,52
Valina	18,4	0,73	1,69
Fenilalanina	23,8	0,67	1,55
Histidina	4,3	0,53	1,23
Alanina	8,9	0,33	0,76
Glicina	6,3	0,31	0,72
Cisteína/Serina/Metionina	4,7	0,29	0,67
Asparagina	4,0	0,27	0,62
Ácido Glutâmico	3,1	0,18	0,41
Treonina/Arginina/Tirosina	7,0	0,16	0,37
Prolina/Lisina	ND	ND	ND

4 DISCUSSÃO

A patogênese fúngica deve ser definida como um processo bioquímico, fisiológico e genético durante a infecção do inseto e formação da doença, uma vez que os fatores de virulência podem ser definidos como um processo envolvido na morte do inseto. As proteases extracelulares de *B. bassiana* têm sido caracterizadas como um dos fatores de virulência apresentando um papel essencial para a sua patogenicidade.

Devido a esses fatores foi investigada a extração, purificação e caracterização das proteases extracelulares de *B. bassiana* previamente reativadas em broca-do-café. Pois, as proteínas são os maiores constituintes da cutícula do inseto (HEPBURN, 1985) e possuem composições cuticulares e suscetibilidades

diferentes para ação proteolítica. As proteases extracelulares produzidas por *B. bassiana* tem um papel importante na hidrólise da cutícula e penetração fúngica na hemocele. Uma vez na hemocele, o fungo prolifera por utilizar os nutrientes solúveis da hemolinfa (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1990).

As proteases caracterizadas neste trabalho apresentaram maior atividade sobre o substrato tipo-subtilisina e foram caracterizadas como serino-proteases e apresentaram pI igual a 4,5 com massas moleculares de 23 e 26 kDa e atividade ótima em pH alcalino. St Leger *et al.* (1988) constatou que a quimoelastase (Pr1) produzida por *Metarhizium anisopliae* é utilizada como um fator de virulência por ocasionar a destruição localizada de proteínas cuticulares, que são capazes de invadir rapidamente o hospedeiro (*Manduca sexta*) com concomitante fornecimento de nutrientes e em 1989 demonstrou que Pr1 é a maior proteína produzida durante a infecção da cutícula do hospedeiro (St LEGER *et al.*, 1989). Vários trabalhos sugerem que Pr1 de *M. anisopliae* realiza um maior papel na penetração cuticular do inseto e subsequente patogenicidade (St LEGER; CHARNLEY; COOPER, 1987a; St LEGER *et al.*, 1988; St LEGER *et al.*, 1989). Porém, *B. bassiana* GK2016 produziu uma protease quando crescidas em meio contendo gelatina como única fonte de carbono e nitrogênio, após os procedimentos de purificação uma banda de proteína foi detectada por PAGE-SDS apresentando massa molecular estimada de 35 kDa, classificada como serino protease baseado na inibição por PMSF e apresentou atividade ótima em pH 8,5, apresentando características similares das proteases estudadas (BIDOCHKA; KHACHATOURIANS, 1987).

Bidochka e Khachatourians (1994) demonstraram que a presença de grupos carboxílicos livres (resíduos alifáticos de aspartil e glutamyl) das proteínas da cutícula formou sítios essenciais para a adsorção eletrostática de proteases básicas produzidas por fungos. Por outro lado, proteases ácidas (pI 4,0 a 5,3) de deteumicetos entomopatogênicos com elevada atividade sobre substratos amídicos tipo-tripsina apresentaram preferência por resíduos hidrofóbicos da cutícula como sítio de ligação primário, incluindo a protease tipo-subtilisina de *B. bassiana* (Pr1Bb) com pI 7,4, menor que outras subtilisinas, que apresentaram preferência por grupos hidrofóbicos dos resíduos de aminoácido alanina das posições de p2 e p3 (sendo p1 o ponto de clivagem) de diferentes substratos amídicos específicos de proteases tipo-subtilisina (St LEGER; COOPER;

CHARNLEY, 1987b). A adição de 0,5% de alanina inibiu a produção de proteases tipo-subtilisina em meio de cultura contendo cutícula de carrapato (CAMPOS *et al.*, 2005). Estes resultados confirmam a participação das proteases na liberação da alanina como nutriente para crescimento fúngico, uma vez que a presença de aminoácido livre e disponível reduziu a necessidade da produção adicional de proteases. Estudos sobre a regulação do gene Pr1 de *M. anisopliae* confirmaram a hipótese de que o nível da mensagem é controlada por repressão catabólica, tanto para a produção de protease (St LEGER *et al.*, 1992), como para regular o desenvolvimento do apressório (St LEGER *et al.*, 1989), indicando que o nível dos nutrientes coordenam a regulação e a expressão dos produtos dos genes requeridos tanto para o desenvolvimento morfológico como para a degradação da proteína cuticular. Os artigos destacaram que a produção de proteases pode ainda ser influenciada por catabólitos produzidos por outras hidrolases importantes para a ação entomopatogênica.

A seqüência preditiva de aminoácidos a partir do seu DNA codificante (accession number U16305-genebank Sequence Databank) revelou que a protease tipo-subtilisina de *B. bassiana* (Pr1Bb) é sintetizada como um zimogênio de 360 aminoácidos com massa molecular de 37.460 Da, cuja forma ativa apresenta 26.832 Da e resíduos de ácido aspártico, histidina e serina correspondentes ao sítio ativo em homologia a outras subtilisinas (JOSHI; St LEGER; BIDOCHKA, 1995). Sugerindo que a protease caracterizada no trabalho pode ter sido separada por ter sido ligado a uma proteína de regulação. Os autores citam o trabalho de Siezen *et al.* (1991) que demonstraram como pequenas diferenças na seqüência primária podem afetar substancialmente a eficiência proteolítica ao pH ótimo e a estabilidade térmica e oxidativa de proteases tipo-subtilisina.

A estrutura do gene de outra serino-protease degradadora de cutícula produzida por *B. bassiana* (Bassiasin I) compreende 1137 pb (379 aminoácidos) e 3 íntrons com 69, 62 e 68 pb. A comparação da seqüência de aminoácidos deduzida do zimogênio apresentou elevada homologia com as serino-proteases tipo-subtilisina (Pr1) de *M. anisopliae* (64,1%), Pr1Bb de *B. bassiana* (82,1%) e proteinase K de *Tritirachium álbum* (61%), um fungo saprofítico (KIM *et al.*, 1999). A literatura relata ainda a produção de uma protease extracelular tipo-subtilisina pelo basidiomiceto *Pleurotus ostreatus* (PoSI) com massa molecular de 75 kDa mais elevadas que aquelas produzidas pelos deuteromicetos, provavelmente

devido á natureza glicoproteica, porém muito semelhante ás proteases estudadas neste trabalho, pois apresenta atividade tipo-subtilisina em pH alcalino e pI 4,5 (PALMIERI *et al.*, 2001). A consideração de outros autores quanto á influência da natureza dos substratos e catabólitos gerados pela ação concomitante das diferentes enzimas hidrolíticas para a patogênese dos fungos sobre os insetos, sustentam a hipótese que as características parcialmente distintas de proteases produzidas por outros deuteromicetos e até ascomicetos, podem ser resultantes da prévia ativação do fungo *B. bassiana* CG432 altamente virulenta sobre a broca-do-café, recém coletados a campo a partir de grãos de café infestados.

Em adição, espera-se que os resultados obtidos a partir da análise espectrométrica com massas moleculares de 23 e 26 kDa ainda em execução, adicionem mais informações sobre os tipos de proteases que podem ser induzidas pela prévia ativação do fungo entomopatogênico *B. bassiana* CG432 sobre seu hospedeiro . E futuramente compreender o funcionamento e a regulação da expressão dos genes Pr1 das proteases na broca-do-café, pois a proteômica analisa o produto final do genoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, S.B. **Controle microbiano de insetos**. 2.ed. Piracicaba:FEALQ, p.1163 1998.

BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Purification and Properties of an Extracelular Protease produced by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1679-1684, 1987.

BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Protein hydrolysis in grasshopper cuticles by entomopathogenic fungal extracellular proteases. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.56, p. 362-370, 1990.

BIDOCHKA, M.J.; KHACHATOURIANS, G.G. Basic Proteases of Entomopathogenic Fungi Differ in Their Adsorption Properties to Insect Cuticle. **Journal of Invertebrate Pathology**, v.64, p. 26-32, 1994.

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

CAMPOS, R.A.; ARRUDA, W.; BOLDO, J.T; SILVA, M.V.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M.H. *Boophilus microplus* infection by *Beauveria amorpha* and *Beauveria bassiana*: SEM analysis and regulation of subtilisin-like proteases and chitinases. **Curr Microbiol**, v.50, p.257-261, 2005.

CHAPMAN, R.J. Integument. In: _____. **The insects: structure and function**. 4th ed. Cambridge University Press, 1998, p.415-440.

CHRZANOWSKA, J.; BANAS, J.; KOLACZKOWSKA, M. Purification and characterization of *Beauveria bassiana* proteinases. **Acta Biotechnology**, v.21, p. 73-81, 2001.

COLE, S.C.J.; CHARNLEY, A.K.; COOPER, R.M. Purification and partial characterization of a novel trypsin-like cysteine protease from *Metarhizium anisopliae*. **FEMS Microbiology Letters**, v.113, p.189-196, 1993.

DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II; method and application to human serum proteins. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.121, p.404-427, 1964.

DUNN, M.J.; GÖRG, A. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis for proteome analysis. In: PENNINGTON, S.R.; DUNN, M.J (Ed.). **Proteomics from protein sequence to function**. BIOS Scientific Publishers Limited, 2001.

GIRALDO-CARDOZO, E.M.; LOPEZ-F, Y.; DELGADO B., F.; VÉLEZ-A, P.E. Actividad lipolítica y proteolítica de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y su

relación con la patogenicidad sobre *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v.27, p. 61-65, 2001.

GUPTA, S.C.; LEATHERS, T. D.; EL-SAYED, G.N.; IGNOFFO, C.M. Insect Cuticle-Degrading Enzymes from the Entomogenous Fungus *Beauveria bassiana*. **Experimental Mycology**, v.16, p. 132-137, 1992.

HARTREE, E.F. Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v.48, p. 422-427, 1972.

HEPBURN, H.R. **Structure of the Integument**. In Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology (G. A. Kerkut and L.I. Gilbert, Eds.), v.3, p.1-58. Pergamon Oxford, 1985.

ITO, E. T.; VARÉA-PEREIRA, G.; MIYAGUI, D.T.; PINOTTI, M.H.P.; NEVES, P.M.O.J. Production of extracellular proteases by a Brazilian strain of *Beauveria bassiana* reactivated on coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*. **Brazilian Journal of Biology and Biotechnology**, v.50, n.2, p.217-223, 2007.

JOSHI, L.; St LEGER, R.J.; BIDOCHKA, M.J. Cloning of a cuticle-degrading protease from the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. **Microbiology Letters**, v.125, p. 211-218, 1995.

KIM, H.K.; HOE, H.S.; SUH, D.S.; KANG, S.C.; HWANG, C.; KWON, S.T. Gene structure and expression of the gene from *Beauveria bassiana* encoding bassiasin I, an insect cuticle-degrading serine protease. **Biotechnology Letters**, v.21, p.777-783, 1999.

KUCERA, M.; SAMSINAKOVA, A. Toxins of the Entomophagous Fungus *Beauveria bassiana*. **Journal of invertebrate**, v.12, p.316-320, 1968.

LAEMMLI, U.K. SDS-PAGE. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

NEVES, P.M.O.; HIROSE, E. Seleção de isolados de *Beauveria bassiana* para o controle biológico da broca-do-café, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Scolytidae); **Neotropical Entomology**, v.34, p.77-82, 2005.

NEVILLE, A. C. Biology of the arthropod cuticle, p.71-123 Springer-Verlag K.G. Berlin, 1975.

NIELSEN, B.L., BROWN, L. R. The basis for colored silver-protein complex formation in stained polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v.141, n.2, 311-315, Sep., 1984.

PALMIERI, G.; BIANCO, C.; CENNAMO, G.; GIARDINA, P.; MARINO, G.; MONTI, M.; SANNIA, G. Purification, Characterization, and Functional Role of a Novel Extracellular Protease from *Pleurotus ostreatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.6, p.2754-2759, 2001.

SIEZEN, R.J.; VOS, W.M.; LEUNISSEN, J.A.M.; DIJKSTRA, W.D. Homology modeling and protein engineering strategy of subtilases, the family of subtilisin-like serine proteinases. **Prot. Eng.**, v.4, p.719-737, 1991.

St LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. **J. Invertebr. Pathol.** v.48, p.85-95, 1986a.

St LEGER, R. J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: Cuticle Degradation in Vitro by Enzymes from Entomopathogens . **J. Invertebr. Pathol.** v.47, p.167-177, 1986b.

St LEGER, R.J.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Caracterização of cuticle-degrading proteases produced by the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. **Archives Biochemistry Biophysites**, v.253, p.221-232, 1987a.

St LEGER, R.J.; COOPER, R. M; CHARNLEY, A. K. Distribution of Chymoelastase and Trypsin-like Enzymes in Five Species of Entomopathogenic Deuteromycetes. **Archives Biochemistry Biophysites**, v.258, p.123-131, 1987b.

St LEGER, R.J.; DURRANDS, P.K.; CHARNLEY, A. K.; COOPER, R. M. Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. **J. Invertebr. Pathol.** v.52, p.285-293, 1988.

St LEGER, R.J.; BUTT, T.Q.; STAPLES, R.C.; ROBERTS, D.W. Synthesis of Proteins Including a Cuticle-Degrading Protease during Differentiation of the Entomopathogenic Fungus *Metarhizium anisopliae*. **Experimental Mycology**, v.13, p.253-262, 1989.

St LEGER, R.J.; FRANK, D.C.; ROBERTS, D.W.; STAPLES, R.C. Molecular cloning and regulatory analysis of the cuticle-degrading-protease structural gene from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Eur. J. Biochem**, v.204, p.991-1001, 1992.

St LEGER, R.J.; BIDOCHKA, M.J.; ROBERTS, D.W. Isoforms of the Cuticle-Degrading Pr1 Proteinase and Production of a Metalloproteinase by *Metarhizium anisopliae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.313, n.1, p.1-7, 1994.

TIAGO, P.V.; FUNGARO, M.H.P.; FARIA, M.F.; FURLANETO, M.C. Effects of double-stranded RNA in *Metarhizium anisopliae* var. *acridum* and *Paecilomyces fumoroseus* on protease activities, conidia production and virulence. **Canadian Journal of Microbiology**, v.50, p. 335-339, 2004.

URTZ, B.E.; RICE, W.C. Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Beauveria bassiana*. **Mycological Research**, v. 104, p.180-186, 2000.

YANG, J.Z.; BASTIAN, K.C.; MOORE, R.D.; STOBAUGH, J.F.; BORCHARDT, R.T. Quantitative analysis of a model opioid peptide and its cyclic prodrugs in rat plasma using high-performance liquid chromatography with fluorescence and tandem mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography B.**, v.780, p.269-281, 2002.