

ADRIANA MARIA PATARROYO VARGAS

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA INIBIÇÃO
DE PROTEASES INTESTINAIS TRIPSINA-LIKE DE *Anticarsia gemmatalis***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola,
para obtenção do título de *Magister
Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

ADRIANA MARIA PATARROYO VARGAS

**PURIFICAÇÃO PARCIAL E CARACTERIZAÇÃO CINÉTICA DA INIBIÇÃO
DE PROTEASES INTESTINAIS TRIPSINA-LIKE DE *Anticarsia
gemmatalis***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa, como
parte das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica
Agrícola, para obtenção do título de
Magister Scientiae.

APROVADA: 31 de janeiro de 2011

Dr. Anderson Martins Pilon
(Coorientador)

Prof. Luiz Alberto Santana

Prof. Rodrigo Siqueira Batista

Dr. Thiago Rennó dos Mares Guia

Prof^a. Maria Goreti de Almeida Oliveira
(Orientadora)

Ao meu marido Emerson
Ao meu filho Augusto Rafael
Vocês são a essência da minha vida. . .

Ao meu pai, Joaquín Patarrojo

A minha mãe, Marlene Vargas

Minha inspiração!

AGRADECIMENTOS

À Deus por me proporcionar viver esse momento.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular pela oportunidade de engrandecer meus estudos.

Ao BIOAGRO – Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária onde foi realizado o trabalho experimental.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Interações Plantas-Praga – MCT/CNPq/FAPEMIG.

Às minhas irmãs, Bel, Angi e Carol os meus alicerces.

À minha vó, meus sobrinhos Amanda e Luca, meus cunhados Fer e Pedryn e meus sogros, Sra. Neyde e Sr. Aneildo por me compreender e apoiar nos momentos difíceis.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira, minha orientadora, pela confiança depositada em mim e principalmente pelo apoio na certeza de que eu conseguiria chegar até aqui. Sinto-me honrada em ser sua orientada.

À minha amiga e colega de laboratório, Franciny Martins Pilon, pelos incansáveis dias na sala do espectrofotômetro. Você sabe que sem a sua ajuda e companheirismo eu não terminaria essa dissertação. Dedico parte dessa vitória a você! Meu sincero muito obrigada!

À Camila Rocha, minha co-orientadora, pelas sugestões e idéias que enriquecerem esse trabalho e pela ajuda na bancada durante minha gravidez do Augusto!

Ao Anderson Martins Pilon pela disponibilidade, conselhos e orientação.

Aos colegas do Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos do BIOAGRO, em especial ao Eduardo Mendonça e Fabrício Rainha, pelos momentos de descontração e de apoio ao longo desse trabalho.

Ao Luiz Mattos e Fabrício Valente pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao secretário do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica agrícola, Eduardo Monteiro, pela amizade e pela prontidão em ajudar.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para o sucesso desse trabalho. Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Adriana Maria Patarroyo Vargas, filha de Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo e Marlene Isabel Vargas Vilorio, nasceu no dia 12 de março de 1980 em Viçosa, Minas Gerais.

Em outubro de 2002 iniciou o curso de Farmácia na Universidade Federal de Minas Gerais graduando-se em julho de 2006. Em agosto de 2007 obteve a Habilitação em Farmácia Industrial pela mesma universidade.

Em agosto de 2009 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, defendendo dissertação em 31 de janeiro de 2011, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1. A importância da Soja.....	6
2.2. <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)...	7
2.3. Interação planta-inseto.....	10
2.4. Proteases.....	12
2.4.1. Serino-proteases.....	13
2.4.1.1. Tripsinas.....	17
2.5. Inibidores de Proteases.....	20
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivo Geral.....	26
3.2. Objetivos Específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Criação da lagarta da soja.....	27
4.2. Preparo da dieta.....	27
4.3. Extração do intestino e obtenção do extrato protéico.....	28
4.4. Determinação da concentração de proteína e determinação das atividades enzimáticas.....	29
4.5. Purificação enzimática.....	30
4.5.1. Cromatografia de afinidade.....	30
4.6. Eletroforese.....	31

4.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE).....	31
4.7. Caracterização Cinética.....	31
4.7.1. Constante de Michaelis-Menten.....	31
4.7.2. Determinação das constantes de inibição.....	32
4.7.3. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1. Purificação das serino-proteases do extrato solúvel intestinal de <i>A. gemmatalis</i>	35
5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes.	38
5.3. Determinação dos parâmetros cinéticos das serino-proteases tripsina- <i>like</i> purificadas.....	40
5.4. Determinação das constantes de inibição.....	42
6. CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Anticarsia gemmatalis</i> , inseto adulto.	8
Figura 2: Estágio larval de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .	9
Figura 3: Mecanismo catalítico de serino-proteinases.	16
Figura 4: Modelo de Schechter e Berger (1967). Modelo utilizado para descrever a interação de uma protease com o substrato protéico.	18
Figura 5: Estrutura primária do inibidor de soja da família Bowman-Birk.	22
Figura 6: Estrutura do inibidor tipo Kunitz de <i>Delonix regia</i> .	23
Figura 7: Estrutura química da benzamidina, cadeia lateral da Lys, cadeia lateral da Arg e do berenil.	25
Figura 8: Esquema de hidrólise do substrato cromógeno L-BApNA.	30
Figura 9: Perfil cromatográfico do extrato solúvel de <i>Anticarsia gemmatalis</i> em coluna de p-aminobenzamidina agarose.	35
Figura 10: Perfil eletroforético em SDS-PAGE (15%) das serino-proteases solúveis do intestino de <i>Anticarsia gemmatalis</i> .	39
Figura 11: Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise de L-BApNA catalisado pela enzima purificada.	41
Figura 12: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de <i>A. gemmatalis</i> pela benzamidina em presença do substrato L-BApNA.	43
Figura 13: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de <i>A. gemmatalis</i> pelo berenil em presença do substrato L-BApNA.	44
Figura 14: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de <i>A. gemmatalis</i> pelo SKTI em presença do substrato L-BApNA.	44
Figura 15: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de <i>A. gemmatalis</i> pelo SBBI em presença do substrato L-BApNA.	45
Figura 16: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk versus concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas-like purificadas em presença de benzamidina.	48

Figura 17: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk <i>versus</i> concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas- <i>like</i> purificadas em presença de berenil.	48
Figura18: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk <i>versus</i> concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas- <i>like</i> purificadas em presença de SKTI.	49
Figura 19: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk <i>versus</i> concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas- <i>like</i> purificadas em presença de SBBI.	49
Figura 20: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina- <i>like</i> intestinal de <i>A. gemmatalis</i> pela benzamidina em presença do substrato L-BApNA.	50
Figura 21: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina- <i>like</i> intestinal de <i>A. gemmatalis</i> pelo berenil em presença do substrato L-BApNA.	51
Figura 22: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina- <i>like</i> intestinal de <i>A. gemmatalis</i> pelo SKTI em presença do substrato L-BApNA.	51
Figura 23: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina- <i>like</i> intestinal de <i>A. gemmatalis</i> pelo SBBI em presença do substrato L-BApNA.	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimento da purificação em coluna p-aminobenzamidina agarose	37
Tabela 2: Parâmetros cinéticos da hidrólise do substrato L-BApNA por tripsinas	40
Tabela 3: Valores de R^2 para as retas dos gráficos das inclinações do duplo recíproco <i>versus</i> concentração do inibidor	50
Tabela 4: Constante de inibição dos diferentes inibidores de serino-proteases em presença do substrato L-BApNA	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs - absorvância

Arg - arginina

Asp - aspartato

Berenil - 4,4'- diazoamino-bis-benzamidina

BSA - albumina de soro bovino

E - enzima

ES - complexo binário enzima-substrato

EI - complexo enzima-inibidor

I - inibidor

IP - inibidor de protease

K_{cat} - constante catalítica

kDa - kilodalton

K_i - constante de inibição

K_M - constante de Michaelis-Menten

K_{cat}/K_M - constante de especificidade

L-BApNA - benzoil-L-arginina-p-nitroanilida

Lys - lisina

P - produto de reação enzimática

PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida

S - substrato enzimático

SBBI - inibidor de tripsina da soja tipo Bowman-Birk

SDS - dodecil sulfato de sódio

Ser - serina

SKTI - inibidor de tripsina da soja tipo Kunitz

Tris - Tris (hidroximetil) amino metano

V - velocidade

$V_{\text{máx}}$ - velocidade máxima

RESUMO

PATARROYO VARGAS, Adriana Maria, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2011. **Purificação parcial e caracterização cinética da inibição de proteases intestinais tripsina-like de *Anticarsia gemmatalis*.** Orientadora: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Coorientadores: Anderson Martins Pilon, Camila Rocha da Silva e Joel Antônio de Oliveira.

A *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera), conhecida como lagarta da soja, é considerada a principal praga desta cultura, causando enormes prejuízos devido ao ataque herbívoro. Por causa da importância das proteases digestivas na fisiologia das larvas, o estudo de inibidores de proteases como agentes de controle de pragas tem recebido atenção contínua. A redução da atividade proteolítica através da ingestão de inibidores de proteases compromete a digestão e reflete em efeitos não apenas no crescimento e no desenvolvimento das larvas, mas também na fertilidade e fecundidade do adulto. Para utilizar a estratégia de controle via inibição das enzimas digestivas é necessário o esclarecimento sob o ponto de vista estrutura/função dessas macromoléculas. Uma forma de abordar esse aspecto implica no conhecimento sobre a cinética enzimática, assim como a caracterização da cinética de inibição destas proteases, o que permite uma melhor compreensão dos centros ativos e dos mecanismos de ação da enzima. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo estudar a cinética de inibição das serino-proteases intestinais de *A. gemmatalis* utilizando diferentes inibidores de proteases sintéticos e protéicos para identificar um potente inibidor a ser utilizado no processo de defesa de plantas de soja a *A. gemmatalis*. Para isso, um extrato solúvel do intestino de larvas de *A. gemmatalis* foi submetido à cromatografia em coluna de

afinidade p-aminobenzamidina agarose e a fração eluída foi submetida à eletroforese. Foram observadas a presença de duas bandas com massas moleculares aproximadas de 35kDa e 66kDa. Na caracterização cinética o valor de K_M para o substrato L-BApNA foi de 0,503mM, $V_{m\acute{a}x}$ foi 46,650nM.s⁻¹, $V_{m\acute{a}x}/[E]$ foi 9,256nM.s⁻¹.mg⁻¹.L e $V_{m\acute{a}x}/[E]/K_M$ foi de 18,402nM. s⁻¹.mg⁻¹.L.mM⁻¹. No estudo de inibição os inibidores benzamidina, berenil, SKTI e SBBI obtiveram K_i de 11,2μM, 32,4μM, 0,25nM e 1,4nM, respectivamente, todos calculados pelo método de Dixon. Para caracterizar o tipo de inibição foi utilizado o gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk e o gráfico das inclinações de Lineweaver-Burk *versus* a concentração do inibidor. Para os quatro inibidores testados a inibição foi caracterizada como competitiva linear na faixa de concentração utilizada. Os valores de K_i determinados mostraram que o inibidor SKTI foi o que melhor inibiu a atividade tripsina-*like* das serino-proteases purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis* tornando-se um alvo promissor de estudo para a produção de inibidores peptídeo miméticos.

ABSTRACT

PATARROYO VARGAS, Adriana Maria, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2011. **Partial purification and kinetic characterization of inhibition of gut trypsin-like proteases from *Anticarsia gemmatalis*.** Advisor: Maria Goreti de Almeida Oliveira. Co-Advisors: Anderson Martins Pilon, Camila Rocha da Silva and Joel Antônio de Oliveira.

Anticarsia gemmatalis (Lepidoptera), the velvetbean caterpillar, is considered the main pest of soybean culture, causing important yield losses due to herbivorous attack. As the digestive proteases play fundamental roles in the larvae physiology, the study of protease inhibitors as agents for pest control is receiving continuous attention. The decrease in proteolytic activity due to the ingestion of proteases inhibitors impairs the digestion with consequences not only to the larvae growth and development but also to the adult fertility and fecundity. To use the control strategy via digestive enzymes it's necessary to study the structure/function of these macromolecules. Enzyme kinetics, as well as the characterization of the kinetics of inhibition of these proteases would offer a better comprehension of active centers and the mechanisms of action of these enzymes. In this context, this work aimed to study the kinetics of inhibition of *A. gemmatalis* gut serine proteases using different synthetic and protein inhibitors and to identify a potent inhibitor to be used in the defense process of the soybean plants against *A. gemmatalis*. For this purpose, soluble extract from the gut of *A. gemmatalis* larvae was submitted to affinity chromatography in p-aminobenzamidine agarose and the eluted fraction was submitted to electrophoresis. The presence of two bands with approximate molecular mass of 35kDa and 66kDa was observed. In the kinetics characterization the K_M value for the substrate L-BApNA was of

0,503mM, V_{max} was 46,650nM.s⁻¹, $V_{max}/[E]$ was 9,256nM.s⁻¹.mg⁻¹.L and $V_{max}/[E]/K_M$ was 18,402nM. s⁻¹.mg⁻¹.L. mM⁻¹. In the inhibition study the inhibitors benzamidine, berenil, SKTI and SBBI obtained K_i of 11,2µM, 32,4µM, 0,25nM and 1,4nM, respectively, all calculated using Dixon's method. It was used to characterize the inhibition type the double reciprocal plot of Lineweaver-Burk and the graph of the slopes of Lineweaver-Burk *versus* the inhibitor concentration. For the four tested inhibitors the inhibition was characterized as linear competitive in the concentration range used. The determined values of K_i showed that SKTI was the best inhibitor of the activity of trypsin-like of purified serine-proteases from medium gut of *A. gemmatalis* becoming a promising target of study for the production of mimetic peptide inhibitors.

1. INTRODUÇÃO

Os insetos representam um dos mais importantes estresses bióticos da agricultura mundial. São responsáveis por grandes reduções nos rendimentos das safras, apesar do considerável uso de pesticidas químicos (TELANG *et al.*, 2005). Estes não apenas provocam perdas na produtividade diretamente devido ao ataque herbívoro, mas também indiretamente por atuarem como vetores de vários patógenos de plantas (HILDER & BOULTER, 1999). Segundo Lawrence & Koundal (2002), as perdas estimadas em culturas ao redor do mundo, sem o uso de pesticidas ou outras estratégias de controle não-químico, atingem cerca de 70% da produção, representando um prejuízo de 400 bilhões de dólares para o setor agrícola.

A cultura da soja (*Glycine max*) tem grande importância para o cenário econômico nacional, sendo este um dos principais produtos do agronegócio brasileiro, ocupando lugar de destaque na pauta de exportações do país (SÁVIO *et al.*, 2008; IBGE, 2010). O levantamento da safra de 2010/2011 feito em outubro de 2010 pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) prevê uma produção nacional de soja de 68,9 milhões de toneladas (CONAB, 2010). A cultura da soja está sujeita ao ataque de pragas durante todo o seu ciclo e os insetos na fase imatura representam um importante prejuízo, pois afetam tanto a planta quanto a semente, podendo reduzir substancialmente a qualidade de ambas, causando perdas significativas do rendimento da cultura (ANDRADE *et al.*, 2004).

A lagarta da soja, *Anticarsia gemmatilis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), é uma das principais pragas que atacam a soja no Brasil, sendo encontrada em todos os locais de cultivo. Sua capacidade de consumo da

planta aumenta com o desenvolvimento fisiológico. Por ser uma praga desfolhadora pode causar prejuízos à lavoura, mesmo em baixas densidades populacionais, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa das plantas (SILVA *et al.*, 2002). A fase imatura do inseto é generalista e pode se alimentar de diversas espécies de vegetais causando prejuízos em outras culturas, como alfafa, amendoim, arroz, ervilha, feijão, vagem e trigo (BATISTA *et al.*, 2005).

Na tentativa de controlar o ataque de insetos aos cultivares, têm-se buscado novos métodos que não sejam baseados em estratégias agroquímicas. Embora atualmente os métodos de controle de pragas ainda se concentrem basicamente na utilização dessas substâncias, o alto custo para o desenvolvimento de novos produtos cujas formulações devam se adequar às pragas cada vez mais resistentes ao seu uso, as conseqüências ambientais inaceitáveis e a própria pressão de consumidores contra essa prática, tem provocado uma revolução no controle de pragas na agricultura moderna (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002).

A exploração de mecanismos de resistência endógena das plantas ao ataque dos insetos herbívoros é uma tendência, servindo de ferramenta para a aplicação nas estratégias alternativas de controle de pragas (GATEHOUSE, 2002; FERRY *et al.*, 2006; SCOTT *et al.*, 2010). Uma das principais formas de defesa direta das plantas contra o ataque de insetos é mediada pela Via das Lipoxigenases, uma vez que por ela ocorre a produção de ácido jasmônico que ativa os genes que expressam inibidores de proteases (FARMER & RYAN, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2005; SCOTT *et al.*, 2010; SHIVAJI *et al.*, 2010). A ingestão de inibidores de proteases pelos insetos interfere no processo de

digestão de proteínas no intestino médio. Assim sendo, os inibidores são considerados agentes antimetabólicos, pois levam os insetos a uma deficiência protéica. Essa interferência na digestão diminui a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução (SILVA-FILHO & FALCO, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2005). Outra possibilidade de interferência no desenvolvimento dos insetos é a atuação de forma indireta dos inibidores, via um mecanismo de retroalimentação, que levaria a um aumento da produção de proteases digestivas para compensar os baixos níveis de aminoácidos disponíveis. Os aminoácidos seriam deslocados para síntese de mais serino-proteases ou de outras proteases em detrimento de outras proteínas essenciais ao seu crescimento, desenvolvimento e manutenção (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Em contrapartida, como resultado da co-evolução das interações planta-inseto, estes também desenvolveram mecanismos para se defenderem dos efeitos deletérios provocados pelos inibidores de proteases produzidos pelas plantas, através do aumento da síntese enzimática, tanto da classe que está sendo inibida como de enzimas insensíveis aos inibidores, tentando burlar esse efeito inibitório (OLIVEIRA *et al.*, 2005; SRINIVASAN *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2006; PILON, *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2010).

Alguns estudos comprovam que, mesmo com os mecanismos adaptativos do inseto, a utilização de genes que codificam inibidores de enzimas digestivas para a obtenção de plantas resistentes contra o ataque de pragas é uma estratégia promissora (FERRY *et al.*, 2006; SCOTT *et al.*, 2010). Entretanto, o sucesso dessa estratégia será obtido quando a planta for capaz de expressar uma combinação de inibidores que cubra o espectro total de

proteases intestinais (JONGSMA & BOLTER, 1997). Dessa forma, deve ser considerada a fisiologia do inseto, a microbiota associada ao trato digestivo, a bioquímica da sua digestão e o conhecimento do sistema de proteases produzidas pela lagarta (FRANCO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2005; SRINIVASAN *et al.*, 2006; PILON, 2008).

Para utilizar a estratégia de controle via enzimas digestivas é necessário mais estudos sobre a estrutura e função dessas macromoléculas. Uma possibilidade é através do conhecimento sobre a cinética enzimática, assim como a caracterização da cinética de inibição das proteases do inseto será possível ter uma melhor compreensão dos centros ativos e os mecanismos de ação da enzima.

Com base nos conhecimentos gerados podemos propor quais tipos de inibidores protéicos e/ou sintéticos devem ser produzidos pela planta ou aplicados a ela para serem inibidores do complexo sistema de proteases digestivas do inseto. Este conhecimento será de grande importância em médio prazo nos programas de melhoramento genético de plantas que visem à criação de cultivares resistentes a insetos-praga, como é o caso do programa de melhoramento existente na UFV, integrado pelo nosso grupo.

Além dos benefícios econômicos, esses estudos também poderão trazer benefícios ambientais e sociais com o possível desenvolvimento de cultivares resistentes a insetos-praga e com isso levar a redução do uso de agrotóxicos. Além disso, fornecerão base para estudos ecológicos aplicados de como ocorre a resistência de inseto a plantas de interesse. Poderão também demonstrar como as interações planta-herbívoro devem ser consideradas em estratégias para o Manejo Integrado de Pragas.

Nossa expectativa é, portanto, ao decorrer de nossa pesquisa chegar à produção de um peptídeo ou peptídeo mimético, potente inibidor de proteases de insetos, passível de ser patenteado ou então, em colaboração com o grupo de pesquisa “Bioquímica e Genética Molecular Aplicada ao Melhoramento de Plantas” do Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária da Universidade Federal de Viçosa, chegar à produção de um cultivar geneticamente modificado que confira resistência a insetos através da produção de inibidores de proteases específicos. Esta poderia ser uma alternativa ao uso de agrotóxicos contra pragas agrícolas evitando assim a utilização destes pesticidas os quais causam muitos danos ao meio ambiente. Portanto, estes estudos poderão trazer benefícios econômicos, ambientais e sociais com o possível desenvolvimento de cultivares resistentes a insetos-praga evitando ou diminuindo o uso de agrotóxicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A importância da Soja

A cultura da soja (*Glycine max*) tem grande importância para o cenário econômico nacional e para o agronegócio brasileiro, sendo hoje uma das culturas mais plantadas em território brasileiro (SÁVIO *et al.*, 2008). Segundo dados da CONAB, a safra 2010/2011 indica uma produção nacional de soja de 68,9 milhões de toneladas (CONAB, 2010). Estima-se que essa produtividade representará cerca de 30% da produção global de soja (IBGE, 2010). Dada a importância econômica da soja, os problemas ocasionados pelo ataque de pragas são consideráveis face aos prejuízos à produção e à qualidade dos grãos ou sementes (MAGRINI *et al.*, 1999).

A cultura da soja encontra-se sujeita ao ataque de insetos durante quase todo o seu ciclo. Embora esses insetos tenham suas populações reduzidas por predadores, parasitóides e doenças, em níveis dependentes das condições ambientais e do manejo de pragas que se pratica, quando atingem populações elevadas são capazes de causar perdas significativas no rendimento da cultura e necessitam ser controlados (EMBRAPA, 2008).

Apesar dos danos causados na cultura da soja serem, em alguns casos, alarmantes, não se indica a aplicação preventiva de produtos químicos, pois, além do grave problema de poluição ambiental, a aplicação desnecessária eleva os custos da lavoura e contribui para o desequilíbrio populacional dos insetos (EMBRAPA, 2008).

2.2. *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae)

As larvas de *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) (Lepidoptera: Noctuidae), conhecidas como lagarta da soja, são consideradas pragas-chave da sojicultura, sendo economicamente importantes em função das grandes perdas que ocasionam a esta lavoura (GALLO *et al.*, 2002). No Brasil é encontrada em todos os locais de produção de soja e representa um risco à produção e à qualidade dos cultivos exigindo atenção e controle rápido para não causar prejuízos econômicos (PRAÇA *et al.*, 2006; SÁVIO *et al.*, 2008).

A lagarta da soja é uma praga desfolhadora, que mesmo em baixas densidades populacionais pode causar prejuízos à lavoura, que vão desde o desfolhamento até a destruição completa das plantas. O desfolhamento compromete o enchimento das vagens, com conseqüente redução da produção de grãos (SILVA *et al.*, 2002). Os maiores danos ocorrem na fase larval, quando as lagartas inicialmente raspam as folhas da soja, causando prejuízos consideráveis à medida que crescem. Comem tanto o limbo como as nervuras, podendo ocasionar 100% do desfolhamento até atingir seu desenvolvimento máximo, para tornarem-se pupa. Até completar o seu desenvolvimento larval, cada lagarta pode consumir em média 90 cm² de folhas, ou seja, o equivalente a 2,1 vezes a sua própria massa a cada 24 horas (ANDRADE *et al.*, 2004). Embora a preferência alimentar desta lagarta seja a soja, a fase imatura do inseto é generalista e pode se alimentar de outras espécies de vegetais causando prejuízos em outras culturas, como alfafa, amendoim, arroz, ervilha, feijão, vagem e trigo, atacando durante a fase vegetativa e, em alguns casos, no período de floração (BATISTA *et al.*, 2005).

O desenvolvimento da *A. gemmatalis* é do tipo holometábolo (ovo, larva, pupa, adulto) e sua ocorrência varia de novembro a março, atingindo picos populacionais a partir de janeiro (ANDRADE *et al.*, 2004). Seu ciclo biológico é de aproximadamente 30 dias, dependendo das condições ambientais, com a fase adulta durando cerca de 15 dias, com a mariposa medindo cerca de 30 a 38 mm e apresentando coloração variando de cinza a marrom avermelhado ou amarelado, sem dimorfismo sexual. Uma linha transversal escura unindo as pontas das asas é observada quando estas estão completamente estendidas (PRAÇA *et al.*, 2006) (Figura 1).



Figura 1: *Anticarsia gemmatalis*, inseto adulto. Fonte: [http:// www.discoverlife.org/](http://www.discoverlife.org/)

A oviposição ocorre na face inferior das folhas, embora em casos de infestações mais sérias os ovos possam ser encontrados na superfície superior das folhas, pecíolos e até mesmo hastes. O período de incubação geralmente dura de três a cinco dias (BÁRBARA, 2000).

As lagartas recém-eclodidas alimentam-se das folhas e dependendo das condições ambientais podem apresentar de cinco a seis instares larvais,

chegando a medir de 40 a 50 mm de comprimento. São de coloração variável de verde, pardo-avermelhada e em condições de alta população podem ser pretas, com cinco listras brancas longitudinais no corpo (Figura 2).



Figura 2: Estágio larval de *Anticarsia gemmatalis*. Fonte: <http://www.dowagro.com/br/lorsban/pragas/lagartasoja.htm>

No controle desta praga segue-se uma tendência geral de se experimentar métodos alternativos em substituição aos inseticidas químicos desde que apresentem menor custo, sejam mais específicos e menos poluentes. O uso de produtos de amplo espectro, ou seja, não seletivos, além de destruir inimigos naturais, pode selecionar o aparecimento de populações resistentes desta praga, exigindo o uso de produtos mais fortes ou doses elevadas (BATISTA *et al.*, 2005). A utilização de agentes de controle biológico é uma alternativa viável. No Brasil, destaca-se o programa de controle da lagarta da soja desenvolvido pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), que utiliza o Vírus da Poliedrose Nuclear Multicapsídeo *Baculovirus anticarsia* (AgMNPV). Este vírus é altamente específico e atua driblando de maneira eficiente os mecanismos de defesa da lagarta (SÁVIO *et al.*, 2008).

As enzimas digestivas também têm sido selecionadas como alvo nos programas de controle de pragas. Foi demonstrado que sua inibição, na presença de inibidores de proteases, causa retardo no crescimento e diminuição da taxa de sobrevivência dos insetos (PILON *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2009). Os estudos sobre a cinética de inibição enzimática são fontes úteis para correlacionar a estrutura e a função dessas enzimas digestivas e, a partir daí, selecionar um inibidor que melhor atue no controle da praga.

2.3. Interação planta-inseto

Na natureza, insetos e plantas estão constantemente interagindo de forma complexa, nos mais diversos ecossistemas. Esta interação pode ser mutuamente benéfica, quando os insetos propiciam às plantas atividades como polinização e defesa e quando as plantas dão aos insetos abrigo, local para oviposição e alimentação. Entretanto, alguns insetos atacam as plantas e prejudicam seu desenvolvimento.

Desta forma, ao longo da evolução, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de defesa contra os insetos. Suas habilidades em resistir aos ataques envolvem mecanismos de defesa diretos e indiretos, dentre os quais se podem citar a produção de compostos tóxicos aos insetos e a liberação de compostos químicos voláteis que atraem predadores destes insetos. A ativação destas respostas específicas requer o reconhecimento e respostas apropriadas ao ataque inimigo e a maioria destes eventos leva por fim à ativação de genes, por vias de sinalização celular, em poucos minutos (MAFFEI *et al.*, 2007). Em resposta, os insetos desenvolveram estratégias para contornar esses mecanismos de defesa, as quais incluem a metabolização e o seqüestro de

compostos tóxicos, mecanismos de fuga e alteração nos padrões de expressão gênica (SILVA *et al.*, 2001).

Uma das principais formas de defesa direta das plantas contra o ataque de insetos é mediada pela Via das Lipoxigenases, uma vez que por ela ocorre a produção de ácido jasmônico, o qual ativa os genes que expressam inibidores de proteases (FARMER & RYAN, 1992; SCOTT *et al.*, 2010; SHIVAJI *et al.*, 2010). Os inibidores de proteases (IPs) são considerados agentes antimetabólicos por levarem a uma deficiência protéica nos insetos. Sua atividade antimetabólica é atribuída à interferência na digestão protéica que diminui a disponibilidade de aminoácidos, prejudicando a síntese de proteínas necessárias ao crescimento, desenvolvimento e reprodução do inseto (SILVA-FILHO & FALCO, 2000; PILON *et al.*, 2006; PILON *et al.*, 2009; SCOTT *et al.*, 2010). Pesquisas sobre a aplicabilidade de IPs em programas de controle têm sido desenvolvidas visando, principalmente, à expressão dessas proteínas em plantas geneticamente modificadas (HAQ *et al.*, 2004; DUNAEVSKY *et al.*, 2005). Estudos sobre os mecanismos de resistência de insetos em resposta a defesa de plantas levaram a uma valorização da notável diversidade e plasticidade das proteases digestivas de insetos. Além do papel de digerir proteínas dos alimentos essas proteases também desempenham um papel na defesa contra inibidores de proteases de plantas (ZHU-SALZMAN *et al.*, 2008).

Estudos sobre as respostas de insetos a dietas contendo inibidores de protease de plantas têm indicado uma resposta bifásica caracterizada por uma alta expressão inicial de todas as proteases digestivas específicas que precede uma baixa expressão simultânea de proteases sensíveis ao IP e uma alta

expressão de proteases insensíveis ao IP. Ou seja, no trato intestinal do inseto ocorrem mudanças quantitativas que incluem o aumento dos níveis de proteases específicas ou generalistas para alcançar a taxa ideal da digestão de proteínas e também ocorrem respostas qualitativas que incluem a síntese de isoformas de proteases “insensíveis” que não são capazes de ligar-se ao IP ou que tenham a possibilidade de se ligar e degradar o IP (BOWN *et al.*, 2004; SRINIVASAN *et al.*, 2006; ZHU-SALZMAN *et al.*, 2008). Estudos sobre as respostas de insetos frente a inibidores de proteases são necessários para identificar moléculas fundamentais que eventualmente ajudarão na compreensão de eventos complexos de sinalização que são responsáveis pelo acompanhamento e coordenação de absorção de nutrientes e atividade proteolítica intestinal.

Verifica-se, assim, um importante mecanismo de adaptação por parte dos insetos, que deve ser detalhadamente estudado em nível molecular, a fim de se conseguir desenvolver uma estratégia de controle mais eficaz.

2.4. Proteases

As proteases são enzimas responsáveis pela hidrólise de proteínas, agindo em ligações peptídicas. As proteases são classificadas de acordo com a *Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* - IUBMB dentro do grupo 3 (hidrolases), subgrupo 4. Elas também são classificadas com base em três critérios: (1) tipo de reação catalisada, (2) natureza química do sítio catalítico e (3) relação evolutiva de acordo com a estrutura (BARRETT, 1994). Essas enzimas são subdivididas em dois grupos principais, o das exopeptidases e o das endopeptidases, dependendo do seu

sítio de ação. As exopeptidases clivam as ligações peptídicas próximas ao grupamento amino ou carboxi terminal no substrato, enquanto as endopeptidases clivam ligações peptídicas distantes do grupo terminal do substrato. Proteases digestivas de insetos são classificadas com base no grupo funcional presente no sítio ativo em serino, cisteíno, aspartil e metalo-proteases (TERRA & FERREIRA, 1994). As serino-proteases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, enquanto as aspartil-proteases têm duas unidades de ácido aspártico no seu centro catalítico. Cisteíno-proteases apresentam um aminoácido cisteína e as metalo-proteases usam um íon metal no seu mecanismo catalítico (RAO *et al.*, 1998).

Alguns insetos muitas vezes possuem múltiplas proteases digestivas em seu trato intestinal, pertencentes a diferentes ou ao mesmo grupo mecanicista, embora normalmente utilize um tipo principal no seu papel digestivo (LIU *et al.*, 2004; ZHU-SALZMAN *et al.*, 2008; AHN & ZHU-SALZMAN, 2009).

As serino-proteases são a principal classe de enzimas digestivas de proteínas, presentes no intestino médio de muitas espécies de lepidópteras (TERRA & FERREIRA, 1994). Entre as serino-proteases de insetos, tripsina e quimotripsina são as mais estudadas e participam de uma grande diversidade de processos fisiológicos.

2.4.1. Serino-proteases

As serino-proteases são as enzimas mais bem estudadas, tanto em eucariotos quanto em procariotos. Essas enzimas pertencem a uma das maiores famílias gênicas do reino animal, são amplamente distribuídas na natureza e encontradas em todos os reinos de vida celular, bem como em

vários genomas virais, o que indica uma participação vital no metabolismo desses organismos (PAGE & Di CERA, 2008). Em insetos, um estudo com *Helicoverpa armigera* demonstrou a existência de pelo menos 28 genes diferentes pertencentes à família das serino-proteases cujos produtos são expressos no intestino (BOWN *et al.*, 1997). Seus representantes mais conhecidos são as tripsinas e as quimotripsinas que participam de uma grande diversidade de processos fisiológicos que incluem, além da digestão, a ativação de proteínas específicas, como nas cascatas de coagulação, no sistema imune de insetos e de plantas, no desenvolvimento e produção de peptídeos biologicamente ativos, na transdução de sinais, ativação de hormônios e desenvolvimento (GILL *et al.*, 1996; KREM *et al.*, 1999; HERRERO *et al.*, 2005; PAGE & Di CERA, 2008).

As serino-proteases são encontradas nos grupos das exopeptidases, endopeptidases, oligopeptidases e ômega peptidases. Com base em suas similaridades estruturais elas são reagrupadas em 20 famílias, as quais são redivididas em seis clãs de ancestrais comuns. Clãs são divididos em famílias baseados na identidade de seqüência e similaridades (BARRETT & RAWLINGS, 2001). Essas enzimas são reconhecidas por serem inibidas irreversivelmente por 3,4-dicloroisocoumarina (3,4-DCI), L-3-carboxitrans-2,3-epoxipropil-leucilamido (4-guanidina) butano (E-64), diisopropilfluorofosfato (DFP), e tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK).

RAO *et al.* (1998), em um trabalho de revisão, descrevem que as serino-proteases são geralmente ativas em pH neutro e alcalino, com um pH ótimo entre 7,0 e 11,0. Elas têm uma ampla especificidade, incluindo atividades amidásica e esterásica. A massa molecular das serino-proteases em geral está

na faixa de 18 a 35kDa, entretanto, vários organismos possuem serino-proteases com massas moleculares maiores, como é o caso de *Melolontha melolontha* (Coleoptera: Scarabidae), cuja massa molecular, para duas enzimas tripsina-like, é de 56 e 63kDa (WAGNER *et al.*, 2002). O ponto isoelétrico das serino-proteases está geralmente na faixa de pH 4,0 e 6,0.

A função catalítica das serino-proteases é realizada por meio da ação da tríade catalítica (serina₁₉₅ reativa, histidina₅₇ e ácido aspártico₁₀₂, numeração do quimotripsinogênio bovino) enquanto o grau e tipo de especificidade pelo substrato são determinados pela natureza da região do centro ativo. Quando resíduos na tríade catalítica são alterados, separada ou conjuntamente, ocorrem grandes mudanças na velocidade de renovação da enzima, o K_{cat} , conseqüentemente mudando o mecanismo enzimático, com pequeno efeito no K_M . Os resíduos da tríade atuam em perfeito sinergismo e contribuem para uma atividade catalítica otimizada (CARTER & WELLS, 1988; PERONA & CRAIK, 1995).

As serino-proteases geralmente atuam em uma reação de hidrólise de dois passos, onde um intermediário, acilenzima, covalentemente ligado é formado. Esta acilação é seguida pela deacilação, processo no qual ocorre o ataque nucleofílico intermediado pela água, resultando na hidrólise do peptídeo. O ataque nucleofílico do grupamento hidroxila da serina₁₉₅ sobre o átomo de carbono carboxílico da ligação peptídica, catalisada pelo resíduo de histidina, que funciona como uma base leva a formação de um intermediário tetraédrico e um íon imidazólico. O intermediário decompõe-se através da catálise ácido-base pela ação dos grupos polarizados do aspartato e da histidina em um intermediário acilenzima, uma base imidazólica e uma amina.

Este mecanismo implica num estreito contato entre o intermediário tetraédrico e o íon imidazólico, que inibe a liberação do próton para o meio solvente antes da catálise ácido-base, regenerando, assim, a enzima ativa e liberando o produto de degradação (PÓLGAR & HALÁSZ, 1982; CRAIK *et al.*, 1987). Cada etapa ocorre através da formação de um intermediário tetraédrico, cuja estrutura se assemelha a um estado de transição de alta energia em ambas as reações (Figura 3). Este mecanismo é capaz de acelerar a velocidade de hidrólise da ligação peptídica mais de 10^9 vezes em relação à reação não catalisada (PERONA & CRAIK, 1995; HEDSTROM, 2002; PAGE & Di CERA, 2008).

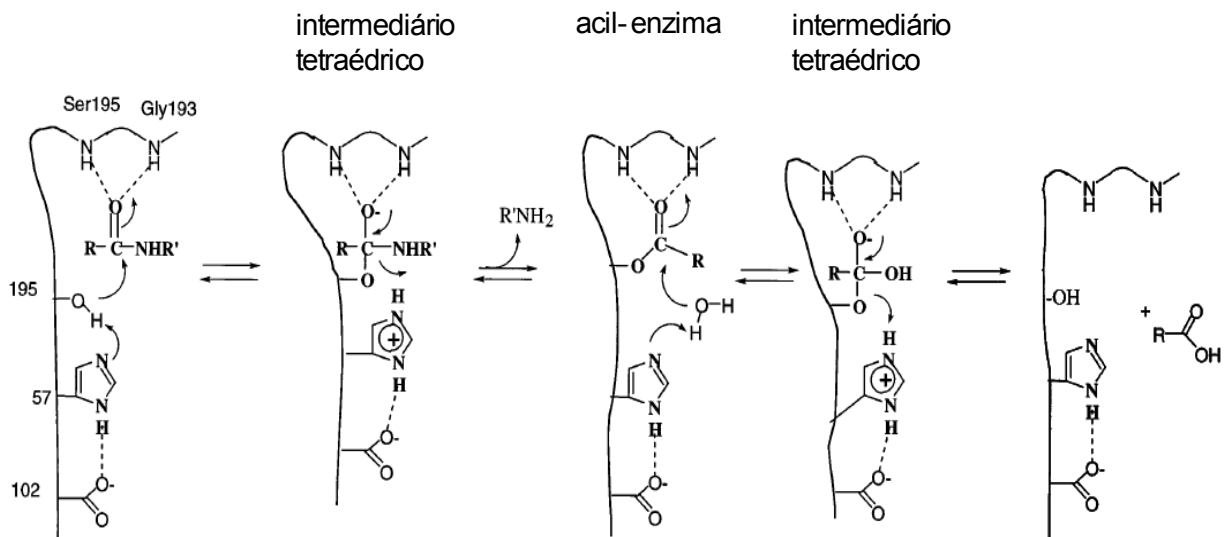


Figura 3: Mecanismo catalítico de serino-proteases. Fonte: (HEDSTROM, 2002).

A relação entre a velocidade de acilação e a deacilação depende do tipo de substrato utilizado. No caso de um substrato amida, a velocidade de acilação é menor do que para a deacilação e, em um substrato éster, essa velocidade pode ser uma a três vezes maior. Portanto, na atividade amidásica a etapa de acilação é lenta e a de deacilação, rápida, enquanto na atividade esterásica a etapa de acilação é rápida e a de deacilação, lenta, sendo a etapa

lenta o passo limitante da hidrólise (INAGAMI, 1972; FASTREZ & FERSHT, 1973).

2.4.1.1. Tripsinas

A tripsina (EC 3.4.21.4) é uma enzima proteolítica pertencente ao grupo das serino-proteases. A família das tripsinas é muito difundida na natureza e possui várias funções, tais como: participação na digestão intestinal, lise celular de organismos invasores, coagulação sanguínea e outros processos fisiológicos. As diversas atividades desta família são o resultado do posicionamento de diferentes resíduos de aminoácidos na estrutura terciária da enzima para a catálise.

Toda serino-protease tripsina-*like* possui preferência por substratos com resíduo básico em P₁, Lys ou Arg. Isso é principalmente causado pela presença de um Asp₁₈₉ carregado negativamente no fundo do bolso S₁ (numeração usada no quimotripsinogênio bovino). A arquitetura do sítio S₁ entre essas proteases é altamente conservada. Uma diferença marcante é encontrada na posição 190, a qual pode ser uma Ser ou Ala, e serve como ponto de identificação para subfamílias. Os resíduos de aminoácidos nos substratos de proteases são numerados da ligação peptídica hidrolisada como P₁, P₂, P₃,...P_n na direção da região N-terminal e P'₁, P'₂, P'₃,...P'_n na direção da região C-terminal, ao passo que os subsítios correspondentes na enzima são numerados como S₁, S₂, S₃,...S_n e S'₁, S'₂, S'₃,...S'_n (LOPES *et al.*, 2004) (Figura 4).

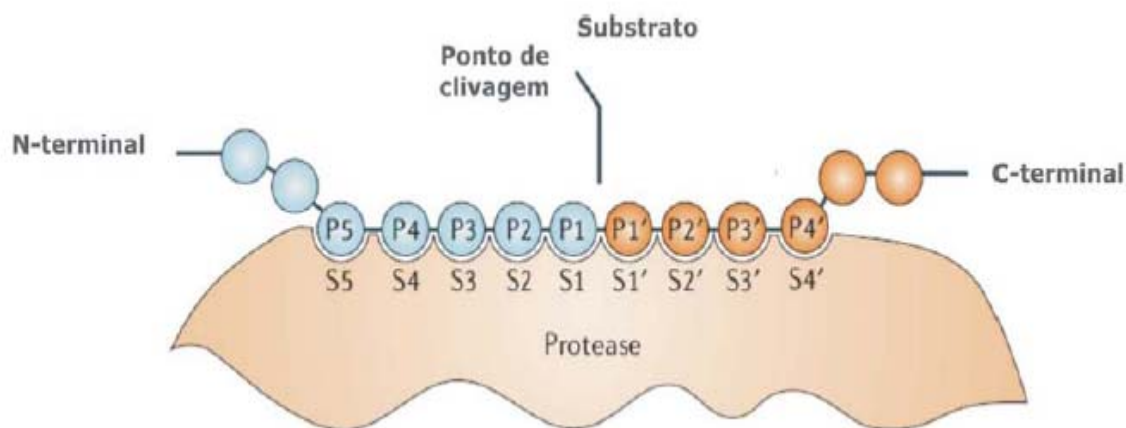


Figura 4: Modelo de Schechter e Berger (1967). Modelo utilizado para descrever a interação de uma protease com o substrato protéico.

As tripsinas da maioria dos insetos, com exceção dos Lepidópteros, hidrolisam mais eficientemente substratos que contenham Arg do que Lys na posição P_1 , ou seja, a especificidade primária das tripsinas de lepidópteros é por substratos que contenham Arg ou Lys enquanto os demais insetos apresentam especificidade por substratos que contenham Lys (LOPES *et al.*, 2006). Os inibidores de proteases produzidos pelas plantas apresentam uma região chamada de sítio reativo, o qual interage com a sua enzima-alvo. A ligação do sítio reativo ocorre no sítio ativo da enzima. O alinhamento das seqüências de vários inibidores de proteases de plantas indicou que os sítios reativos da maioria desses inibidores possuem um resíduo de Lys na posição P_1 (LOPES *et al.*, 2006). A presença de uma Lys na posição P_1 no sítio reativo é uma estratégia de sobrevivência das plantas, pois esses inibidores atuam inibindo as tripsinas da maioria dos insetos que hidrolisam preferencialmente Arg nessa posição.

A atividade digestiva de enzimas tripsina-*like* é encontrada na maioria das espécies de insetos, e sua especificidade mostra-se similar às tripsinas de

vertebrados, além de possuírem diferentes especificidades diante dos inibidores de proteases (TERRA & FERREIRA, 1994; TERRA *et al.*, 1996).

A maioria das tripsinas de insetos possui entre 20 e 30kDa (TERRA & FERREIRA, 1994). Entretanto, tripsinas com maior massa molecular também são encontradas, como o apresentado por Wagner *et al.* (2002) em estudos com proteases tripsina-like de *Melolontha melolontha* (Coleoptera) com massas moleculares de 56 e 63kDa e por Ahmad *et al.* (1980) em estudos com tripsinas com massa de 53kDa de *Spodoptera litura* (Lepidoptera). Tripsinas com menor massa molecular também são relatadas na literatura, como a tripsina do epitélio de *Bombix mori* (Lepidoptera), de 13kDa descrita por Eguchi e Kuriyama (1985) e a tripsina do intestino médio de *Heliothis virescens* (Lepidoptera), de 17kDa descrita por Brito *et al.* (2001).

As tripsinas de insetos não sofrem influência em sua atividade triptica devido a íons cálcio. Em vertebrados, o íon cálcio impede a agregação de moléculas da enzima, protegendo-a da autólise e desnaturação por calor, induzindo uma mudança conformacional em sua estrutura para uma forma mais compacta, a qual é necessária para a atividade catalítica (SIPOS & MERKEL, 1968 e 1970). A autólise de tripsinas de insetos difere tipicamente do que ocorre com as tripsinas de mamíferos. A estabilização das tripsinas de mamíferos depende do cálcio ligar-se ao motivo de ligação em sua estrutura; esse motivo não está presente nas seqüências das tripsinas de insetos. Os sítios autocatalíticos em tripsinas de mamíferos - Lys 61-Ser 62, Arg 117-Val 118 e Lys 145-Ser 146 - não estão conservados nas tripsinas de insetos, que podem possuir outros sítios de clivagem autocatalíticos (LOPES *et al.*, 2006). Contudo, Wagner *et al.* (2002) (*M. melolontha*), Oliveira *et al.* (2005) (*A.*

gemmatalis) e Xavier *et al.* (2005) (*A. gemmatalis*) verificaram que as tripsinas dos insetos estudados sofreram queda na atividade tríptica sobre o substrato L-BApNA na presença de EDTA, resultado que levou os autores a sugerirem que o cálcio talvez possa estar, de alguma forma, agindo nas enzimas desses insetos.

2.5. Inibidores de proteases

Estudos sobre inibidores de proteases presentes em plantas iniciaram-se a partir da década de 40 quando Kneen e Sandstedt (1943) encontraram um inibidor de α -amilase em grãos de vários cereais e, posteriormente, Kunitz (1945) purificou uma proteína termoestável da soja capaz de inibir a tripsina.

Os inibidores das serino-proteases são o tipo mais abundante e amplamente distribuído nas plantas (LAWRENCE & KOUNDAL, 2002). O papel fisiológico desses inibidores nas plantas inclui (i) a regulação das proteinases endógenas durante a dormência das sementes, (ii) a imobilização das proteínas de reserva, (iii) a proteção contra as enzimas proteolíticas de parasitas e insetos e (iv) as proteínas de reserva (HAQ *et al.*, 2004).

São proteínas relativamente pequenas (ou domínios de proteínas, no caso de inibidores multidomínios) de 29 a 190 resíduos de aminoácidos e podem ser agrupadas em famílias diferentes baseando-se na similaridade de sequência, similaridade topológica e mecanismo de ligação à enzima. O mecanismo de ação de um inibidor de protease de planta baseia-se na inibição competitiva de uma protease via bloqueio de sua atividade proteolítica. A ingestão de IPs pelos insetos herbívoros interfere no processo de degradação de proteínas no intestino médio. Dessa forma os inibidores são considerados

agentes antimetabólicos, pois levam a uma deficiência protéica no inseto (SILVA-FILHO & FALCO, 2000).

A especificidade é uma característica marcante nos estudos das interações entre enzima-inibidor, sendo determinada pela dinâmica das interações envolvidas e pela estrutura nativa do inibidor e da enzima.

A seletividade da inibição normalmente ocorre através da utilização de sítios de reconhecimento do substrato pela enzima. O complexo enzima-inibidor formado é termodinamicamente e cineticamente muito estável, apresentando constante de dissociação muito baixa (10^{-7} a 10^{-14} M), de maneira que a inibição estequiométrica da enzima é alcançada (BODE & HUBER, 1992; LAWRENCE & KOUNDAL, 2002).

Os inibidores de serino-proteases presentes em plantas são classificados em sete famílias através de características de homologia da estrutura primária, massa molecular, conteúdo de cisteína e de pontes dissulfeto (RICHARDSON, 1991).

As duas mais bem caracterizadas famílias de inibidores de serino-proteases são os inibidores de tripsina da soja, dos tipos Kunitz (SKTI) e Bowman-Birk (SBBI). Nos grãos de soja, os inibidores de tripsina correspondem a 6% do total de proteína (BRANDON & FRIEDMAN, 2002), sendo que cerca de 80% da inibição da atividade trípica nos grãos é causada pela ação do KTI e 20% pela ação do BBI (BRANDON *et al.*, 1989).

Os inibidores da família Bowman-Birk são proteínas globulares solúveis, caracterizadas por suas pequenas massas moleculares que variam de 8 a 10kDa, com alto conteúdo de cisteína podendo apresentar sete pontes

dissulfeto, o que confere grande estabilidade a sua estrutura, distribuídas em cerca de 70 a 90 resíduos de aminoácidos (RICHARDSON, 1991).

O primeiro inibidor pertencente à família Bowman-Birk (Figura 5), que deu origem a essa família, foi purificado de sementes de soja constituído de uma cadeia polipeptídica com dois sítios reativos, um para tripsina e outro para quimotripsina e formado de 71 resíduos de aminoácidos (ODANI & IKENAKA, 1973). No caso da tripsina há presença de Lys ou Arg na posição P_1 e para a quimotripsina há presença de um grupo aromático ou um grupo hidrofóbico de cadeia longa (LIN *et al.*, 1993).

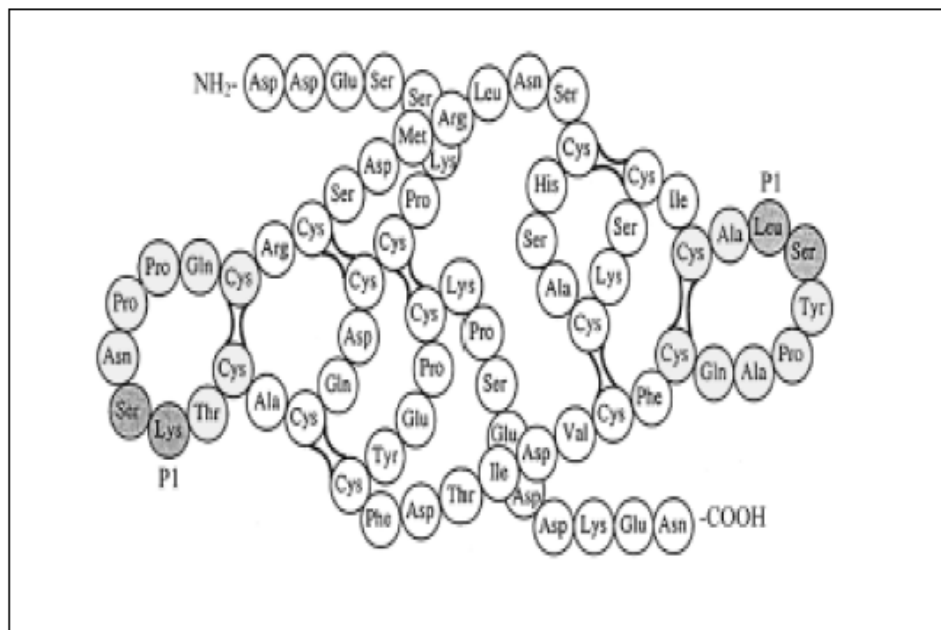


Figura 5: Estrutura primária do inibidor de soja da família Bowman-Birk. Estão indicadas as sete pontes dissulfeto, os dois sítios reativos localizados nas alças e a posição do resíduo P_1 (ODANI & IKENAKA, 1973).

Os inibidores da família Kunitz são proteínas que apresentam uma ou duas cadeias polipeptídicas, em geral, com apenas um sítio reativo e massa molecular entre 18 e 24kDa, correspondendo a aproximadamente 180 resíduos

de aminoácidos, geralmente com quatro resíduos de cisteína que formam duas pontes dissulfeto proporcionando estabilidade a estrutura protéica (RICHARDSON, 1991). A estrutura tridimensional desses inibidores é conhecida como família folha β sendo composta por 12 conformações beta anti-paralelas conectadas por longas alças. O inibidor pode ser dividido em três subdomínios, cada um contendo cerca de 60 resíduos de aminoácidos. Cada subdomínio consiste de quatro folhas beta conectadas por longas alças, estruturalmente organizadas como A- β 1-A- β 2-A- β 3-A- β 4, em que “A” refere-se às alças que conectam as folhas beta (Figura 6).

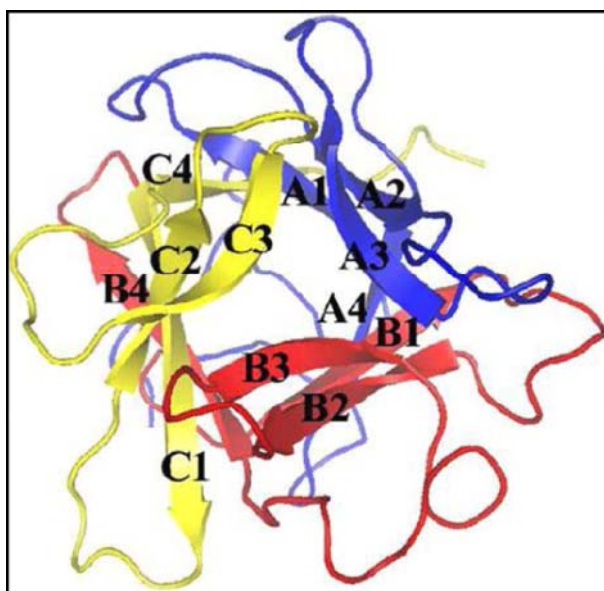


Figura 6: Estrutura do inibidor tipo Kunitz de *Delonix regia*. A proteína é formada de conformações beta com três repetições A-C, pintadas em azul, vermelho e amarelo, respectivamente (KRAUCHENCO *et al.*, 2003).

A estabilidade da estrutura tridimensional de muitos inibidores da família tipo Kunitz é dada pela presença de inúmeras pontes de hidrogênio em conjunto com as pontes dissulfeto presentes na estrutura do inibidor (SONG & SUH, 1998). Os IPs da família tipo Kunitz apresentam estruturalmente uma alça de ligação exposta, que é conservada em todos os representantes. Essa

estrutura é denominada de conformação canônica (BODE & HUBER, 1992). Esses inibidores que apresentam a conformação canônica formam complexos estáveis com a proteinase alvo, os quais se dissociam lentamente (RITONJA, *et al.*, 1990). A alça de ligação, embora freqüentemente hidrofóbica, é estabilizada por interações adicionais entre os resíduos que flanqueiam o local do sítio reativo e o núcleo do inibidor (GRÜTTER, *et al.*, 1988).

A benzamidina é uma amida aromática (Figura 7), inibidor sintético competitivo da tripsina. Esta, quando presente no meio reacional em baixas concentrações, posiciona-se no sítio de especificidade, sítio S₁ da tripsina, onde é estabilizada por interações hidrofóbicas no bolso hidrofóbico e por interações eletrostáticas entre seu grupamento amidina e um resíduo carboxílico pertencente a um ácido aspártico localizado no fundo do bolso do sítio S₁, apresentando K_i de 16,6µM (MARES-GUIA & SHAW, 1965; MARES-GUIA *et al.*, 1981, OLIVEIRA *et al.*, 1993). A benzamidina é uma molécula modelo para os estudos de interações intermoleculares, por apresentar algumas características estruturais similares aos aminoácidos Arg e Lys (Figura 7). É totalmente protonada no pH fisiológico, também apresenta possibilidade de interações lipofílicas e um grupo amidina equivalente. Derivados da benzamidina são amplamente aplicados em estudos de afinidade de associações enzima-ligante, interações estéricas e principalmente eficiência catalítica. Por exemplo, é comprovada a influência de substituintes indutores de elétrons na posição *para* do anel benzênico, com os doadores incrementando a associação do inibidor à tripsina e os grupos atraentes agindo em sentido contrário. Um desses derivados da benzamidina é o berenil, uma bisbenzamidina (PEREIRA, 2005).

O berenil é uma molécula formada por duas moléculas de benzamidina ligadas por meio de uma ligação triazeno na posição 4 de cada anel (Figura 7). A ligação triazeno é susceptível à clivagem resultando na formação de 4-aminobenzamidina e um sal 4-amidinofenildiazônio (RAETHER *et al.*, 1974). O berenil comporta-se como um inibidor parcialmente competitivo parabólico da tripsina (JUNQUEIRA *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 1993) apresentando K_i de 1,79 μM .

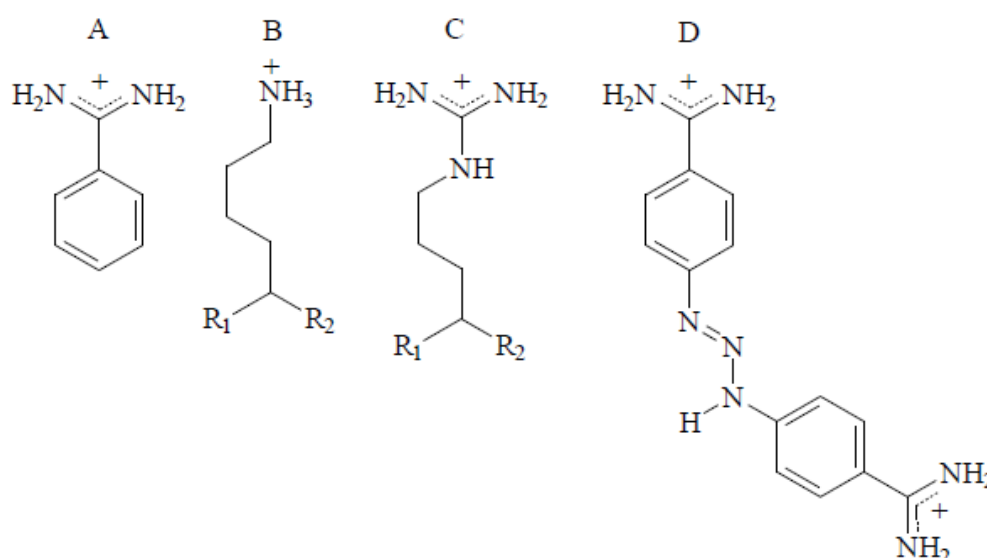


Figura 7: estrutura química da benzamidina (A), cadeia lateral da Lys (B), cadeia lateral da Arg (C) e estrutura química do berenil (D) (PEREIRA, 2005).

Diante do exposto, estudos que envolvem a caracterização bioquímica e cinética do complexo sistema de proteases presentes no intestino de insetos é um passo importante para os programas de melhoramento de plantas. Dentro desse contexto, nosso trabalho foi realizar a caracterização da cinética de inibição de tripsinas-*like* do intestino de *A. gemmatalis* correlacionando esses achados com estrutura/função da enzima. Através deste conhecimento poderemos mapear os centros ativos das enzimas, utilizando cinética enzimática e química de proteínas para produção de inibidores protéicos.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar a cinética de inibição das serino-proteases intestinais de *A. gemmatalis* utilizando diferentes inibidores de proteases sintéticos e protéicos e identificar um potente inibidor a ser utilizado no processo de defesa de plantas de soja contra a *A. gemmatalis*.

3.2. Objetivos Específicos

- Purificar as serino-proteases tripsina-*like* do intestino médio de *A. gemmatalis* através de cromatografia de afinidade em coluna de p-aminobenzamidina agarose.
- Realizar estudos cinéticos da hidrólise do substrato L-BApNA catalisada pelas enzimas semi-purificadas, a fim de verificar se a cinética segue ou não o modelo proposto por Michaelis-Menten.
- Determinar os parâmetros cinéticos K_M , $V_{m\acute{a}x}$, $V_{m\acute{a}x}/[E]$ e $V_{m\acute{a}x}/[E]/K_M$ para a hidrólise do substrato L-BApNA catalisada pela tripsina-*like*.
- Determinar a constante de inibição K_i para diferentes inibidores utilizando o substrato L-BApNA a fim de propor um modelo de inibição para as enzimas tripsina-*like* de *A. gemmatalis*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Criação da lagarta da soja

Ovos de *A. gemmatalis* foram mantidos a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ de temperatura, $70 \pm 10\%$ de umidade relativa no Laboratório de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV. A lagarta da soja apresenta ciclo biológico com duração entre três e quatro semanas. Para obtenção dos insetos adultos, as pupas foram colocadas em placas de Petri no interior de gaiola telada de 50 x 50cm revestida internamente com folhas de papel sulfite A4. Após eclosão, os adultos alimentavam-se com solução nutritiva composta de mel (10,5g), cerveja (350mL), sacarose (60g), ácido ascórbico (1,05g), nipagin (1,05g) e água (1050mL), embebida em um chumaço de algodão colocado no fundo da gaiola, sobre uma placa de Petri. As posturas de *A. gemmatalis* ocorreram após três dias na superfície das folhas de papel que revestia internamente a gaiola, as quais foram retiradas e cortadas em tiras de 2,5cm de largura x 10cm de comprimento, colocadas em copos plásticos (500mL) com um orifício circular na tampa de, aproximadamente 2cm, onde foi acoplada uma tela de filó. Esses copos foram transferidos para uma câmara climatizada a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, com umidade relativa de $60 \pm 10\%$ e o fotoperíodo de 14 horas. Após a eclosão dos ovos iniciou-se a alimentação das larvas de *A. gemmatalis* com dieta artificial (HOFFMAN-CAMPO *et al.*, 1985) colocando-se um cubo de dieta artificial em cada copo plástico.

4.2. Preparo da dieta

A dieta artificial era composta de feijão mulatinho cozido, levedo de cerveja, germe de trigo, proteína de soja, caseína, ágar e água. Ágar e água

foram autoclavados por 15 minutos à pressão de 1,5 kgf/cm². A essa mistura adicionaram-se os outros ingredientes e misturados, com o auxílio de um liquidificador industrial. Em seguida foi adicionado ácido ascórbico (6g), ácido sórbico (3g), nipagin (metilparabeno) (5g), formol 40% (6ml) e 10mL de solução vitamínica composta por niacinamida (1mg), pantotenato de cálcio (1mg), tiamina (0,25mg), riboflavina (0,50mg), piridoxina (0,25mg), ácido fólico (0,25mg), biotina (0,02mg), inositol (20mg), água (1L) até formar uma pasta homogênea que era transferida, ainda quente, para um ou dois recipientes plásticos com tampa. A pasta obtida era resfriada em câmara germicida acondicionada com luz ultravioleta e conservada a 4°C.

4.3. Extração do intestino e obtenção do extrato protéico

Foram utilizadas larvas de *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) cultivadas no Laboratório de Criação de Insetos do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa, MG, Brasil, sob temperatura (25 ± 5 °C), umidade relativa ($70 \pm 10\%$) e fotoperíodo (14h: 10h – L/D) controlados.

Larvas do 5° instar previamente imobilizadas no gelo tiveram os intestinos extraídos e mantidos a -20°C em solução de HCl 1 mol.L⁻¹ pH 3,0, na proporção de 5 intestinos por mL de solução. O extrato enzimático foi obtido através do rompimento celular resultante de nove ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C. A suspensão obtida era centrifugada a 100.000 g por 45 min. a 4°C (OLIVEIRA *et. al.*, 2005). O sobrenadante contendo o material solúvel foi retirado, aliquoteado e conservado a -20°C para análises posteriores.

4.4. Determinação da concentração de proteína e determinação das atividades enzimáticas

O teor protéico das amostras analisadas nas diversas etapas da purificação foi determinado pelo método de Bradford (1976) utilizando BSA na faixa de concentração de 0-0,2mg/mL como padrão.

As atividades das serino-proteases foram determinadas utilizando-se o método de Erlanger *et al.*, (1961). Foi utilizado tampão Tris-HCl 0,1mol.L⁻¹, CaCl₂ 20mmol.L⁻¹, pH 8,2 e o substrato cromogênico L-BApNA. Substratos sintéticos contendo um ou mais resíduos de aminoácidos são tradicionalmente usados para caracterizar proteases de insetos. L-BApNA é um substrato sintético com um único resíduo de aminoácido usado para detectar atividade tripsina-*like*. As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida (Figura 8), pela medida da absorção a 410nm em função do tempo (150s). Os cálculos foram realizados utilizando a equação 1 considerando o coeficiente de extinção molar específico de 8800 M⁻¹.cm⁻¹ para o produto. Os experimentos foram realizados em duplicatas.

$$v = \frac{\Delta A}{l \cdot \epsilon \cdot \Delta t} \quad (1)$$

v : velocidade da reação (M/s)

ΔA : absorvância a 410nm

ϵ : coeficiente de extinção molar (1/M.cm)

l : caminho ótico (cm)

Δt : tempo em segundos

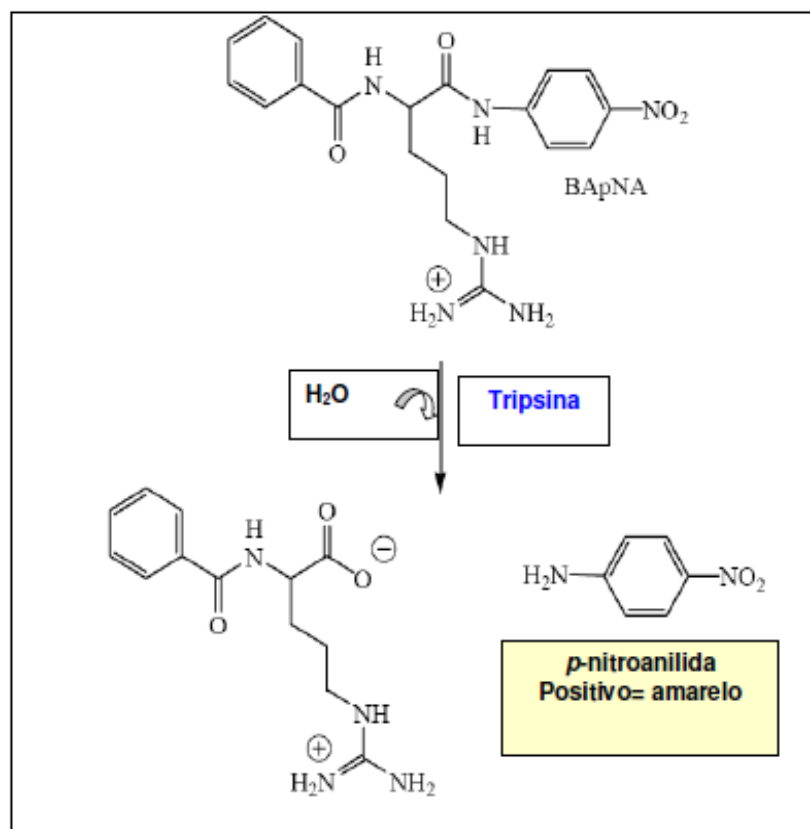


Figura 8: Esquema de hidrólise do substrato cromógeno L-BApNA.

4.5. Purificação enzimática

4.5.1. Cromatografia de afinidade

O extrato obtido foi submetido à cromatografia de afinidade em uma coluna de p-aminobenzamidina agarose (2,5mL) (Sigma®) equilibrada com tampão Tris -HCl 0,05mol.L⁻¹, NaCl 0,5mol.L⁻¹, pH 7,5. A eluição das proteínas foi realizada com tampão glicina 0,05mol.L⁻¹, pH 3,0, com fluxo contínuo de 1 mL/min e coletadas em frações de 1,5mL. As frações eluídas foram monitoradas pela determinação da Abs₂₈₀ e a determinação da atividade tripsina-*like* utilizando L-BApNA como substrato. As frações correspondentes ao pico de eluição foram reunidas e conservadas a -20°C para uso posterior nos ensaios de cinética enzimática.

4.6. Eletroforese

4.6.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE)

Após a purificação a eletroforese foi realizada com as amostras utilizando-se o método descrito por Laemmli (1970) com gel de poliacrilamida 15% na presença de SDS (0,1%). O experimento foi feito com voltagem constante de 100 V por 2h 30min, à temperatura ambiente. Ao final da corrida o gel foi lavado com água destilada e corado em solução contendo 40% etanol, 10% ácido acético e 0,1% de Coomassie Brilliant Blue R-250. A visualização das bandas foi feita após a descoloração do gel com solução contendo 40% de etanol e 10% de ácido acético.

4.7. Caracterização Cinética

4.7.1. Constante de Michaelis-Menten

Para o ensaio de determinação da constante de Michaelis-Menten foram feitas reações contendo tampão Tris-HCl 0,1M + CaCl₂ 20mM, pH 8,0, enzima purificada na concentração final de 5,04µg/mL e concentrações crescentes do substrato cromógeno L-BApNA. As concentrações testadas para o substrato foram: 0,1mM; 0,2mM; 0,4mM; 0,8mM e 1,0mM. As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, pela medida da absorção a 410nm em função do tempo (150s) utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar específico de 8800 M⁻¹.cm⁻¹ para o produto. O experimento foi realizado em triplicata.

4.7.2. Determinação das constantes de inibição

Para a determinação das constantes de inibição foi utilizado tampão Tris-HCl 0,1M + CaCl₂ 20mM, pH 8,0 em presença do substrato cromógeno L-BApNA.

Para os estudos de inibição das tripsinas-*like* pela benzamidina em presença de L-BApNA, as concentrações de substrato foram 0,1mM; 0,2mM e 0,4mM e as concentrações do inibidor foram 10μM; 20μM; 30μM; 40μM e 50μM.

Para os estudos de inibição das tripsinas-*like* pelo berenil em presença de L-BApNA, as concentrações de substrato foram 0,1mM; 0,2mM e 0,4mM e as concentrações do inibidor foram 20μM; 40μM; 60μM; 80μM e 100μM.

Para os estudos de inibição das tripsinas-*like* pelo inibidor de soja do tipo Kunitz (SKTI) em presença de L-BApNA, as concentrações de substrato foram 0,1mM; 0,2mM e 0,4mM e as concentrações do inibidor foram 0,1nM; 0,25nM; 0,5nM; 0,75nM e 1,0nM.

Para os estudos de inibição das tripsinas-*like* pelo inibidor de soja do tipo Bowman-Birk (SBBI) em presença de L-BApNA, as concentrações de substrato foram 0,1mM; 0,2mM e 0,4mM e as concentrações do inibidor foram 0,5nM; 1,0nM; 2,0nM; 3,0nM e 4,0nM.

As velocidades iniciais foram determinadas pela formação do produto p-nitroanilida, pela medida da absorção a 410nm em função do tempo (150s) utilizando-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar específico de 8800 M⁻¹.cm⁻¹ para o produto. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.7.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

A constante K_M e o parâmetro V_{\max} foram calculados por regressão não-linear utilizando o programa Sigma Plot 10.0. O modelo cinético adotado foi unirreacional simples:



A equação geral da velocidade para esse modelo é:

$$v = \frac{V_{\max} [S]}{K_M + [S]} \quad (2)$$

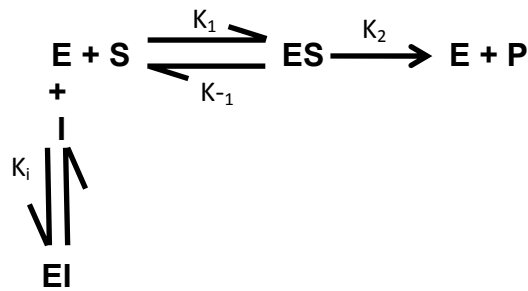
O método linear utilizado foi o gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk. Este gráfico é baseado no rearranjo da equação 2 numa forma linear. A equação 3 representa esta linearização:

$$\frac{1}{v_{\max}} = \frac{K_M}{V_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \quad (3)$$

As constantes de inibição (K_i) dos diferentes inibidores foram obtidas pela intercessão das linhas correspondentes as concentrações do substrato de acordo com o método de Dixon *et al.*, 1979. A equação 4 é do gráfico de Dixon.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{\max} K_t [S]} [I] + \frac{1}{V_{\max}} \left(1 + \frac{K_M}{[S]} \right) \quad (4)$$

De acordo com Cornish-Bowden (1981), o mecanismo mais simples para a inibição do tipo competitiva é aquele em que o inibidor, I, liga-se à enzima livre, E, com uma constante de inibição K_i , para formar o complexo enzima-inibidor, EI, que é incapaz de formar um produto. Neste tipo de inibição, o substrato e o inibidor competem pelo mesmo sítio de ligação. O modelo pode ser ilustrado da seguinte forma:



Para verificar o modelo de inibição competitiva foi utilizado o gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk. A equação 5 é do gráfico na forma recíproca.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5)$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Purificação das serino-proteases do extrato solúvel intestinal de *A.*

gemmatalis

Para o propósito deste trabalho foi utilizada purificação parcial do extrato enzimático, pois a caracterização da cinética de inibição é do conjunto de proteases intestinais tripsina-*like*, assim o uso de uma família de enzima ao invés de uma única enzima isolada apresenta resultados semelhantes ao do sistema biológico. As serino-proteases foram obtidas a partir do extrato solúvel após cromatografia de afinidade em coluna p-aminobenzamidina agarose (SIGMA®). O perfil cromatográfico da purificação é apresentado na Figura 9.

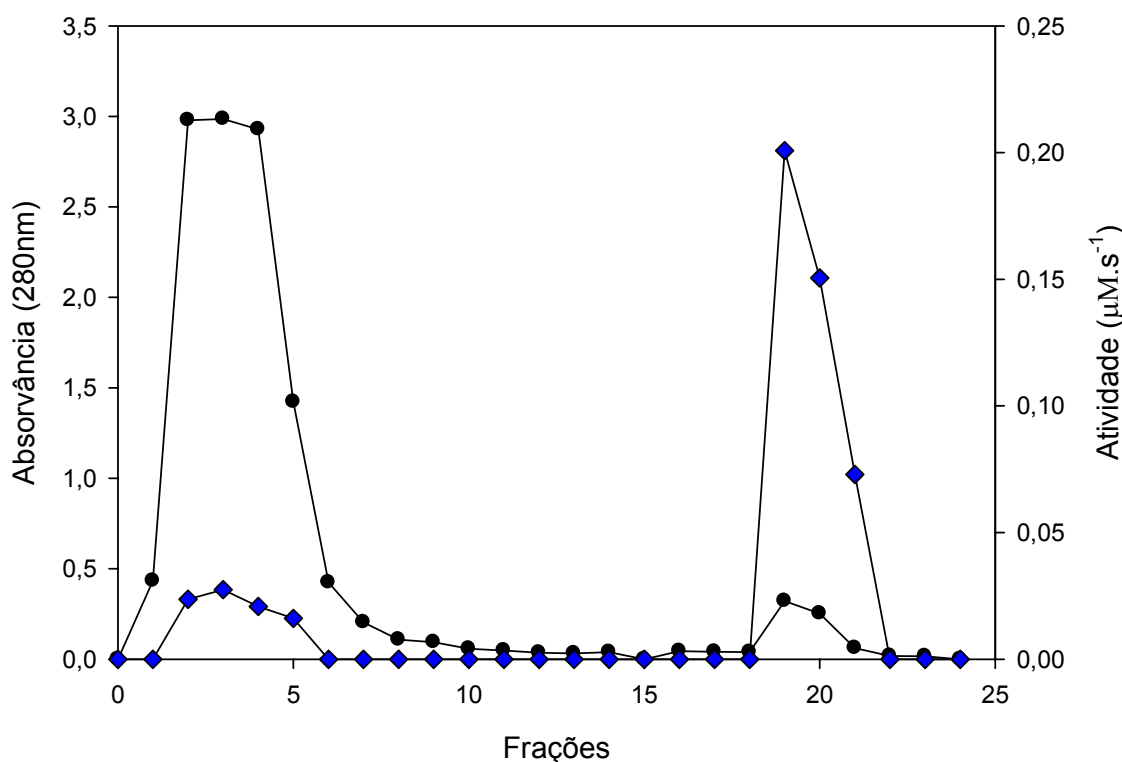


Figura 9: Perfil cromatográfico do extrato solúvel de *Anticarsia gemmatalis* em coluna de p-aminobenzamidina agarose equilibrada com Tris-HCl $0,05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, NaCl $0,5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 7,5. As proteínas foram eluídas com tampão glicina $0,05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 3,0. Substrato usado: L-BApNA. Absorvância 280nm (●), atividade $\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$ (◆).

O primeiro e maior pico de absorvância corresponde às proteínas que não possuem afinidade pela p-aminobenzamidina após lavagem exaustiva com tampão de equilíbrio. A p-aminobenzamidina é um potente inibidor competitivo de tripsina-*like* que ocupa o subsítio S₁ da enzima, ou seja, o sítio de especificidade. Entretanto, pode-se observar que houve um pico de atividade baixa que provavelmente corresponde a cisteíno-proteases presentes no extrato enzimático, que não apresentam afinidade pela p-aminobenzamidina, mas que são capazes de hidrolisar o substrato L-BApNA (TERRA & FERREIRA, 1994).

O segundo pico de absorvância corresponde às proteínas obtidas após eluição com tampão glicina. Este pico representa as serino-proteases tripsina-*like* contidas no extrato solúvel que possuem afinidade pela p-aminobenzamidina. É possível observar que os valores da atividade enzimática nessa fração são maiores do que aquela obtida no primeiro pico. Esses dados são compatíveis com o esperado considerando que as serino-proteases são capazes de hidrolisar o substrato L-BApNA. Este substrato mimetiza a ligação peptídica, enquanto que a p-aminobenzamidina mimetiza este substrato, ocupando o sítio S₁ da enzima. As frações correspondentes ao segundo pico de eluição foram reunidas para a realização dos ensaios de cinética enzimática.

O rendimento da purificação foi de aproximadamente 124% conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Rendimento da purificação em coluna p-aminobenzamidina agarose

Material	Proteína total (mg)	Atividade total ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$)	Atividade específica ($\mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}/\text{mg}$)	Fator de purificação (X)	Rendimento (%)
Extrato Bruto	1,58	0,144	0,091	1	100
Purificado	0,328	0,179	0,546	6	124,3

O aumento da atividade total após a coluna de afinidade possivelmente deve-se ao fato da enzima tripsina-like estar sendo separada de prováveis inibidores presentes no extrato bruto, proveniente da dieta, durante o processo de purificação. Observação semelhante foi relatada durante a purificação de tripsinas de *Bombyx mori* (EGUCHI & KURIYAMA, 1985), *Locusta migratoria* (LAM *et al.*, 2000) e *Heliothis virescens* (BRITO *et al.*, 2001). Reis (2009) apresentou dados de rendimento semelhantes, com valor de atividade total do purificado maior do que no extrato bruto ao purificar tripsina de *Anticarsia gemmatalis* em coluna de afinidade de p-aminobenzamidina agarose corroborando com a possibilidade da presença de inibidores no extrato.

Oliveira *et al.* (2005) também realizaram purificação parcial do extrato bruto do intestino médio de *A. gemmatalis*, no entanto, a coluna de afinidade utilizada foi de aprotinina-agarose. A purificação em coluna de p-aminobenzamidina agarose realizada por nós apresentou um melhor rendimento (124,3%) quando comparada a coluna de aprotinina-agarose (66,7%) utilizada por Oliveira *et al.*(2005).

5.2. Eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes

Amostras do *pool* de enzimas purificadas e do extrato bruto foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% contendo SDS. O perfil da migração das proteínas está representado na Figura 10.

A cromatografia em coluna de afinidade se mostrou eficiente na separação das serino-proteases tripsina-*like* do extrato bruto, já que no gel se observa redução das espécies protéicas na amostra purificada. São visualizadas duas bandas na coluna 1 com massa aproximada de 66kDa e 35kDa. A banda com massa próxima de 35kDa da enzima solúvel *tripsina-like* de *A. gemmatalis* está em concordância com as massas de tripsinas observadas na maioria dos insetos, que variam entre 20kDa e 35kDa (TERRA & FERREIRA, 1994), bem como as tripsinas isoladas de outras espécies de lepidópteros: 27kDa e 24kDa em *Sesamia nonagroides* (NOVILLO *et al.*, 1999); 26kDa e 29kDa em *Helicoverpa armigera* (TELANG *et al.*, 2005) e 28,7 kDa em *Diatrea saccharalis* (LOPES *et al.*, 2006). No entanto, a banda com massa apresentando cerca de 66kDa é compatível com as massas moleculares maiores de 67kDa e 70kDa que foram observadas em *Heliothis virescens* (BRITO *et al.*, 2001).

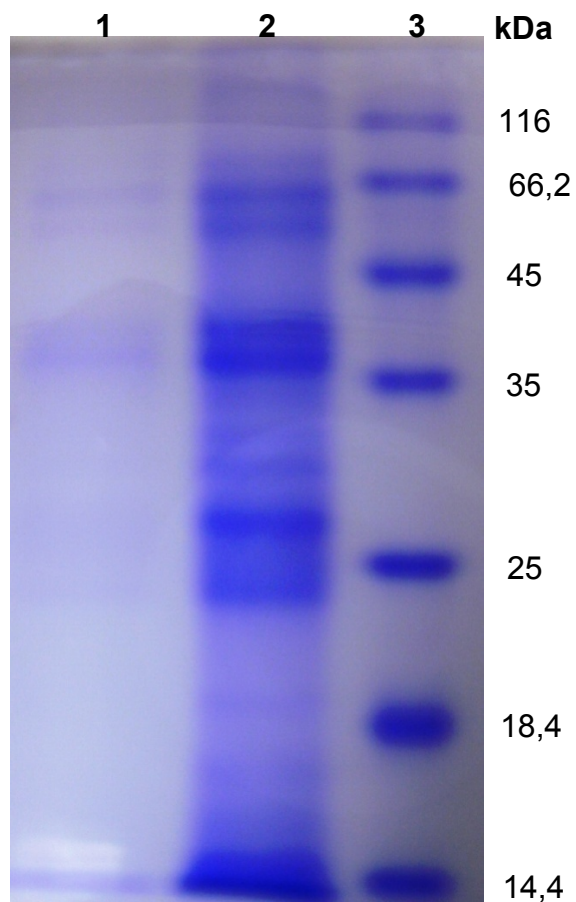


Figura 10: Perfil eletroforético em SDS-PAGE (15%) das serino-proteases solúveis do intestino de *Anticarsia gemmatalis*. **1-** Fração enzimática após coluna de afinidade p-aminobenzamidina agarose (SIGMA®). **2-** Extrato bruto fração solúvel. **3-** Padrão de massa molecular (Fermentas®).

Igualmente, essa banda de 66kDa aqui observada está de acordo com os achados de Oliveira *et al.* (2005), que encontraram massas variando de 66kDa a 91kDa. Essas massas moleculares foram explicadas pelos autores como resultado da aglomeração de tripsinas-*like*, uma vez que a tripsina apresenta massa molecular em torno de 23kDa.

Brito *et al.* (2001) demonstraram que a oligomerização de tripsinas de *H. virescens* é uma forma de adaptação do inseto à presença de inibidores de proteases. A formação dos oligômeros favorece a ligação ao substrato

(demonstrado pelos baixos valores de K_M) e dificulta a ligação dos inibidores de proteases por impedimento estérico.

A ocorrência de múltiplas tripsinas no intestino de lepidópteros é comumente relatada na literatura, estando normalmente relacionada à capacidade de adaptação do inseto à presença de inibidores de proteases de plantas (BRITO *et al.*, 2001; VOLPICELLA *et al.*, 2003; BUDATHA *et al.*, 2008).

5.3. Determinação dos parâmetros cinéticos das serino-proteases tripsina-like purificadas

Os parâmetros cinéticos estimados para as serino-proteases do intestino médio da *A. gemmatalis* utilizando o substrato amidásico L-BApNA estão apresentados na Tabela 2 comparados aos da β -tripsina bovina. Os parâmetros cinéticos de nosso trabalho foram aparentes, considerado que o sistema é semi-purificado.

Tabela 2 – Parâmetros cinético da hidrólise do substrato L-BApNA por tripsinas

Parâmetros	β -tripsina ^(a)	Tripsinas-like semi-purificadas
K_M (mM)	0,580	0,503
$V_{m\acute{a}x}$ (nM. s ⁻¹)	-	46,650
K_{cat} (s ⁻¹)	1,630	-
$V_{m\acute{a}x}/[E]$ (nM.s ⁻¹ .mg ⁻¹ .L)	-	9,256
K_{cat}/K_M (s ⁻¹ . mM ⁻¹)	2,810	-
$V_{m\acute{a}x}/[E]/K_M$ (nM. s ⁻¹ .mg ⁻¹ .L. mM ⁻¹)	-	18,402

(a) Dados obtidos de Nakata & Ishii (1972).

Conforme visto na Tabela 2 as tripsinas-like semi-purificadas apresentaram K_M semelhante ao da β -tripsina em presença de L-BApNA. Isso mostra que a afinidade do substrato pelo centro ativo das serino-proteases é próxima a afinidade pela β -tripsina reforçando que as proteases purificadas são tripsina-like. Oliveira *et al.* (2005) determinaram a K_M para tripsinas-like semi-purificadas da própria *Anticarsia gemmatalis* encontrando valor de $K_M = 0,32\text{mM}$ para o substrato L-BApNA.

A atividade amidásica sobre o substrato gerou uma curva hiperbólica de concentração-velocidade seguindo o modelo cinético de Michaelis-Menten para a faixa de concentração de substrato utilizada (Figura 11). Os parâmetros cinéticos obtidos (K_M e $V_{\text{máx}}$) foram confirmados pela linearização da curva de Michaelis-Menten gerando o gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk, com valor de R^2 de 0,9885 (inserção da Figura 11).

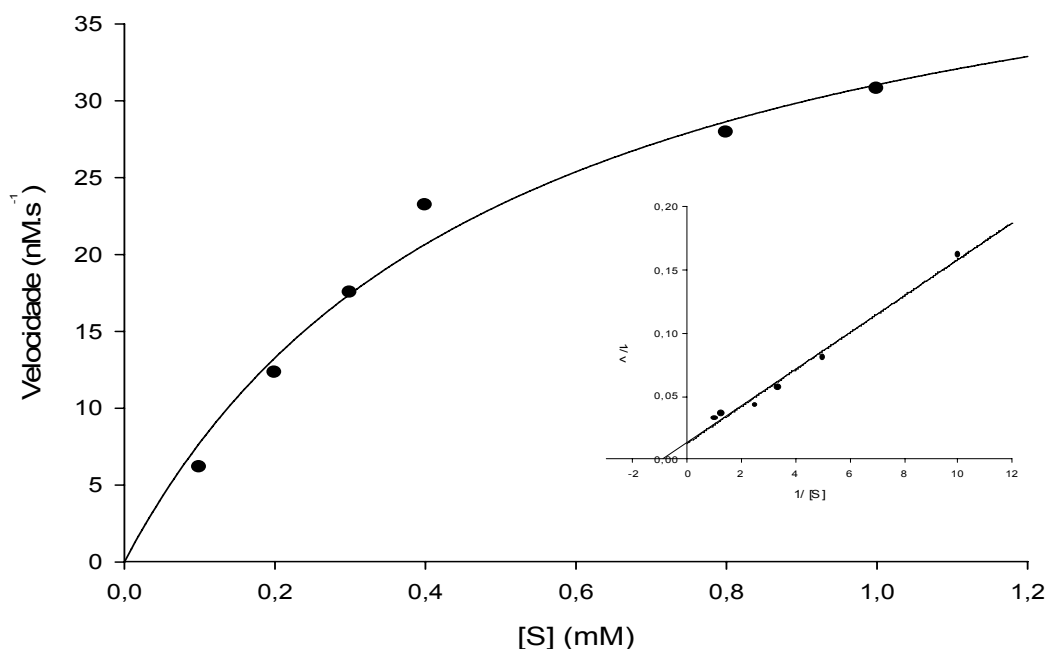


Figura 11: Gráfico de Michaelis-Menten para a hidrólise de L-BApNA catalisado pela enzima purificada. As concentrações do substrato variaram de 0,1mM a 1mM. Os pontos são experimentais. Inserção: gráfico do duplo recíproco de Lineweaver-Burk. A linha traçada foi calculada por regressão linear com R^2 de 0,9885.

A constante catalítica (K_{cat}) é uma medida da velocidade de transformação do complexo ES em E + P. Em sistemas semi-puros a velocidade de transformação pode ser expressa como $V_{m\acute{a}x}/[E]$. As tripsinas-*like* semi-purificadas apresentaram uma velocidade de transformação maior do que a β -tripsina. Esse resultado mostra uma aparente maior velocidade de hidrólise da enzima purificada. A maior eficiência das tripsinas-*like* na hidrólise do substrato L-BApNA não se deveu a uma maior afinidade das tripsinas-*like* ao substrato porque os valores de K_M foram semelhantes para a β -tripsina e enzima purificada (Tabela 2 linha 1).

A constante de especificidade (K_{cat}/K_M) é uma constante que mostra a eficiência catalítica da enzima. Em sistemas semi-purificados essa medida é dada por $V_{m\acute{a}x}/[E]/K_M$. As tripsinas-*like* semi-purificadas apresentaram uma aparente constante de especificidade maior do que a β -tripsina sendo mais eficiente na formação do complexo ES. Pode-se concluir com esse resultado que na enzima semi-purificada há uma maior adaptação entre o substrato e o centro ativo na fase de transição.

Observa-se com esses resultados uma melhor eficiência catalítica da enzima tripsina-*like* de insetos mastigadores como é o caso de *A. gemmatalis*.

5.4. Determinação das constantes de inibição

Após a realização dos ensaios utilizando concentrações variáveis dos diferentes inibidores e de substrato foram construídos gráficos do duplo recíproco de Lineweaver-Burk (Figuras 12, 13, 14 e 15) com o objetivo de determinar o modelo de inibição das serino-proteases tripsina-*like* purificadas, uma vez que ainda não temos esta caracterização na literatura.

A equação 5 apresentada no item 4.7.3 é do gráfico de Lineweaver-Burk para a inibição:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (5)$$

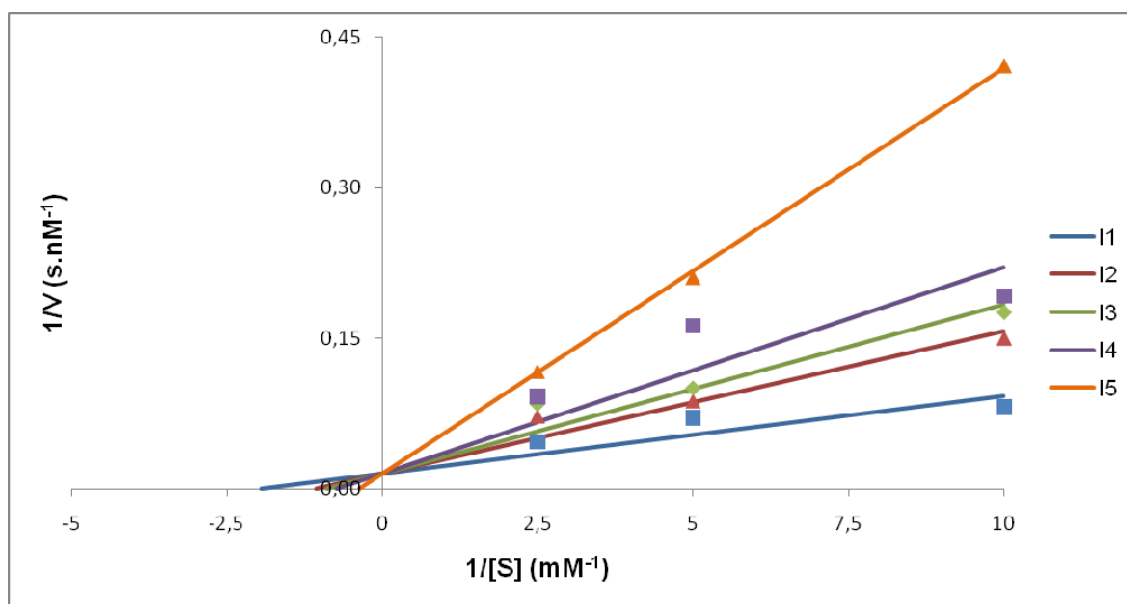


Figura 12: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatalis* pela benzamidina em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração de inibidor: I1 (10μM); I2 (20μM); I3 (30μM); I4 (40μM); I5 (50μM). As linhas foram calculadas por regressão linear utilizando-se os parâmetros da Tabela 2. Os pontos são experimentais.

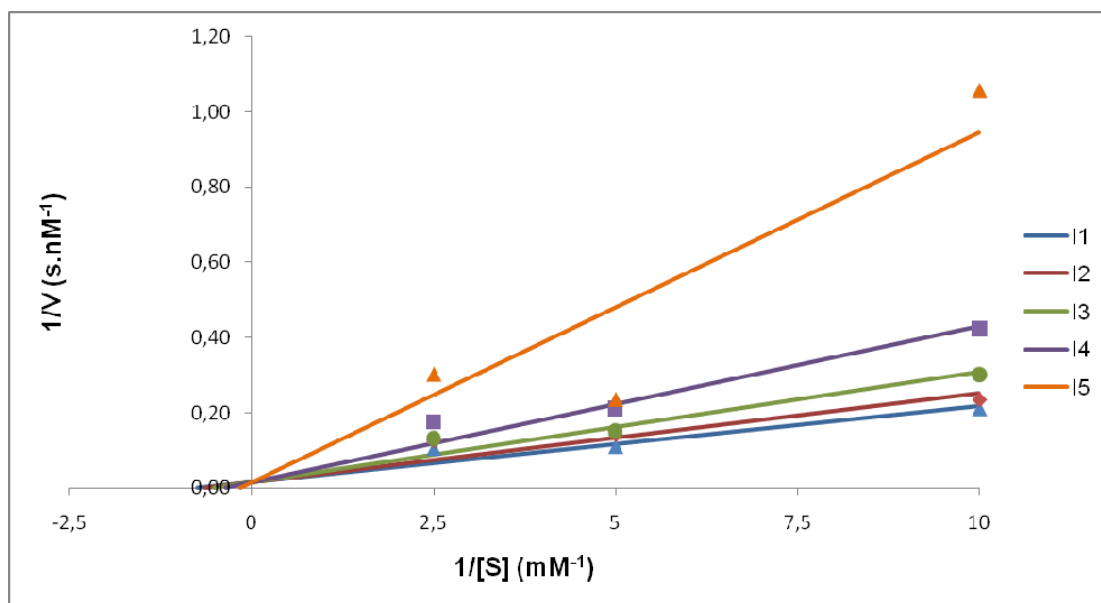


Figura 13: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatilis* pelo berenil em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração de inibidor: I1 (20μM); I2 (40μM); I3 (60μM); I4 (80μM); I5 (100μM). As linhas foram calculadas por regressão linear utilizando-se os parâmetros da Tabela 2. Os pontos são experimentais.

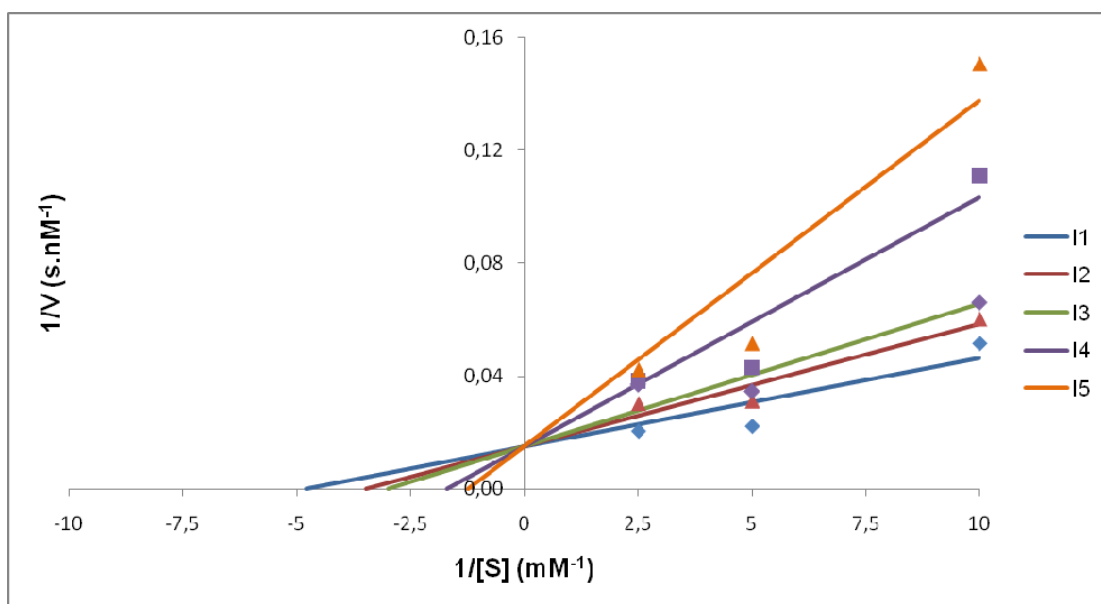


Figura 14: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatilis* pelo SKTI em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração de inibidor: I1 (0,1nM); I2 (0,25nM); I3 (0,5nM); I4 (0,75nM); I5 (1,0nM). As linhas foram calculadas por regressão linear utilizando-se os parâmetros da Tabela 2. Os pontos são experimentais.

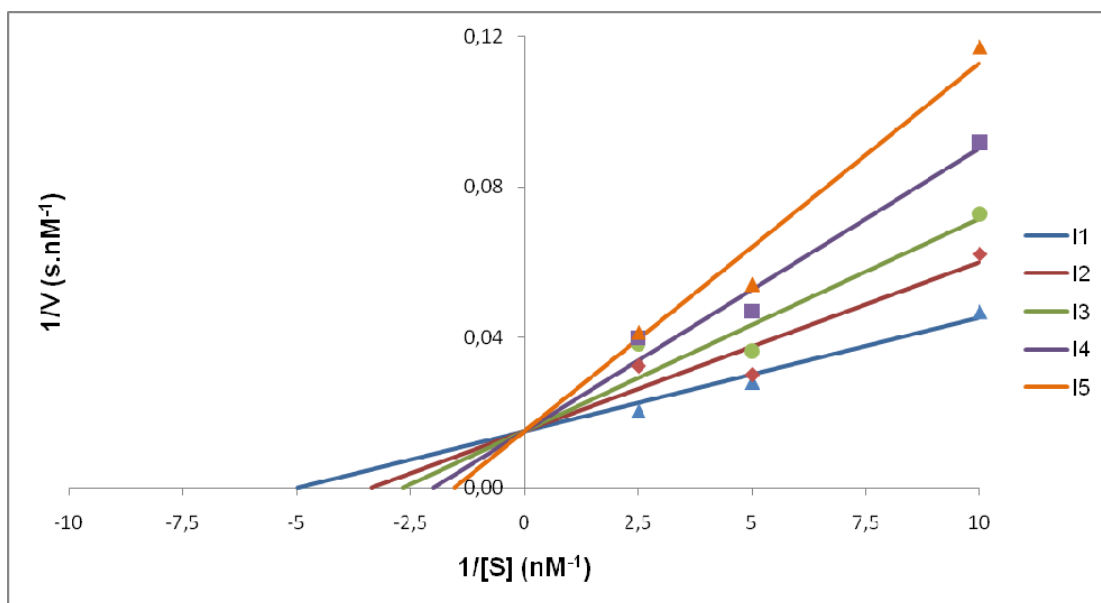


Figura 15: Gráfico de Lineweaver-Burk da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatilis* pelo SBBI em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração de inibidor: I1 (0,5nM); I2 (1,0nM); I3 (2,0nM); I4 (3,0nM); I5 (4,0nM). As linhas foram calculadas por regressão linear utilizando-se os parâmetros da Tabela 2. Os pontos são experimentais.

A análise dos quatro gráficos de Lineweaver-Burk mostrou que o mecanismo de inibição é do tipo competitivo. Neste modelo com o crescente aumento da concentração de inibidor, tendo a concentração de substrato fixo, a velocidade enzimática chega a ser nula, “zero”. Como princípio geral, um inibidor competitivo é aquele que se combina com uma enzima livre de forma que impede a ligação do substrato, isto é, o inibidor e o substrato são mutuamente exclusivos porque há uma competição pelo mesmo sítio de ligação na região do centro ativo da enzima. O inibidor competitivo age apenas aumentando a K_M aparente do substrato, ou seja, sugere que é necessária uma concentração maior de substrato para a enzima atingir qualquer fração de $V_{máx}$. Com relação ao parâmetro $V_{máx}$, este permanece sem alteração.

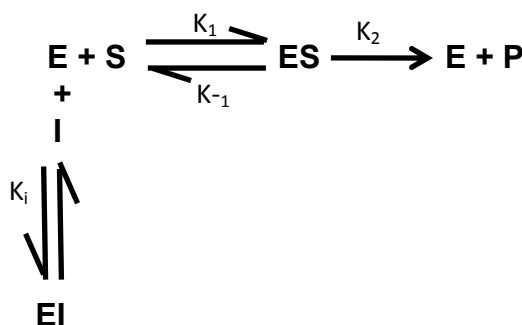
Na equação 5, o fator $\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$ pode ser considerado como um fator estatístico dependente de [I] que descreve a distribuição da enzima na forma livre (E) e na forma enzima-inibidor (EI). Como na medida em que a concentração do inibidor cresce a K_M aparente aumenta haverá um aumento na inclinação da reta pelo fator $\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)$, ou seja, a enzima está distribuída em maior quantidade na forma EI. Neste caso, a interseção da reta no eixo $1/[S]$ se aproxima da origem com o aumento de [I] indicando o aumento do K_M aparente. Isso pode ser observado nos gráficos das Figuras 12, 13, 14 e 15. Nelas as inclinações das retas aumentaram com concentração de inibidor crescente. Nos quatro gráficos a inclinação da reta $I1 < \text{reta } I2 < \text{reta } I3 < \text{reta } I4 < \text{reta } I5$.

A interseção da reta no eixo $1/V$ do gráfico dos recíprocos corresponde, de acordo com a equação 5, a $1/V_{\text{máx}}$. No modelo de inibição competitiva puro todas as retas devem passar pelo mesmo ponto no eixo $1/v$, já que a $V_{\text{máx}}$ não se altera com a presença do inibidor. Essa característica é mostrada nos quatro gráficos de duplo recíproco. Assim, pode-se inicialmente afirmar que os inibidores benzamidina, berenil, SKTI e SBBI atuam como inibidores competitivos puros das serino-proteases tripsina-*like* purificada nas faixas de concentração de S e de I analisadas.

Como é a primeira vez que a caracterização do modelo de inibição de tripsina-*like* do intestino médio de *A. gemmatalis* está sendo realizada existe uma atenção especial na padronização do modelo. Portanto, quando se está caracterizando um modelo cinético de inibição necessariamente devemos construir mais de um tipo de gráfico, ajustar mais de uma equação de cinética,

uma vez que podemos ter modelos cinéticos diferentes apresentando o mesmo perfil de um dado gráfico o que indicaria a mesma equação cinética, o mesmo modelo cinético. Um exemplo disso é o resultado obtido por Oliveira *et al.* (1993) quando o gráfico de Lineweaver-Burk de β -azotripsina bovina com inibição parcialmente competitiva hiperbólica mostrou o mesmo perfil de inibição competitiva pura. Também Junqueira *et al.* (1992) caracterizando inibição de tripsina bovina a qual apresenta inibição parcialmente competitiva parabólica mostrou o gráfico de Lineweaver-Burk o mesmo perfil de inibição competitiva pura.

Assim sendo, foram observados os demais modelos de gráficos lineares a seguir. As Figuras 16, 17, 18 e 19 representam os gráficos das inclinações obtidos a partir dos dados dos gráficos dos recíprocos. Os resultados obtidos mostram uma curva linear estatisticamente significativa podendo ser verificado pelos valores de R^2 das retas mostrado na Tabela 3. Portanto, o modelo de inibição da atividade amidásica das enzimas semi-purificadas pelos inibidores benzamidina, berenil, SKTI e SBBI novamente se mostra do tipo competitiva puro, com modelo linear na faixa de concentração utilizada. Nesse modelo de inibição competitiva pura uma molécula de inibidor se liga a uma molécula de enzima formando um complexo binário do tipo EI. O esquema abaixo ilustra este modelo:



A inclinação do gráfico recíproco na presença de inibidor competitivo é dada pela equação 6:

$$\text{Inclinação}_{\frac{1}{S}} = \frac{K_M}{V_{max} \cdot K_t} \cdot [I] + \frac{K_M}{V_{max}} \quad (6)$$

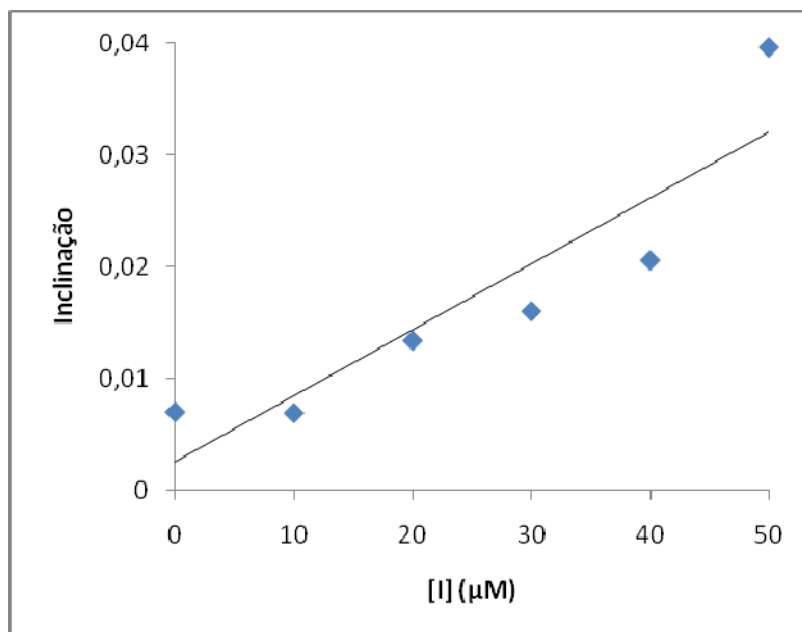


Figura 16: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk versus concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas-like purificadas em presença de benzamidina.

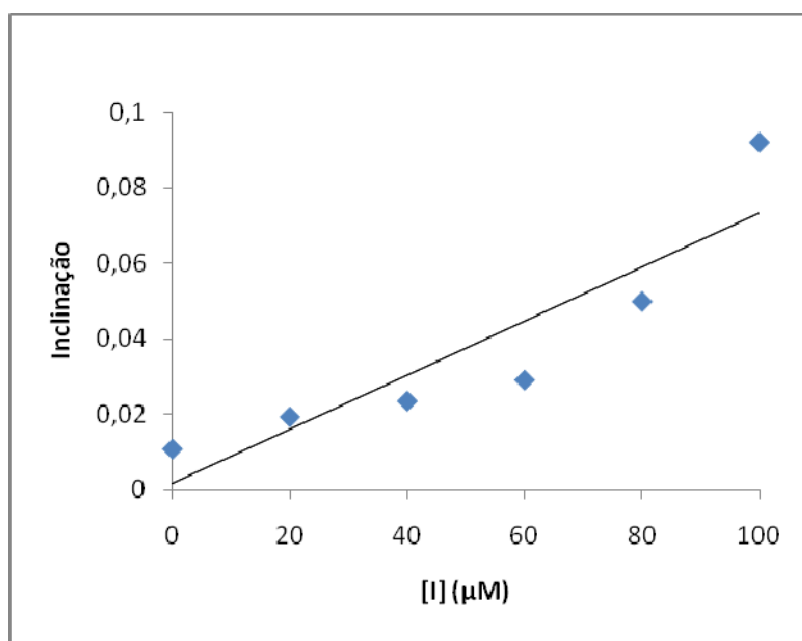


Figura 17: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk versus concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas-like purificadas em presença de berenil.

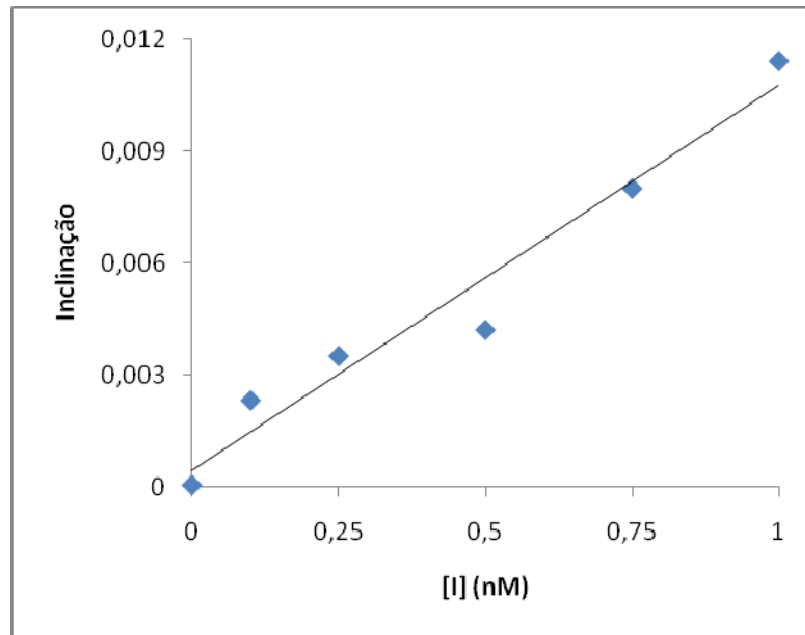


Figura 18: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk *versus* concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas-*like* purificadas em presença de SKTI.

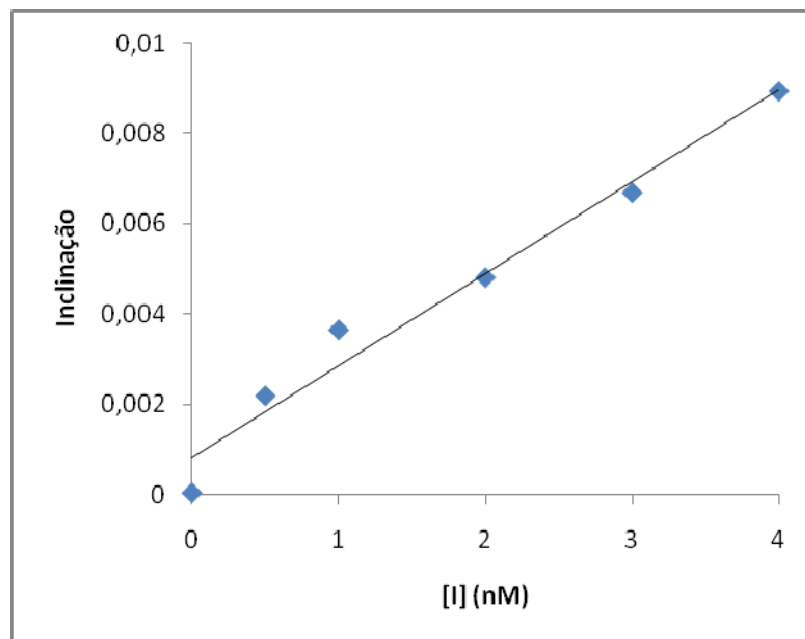


Figura 19: Gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk *versus* concentração de I para hidrólise de L-BApNA pelas tripsinas-*like* purificadas em presença de SBBI.

Tabela 3 – Valores de R^2 para as retas dos gráficos das inclinações do duplo recíproco *versus* concentração do inibidor

Inibidor	R^2
Benzamidina	0,8248
Berenil	0,8158
SKTI	0,9586
SBBI	0,9717

Ainda assim, foram ajustados os gráficos de Dixon (1979) para os diferentes inibidores, os quais estão representados nas Figuras 20, 21, 22 e 23. Neles observa-se que um aumento na concentração do substrato, com concentração fixa de inibidor, diminui o grau de inibição e um aumento na concentração do inibidor, com concentração de substrato fixa, aumenta o grau de inibição. A equação 4, apresentada no item 4.7.3, é do gráfico de Dixon:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max} \cdot K_t \cdot [S]} \cdot [I] + \frac{1}{V_{max}} \cdot \left(1 + \frac{K_M}{[S]} \right) \quad (4)$$

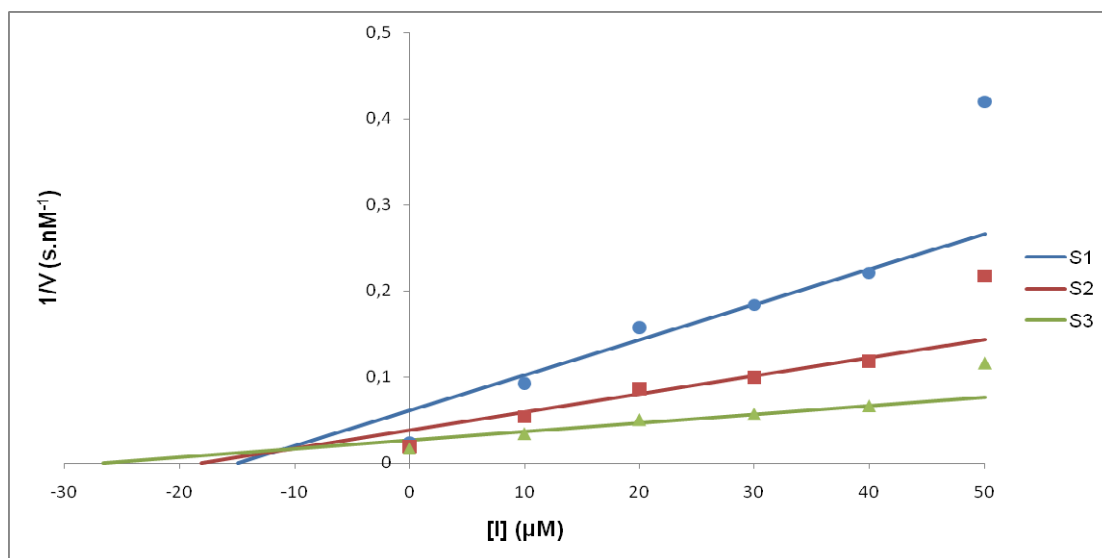


Figura 20: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatilis* pela benzamidina em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração de inibidor: I1 (10µM); I2 (20µM); I3 (30µM); I4 (40µM); I5 (50µM). As linhas foram calculadas por regressão linear utilizando-se os parâmetros da tabela 2. Os pontos são experimentais.

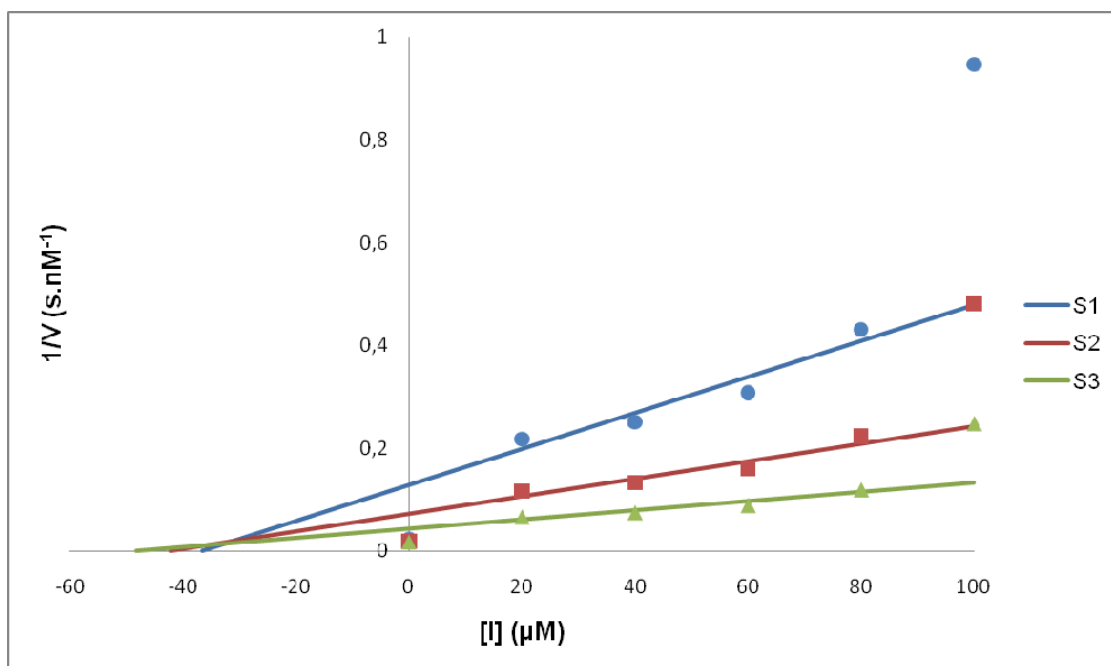


Figura 21: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatalis* pelo berenil em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração de inibidor: I1 (20μM); I2 (40μM); I3 (60μM); I4 (80μM); I5 (100μM). As linhas foram calculadas por regressão linear utilizando-se os parâmetros da tabela 2. Os pontos são experimentais.

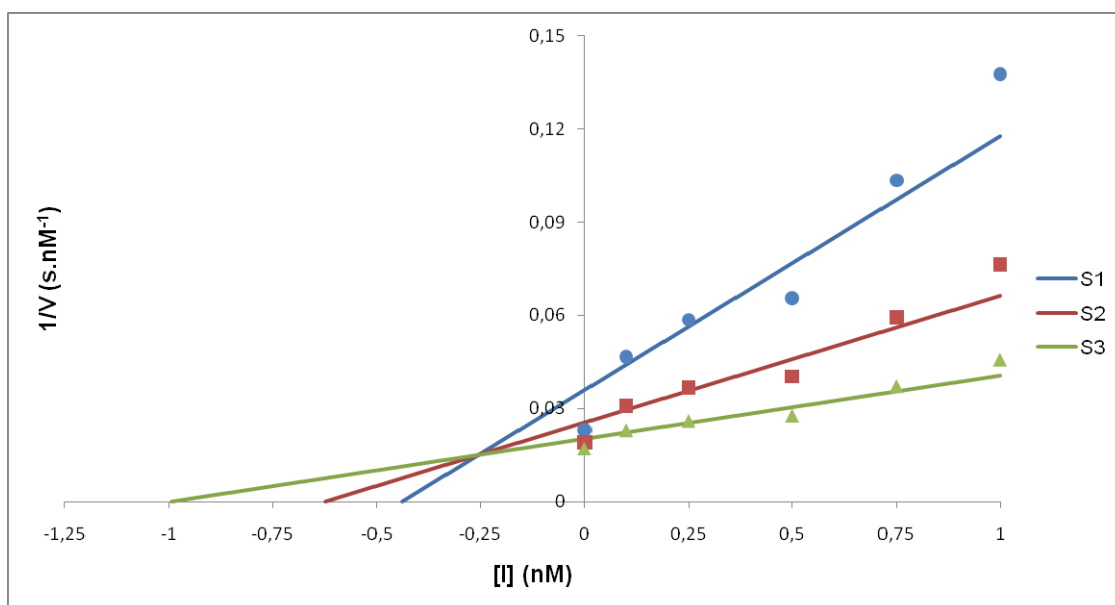


Figura 22: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatalis* pelo SKTI em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração de inibidor: I1 (0,1nM); I2 (0,25nM); I3 (0,5nM); I4 (0,75nM); I5 (1,0nM). As linhas foram calculadas por regressão linear utilizando-se os parâmetros da tabela 2. Os pontos são experimentais.

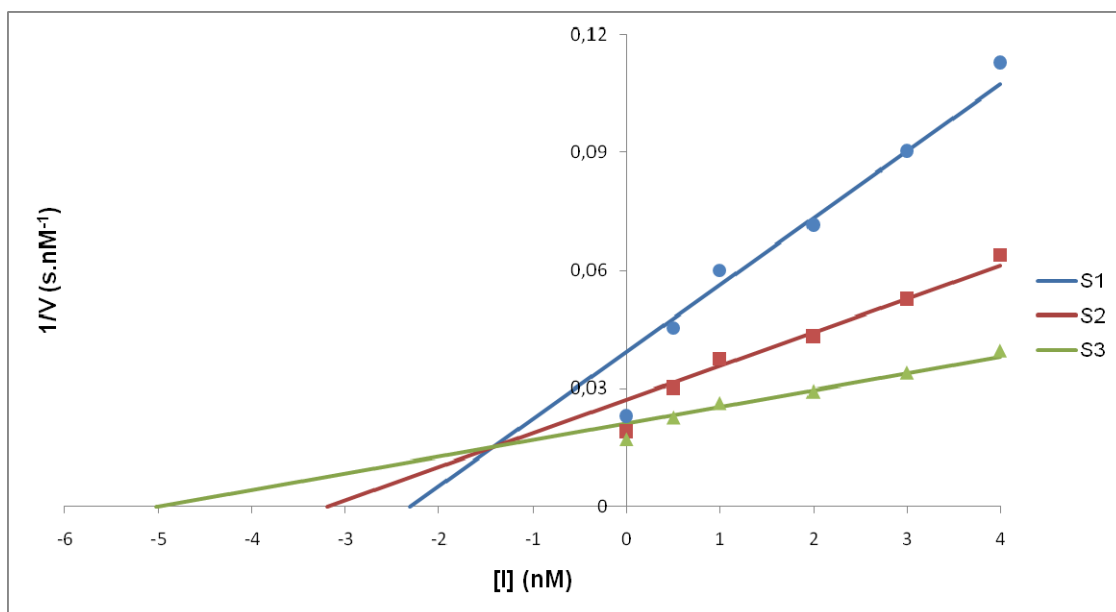


Figura 23: Gráfico de Dixon da inibição de tripsina-like intestinal de *A. gemmatalis* pelo SBBI em presença do substrato L-BApNA. Concentração de L-BApNA: S1 (0,1mM); S2 (0,2mM); S3 (0,4mM). Concentração de inibidor: I1 (0,5nM); I2 (1,0nM); I3 (2,0nM); I4 (3,0nM); I5 (4,0nM). As linhas foram calculadas por regressão linear utilizando-se os parâmetros da tabela 2. Os pontos são experimentais.

Assim, após caracterização por três tipos de perfis diferentes podemos concluir que todos os inibidores analisados apresentam inibição competitiva do tipo puro da enzima tripsina-like na faixa de concentração de inibidores e substratos analisados.

As constantes de inibição calculadas pelo método de Dixon (1979) para os inibidores benzamidina, berenil, SKTI e SBBI estão apresentadas na Tabela 4. Os dados obtidos são comparados aos da β -tripsina obtidos na literatura.

Tabela 4 - Constante de inibição dos diferentes inibidores de serino-proteases em presença do substrato L-BApNA

Inibidor	K_i tripsinas- <i>like</i>	K_i β -tripsina
Benzamidina	11,2 μ M	18,4 μ M ^(a)
Berenil	32,4 μ M	1,79 μ M ^(b)
SKTI	0,25nM	0,6nM ^(c)
SBBI	1,4nM	1,6nM ^(c)

(a) Dados obtidos de Mares-Guia & Shaw, 1965.

(b) Dados obtidos de Junqueira *et al.*, 1992.

(c) Dados obtidos de Zollner, 1999.

A benzamidina é uma amida aromática sintética que inibe de forma competitiva a tripsina apresentado K_i 18,4 μ M, conforme mostrado na Tabela 4. A benzamidina interage eletrostaticamente com o Asp₁₈₉ da tripsina e hidrofobicamente com o sítio de especificidade do centro ativo da enzima (OLIVEIRA *et al.*, 1993). As serino-proteases purificadas foram inibidas pela benzamidina, em presença do substrato L-BApNA, indicando que de fato elas são proteases tripsina-*like*. O K_i da benzamidina para a enzima purificada foi menor do que o K_i para a tripsina. Isso mostra uma maior afinidade da benzamidina pelo centro ativo das tripsinas-*like* de *A. gemmatalis* comparada a β -tripsina.

Entre os inibidores testados o berenil apresentou maior K_i o que sugere uma menor afinidade do inibidor pelo centro ativo das tripsinas-*like* purificadas. O berenil, além de interagir eletrostaticamente com o Asp₁₈₉ da tripsina e hidrofobicamente com o sítio de especificidade do centro ativo da enzima, interage fortemente com o sítio de ligação secundário de maneira similar ao Asp₁₇ do inibidor de tripsina pancreática bovina (BPTI). Sabe-se que a região S₂' é muito próxima do sítio ativo da tripsina e apresenta os resíduos Tyr₃₉, His₄₀ e Tyr₁₅₁. Oliveira *et al.* (1993) modificaram o resíduo de Tyr₁₅₁ do subsítio

S₂' da tripsina bovina demonstrando que o resíduo de tirosina participa do processo de ativação da enzima tornando-a permanentemente mais ativa.

Os inibidores SKTI e SBBI apresentaram valores de K_i menores comparados aos valores de K_i dos inibidores sintéticos. No caso dos inibidores protéicos ocorre uma ocupação de todos os sítios de ligação disponíveis no centro ativo da enzima, dessa forma há um ajuste otimizado na formação do complexo EI. Os inibidores sintéticos, por serem pequenos, não ocupam todos os sítios disponíveis da enzima formando um complexo EI menos estável.

Os inibidores protéicos apresentaram K_i na mesma ordem de grandeza, porém a maior afinidade do SKTI pelo centro ativo das enzimas pode ser explicada pelas diferenças na arquitetura destes inibidores podendo resultar na diferença de sensibilidade das enzimas à inibição (VOLPICELLA *et al.*, 2003).

Os inibidores do tipo Kunitz interagem com a enzima tendo o resíduo de aminoácido na posição P₁, arginina ou lisina, essa interação direta do resíduo do sítio reativo do inibidor com o sítio catalítico da enzima caracteriza um mecanismo de inibição competitiva. Isto é relativamente, comum para inibidores de tripsina da família Kunitz. A conformação canônica do *loop* do sítio reativo de SKTI interage com o sítio reativo da enzima através de ligações eletrostáticas e interações de hidrogênio (BODE & HUBER, 1992), formando assim, um complexo EI bastante estável.

Os inibidores da família Bowman-Birk também apresentam o *loop* com conformação canônica que interage com o centro ativo da enzima. As presenças de sete pontes dissulfeto que estabilizam a estrutura do inibidor podem torná-lo menos flexível para adaptar-se às enzimas tripsina-*like*

purificadas em comparação ao SKTI. Possivelmente esse fator torna a K_i do SKTI um pouco menor do que do SBBI.

Outra possibilidade seria que ao longo da evolução, as tripsinas de lepidópteras apresentaram um aumento na hidrofobicidade dos subsítios do centro ativo. Isso pode ser explicado pela ingestão de inibidores de proteases de plantas. Estes inibidores possuem na região ativa uma sequência hidrofílica que não se adapta de maneira adequada aos sítios hidrofóbicos da tripsina. A mudança da especificidade primária das tripsinas de lepidópteras parece ser uma adaptação evolutiva na resistência a inibidores de tripsinas de plantas (LOPES *et al.* 2006). Esta adaptação poderia dificultar a interação do inibidor SBBI com as enzimas purificadas.

Através da caracterização cinética da inibição das enzimas tripsina-*like* do intestino de *A. gemmatalis* foi possível observar que o inibidor de soja SKTI foi o que melhor inibiu essas enzimas tornando-se um alvo de estudo para a produção de inibidores peptídeo mimético, porém, devemos levar em consideração o mecanismo adaptativo do inseto.

A interação planta-inseto é um sistema dinâmico sujeito a mudanças e variações constantes. Ao longo da evolução plantas e insetos desenvolveram mecanismos fisiológicos e bioquímicos para diminuir os efeitos das proteases de insetos e dos inibidores de proteases de plantas, respectivamente (MELLO & SILVA-FILHO, 2002).

Vários estudos foram realizados para verificar a ação de IPs de plantas sobre as proteases de insetos. Os resultados demonstraram que *in vitro* os IPs são efetivos na redução da atividade proteolítica de um grande número de

espécies de insetos (JONGSMA & BOLTER, 1997; SILVA-FILHO & FALCO, 2000; BRITO *et al.*, 2001).

Paulillo *et al.* (2000) examinaram a influência de inibidores de protease de soja sobre as enzimas digestivas de larvas de *Spodoptera frugiperda*. Os resultados mostraram que estes inibidores de proteases inibiram a atividade *in vitro* da tripsina e quimotripsina sugerindo que tanto o SKTI quanto o SBBI têm um potencial antimetabólico quando ingerido pela larva do inseto.

Entretanto, os insetos desenvolveram mecanismos adaptativos para se defenderem dos efeitos deletérios que os inibidores de proteases podem exercer sobre eles, afetando sua taxa de crescimento, mortalidade e fecundidade. Estes mecanismos incluem o uso de proteases para os quais a planta não apresenta inibidores, degradação proteolítica dos inibidores e mutações adquiridas tornando as proteases menos sensíveis aos inibidores sem afetar a atividade proteásica (JONGSMA & BOLTER, 1997). Diversos experimentos demonstraram, por exemplo, que coleópteras e lepidópteras são capazes de se adaptarem à produção dos inibidores de proteases através da produção de proteases insensíveis à inibição. Novas proteases insensíveis são selecionadas do repertório de enzimas digestivas disponíveis no genoma dos insetos (JONGSMA & BOLTER, 1997; BOWN *et al.*, 1997; PAULILLO *et al.*, 2000; De LEO *et al.*, 2001; MAZUMDAR-LEIGHTON & BROADWAY, 2001).

Entretanto, Broadway (1995) demonstrou que nem todos os inibidores de proteases foram capazes de aumentar o nível de expressão de enzimas resistentes aos inibidores, mesmo quando estes inibiram uma proporção significativa da atividade enzimática. Além disso, observou que o aumento de

enzimas resistentes aos inibidores foi diretamente influenciado pela concentração e tempo de exposição ao inibidor.

Uma alternativa a essa adaptação do inseto seria o uso de IP de uma planta diferente da planta alvo do inseto. Telang *et al.* (2003) demonstraram que o uso de dieta com inibidores de proteases de plantas não hospedeira de *Helicoverpa armigera*, como batata e feijão alado, apresentou um potencial de inibição no crescimento do inseto.

Diante do exposto, a criação de cultivar geneticamente modificado que confira resistência a insetos através da produção de inibidores de proteases específicos é uma estratégia promissora no controle de pragas agrícolas. Ao se considerar a possibilidade de produzir plantas transgênicas expressando IPs, algumas considerações se fazem necessárias a fim de aumentar as chances de sucesso. Entre estas, incluem-se os níveis de expressão do IP, sua constante de inibição, a estabilidade do IP no intestino do inseto e a habilidade de adaptação do inseto aos inibidores via alteração da expressão gênica (SILVA-FILHO & FALCO, 2000).

6. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais que foi realizado este trabalho pode-se concluir:

- A purificação em coluna p-aminobenzamidina foi eficiente na separação das serino-proteases tripsina-*like* do extrato bruto protéico do intestino médio de *A. gemmatalis*.
- O uso do substrato amidásico L-BApNA permitiu mostrar que houve atividade tripsina-*like* nas serino-proteases purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*.
- Foi possível constatar a presença de duas enzimas serino-protease tripsina-*like* com massas de aproximadamente 35kDa e 66kDa após separação eletroforética.
- Nas concentrações de enzima e substrato utilizadas a cinética da hidrólise do substrato segue o modelo de Michaelis-Menten.
- As análises dos gráficos de Lineweaver-Burk e de Dixon possibilitaram a caracterização do mecanismo de inibição das serino-proteases tripsina-*like* do intestino de *A. gemmatalis* como do tipo competitivo.
- O gráfico das inclinações do gráfico de Lineweaver-Burk *versus* a concentração de inibidor possibilitou a caracterização da inibição como competitiva linear para os quatro inibidores utilizados.
- Os valores de K_i determinados mostraram que o inibidor SKTI foi o que melhor inibiu a atividade tripsina-*like* das serino-proteases purificadas do intestino médio de *A. gemmatalis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, Z.; SALEEMUDDIN, M.; SIDDI, M. Purification and characterization of three alkaline proteases from the gut of the larva of armyworm *Spodoptera litura*. **Insect Biochem.**, 10: 667–673, 1980.

AHN, J. E.; ZHU-SALZMAN, K. CmCatD, a cathepsin D-like protease has a potential role in insect defense against a phytocystatin. **J. Insect Physiol.**, 55: 678–685, 2009.

ANDRADE, F. G.; NEGREIRO, M. C. C.; FALLEIROS, Â. M. F. Aspectos dos mecanismos de defesa da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* (Hübner, 1818) relacionados ao controle biológico por *Baculovirus anticarsia* (AGMNPV). **Arq. Inst. Biol.**, 71: 391-398, 2004.

BARBARA, K. A. Velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* (Hübner) (Insecta: Lepidoptera: Noctuidae) 2000. Disponível em: <http://entnemdept.ifas.ufl.edu/creatures/field/velvetbean.htm>, acessado em 04 de novembro de 2010.

BARRETT, A. J. Proteolytic enzymes: serine and cysteine peptidases. **Methods Enzymol.**, 244: 1-15, 1994.

BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Evolutionary lines of cysteine peptidases. **J. Biol. Chem.**, 382: 727–733, 2001.

BATISTA, A. C.; MELATTI, V. M.; DEMO, C.; MARTINI, E. S.; PRAÇA, L. B.; GOMES, A. C. M. M.; FALCÃO, R.; BROD, C. S.; MONNERAT, R. G. Prospecção de estirpes de *Bacillus thuringiensis* efetivas para o controle de *Anticarsia gemmatalis*. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 82, EMBRAPA, 2005.

BODE, W.; HUBER, R. Natural protein inhibitors and their interactions with proteinases. **Eur. J. Biochem.**, 204: 433-451, 1992.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. Differentially regulated inhibitor-sensitive and insensitive protease genes from the phytophagous insect pest, *Helicoverpa armigera*, are members of complex multigene families. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 27: 625-638, 1997.

BOWN, D. P.; WILKINSON, H. S.; GATEHOUSE, J. A. Regulation of expression of genes encoding digestive proteinase in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary proteinase inhibitors. **Physiol. Entomol.**, 29: 278-290, 2004.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254, 1976.

BRANDON, D. L.; BATES, A. H.; FRIEDMAN, M. Monoclonal antibody-based enzyme immunoassay of the Bowman-Birk protease inhibitor of soybean. **J. Agr. Food Chem.**, 37: 1192-1196, 1989.

BRANDON, D. L.; FRIEDMAN, M. Immunoassays of soy proteins. **J. Agr. Food Chem.**, 50: 6635-6642, 2002.

BRITO, L. O.; LOPES, A. R.; PARRA, J. R. P.; TERRA, W. R.; SILVA-FILHO, M. C. Adaptation of tobacco budworm *Heliothis virescens* to proteinase inhibitors may be mediated by the synthesis of new proteinases. **Comp. Biochem. Physiol. Part B**, 128: 365-375, 2001.

BROADWAY, R. M. Are insects resistant to plant proteinase inhibitors? **J. Insect Physiol.**, 41: 107-116, 1995.

BUDATHA, M.; MEUR, G.; DUTTA-GUPTA. Identification and characterization of midgut proteases in *Achaea janata* and their implications. **Biotechnol. Lett.**, 30: 305-310, 2008.

CARTER, P.; WELLS, J. A. Dissecting the catalytic triad of serine protease. **Nature**, 332: 564-568, 1988.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em: http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/06_levantamento_mar2010.pdf. Acessado em 03 de novembro de 2010.

CORNISH-BOWDEN, A. Inhibitors and activators. In: CORNISH-BOWDEN, A. Fundamentals of enzyme kinetics. 2a Edition. London: Butterworths, Cap. 5., p. 73-98, 1981.

CRAIK, C. S.; ROCZNIAK, S.; LARGMAN, C.; RUTTER, W. J. The catalytic role of the site aspartic acid in serine proteases. **Sci.**, 237: 909-913, 1987.

De LEO, F.; BOTTINO, M. B.; CECI, L. R.; GALLERANI, R.; JOUANIN, L. Effects of a mustard trypsin inhibitor expressed in different plants on three lepidopteran pests. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 31: 593-602, 2001.

DIXON, M.; WEBBER, R. C.; THERONE, C. J. R.; TRIPTON, K. F. Inhibition and activation in enzymes. **Acad. Press, New York**, 332-381, 1979.

DUNAEVSKY, Y. E.; ELPIDINA, E. N.; VINOKUROV, K. S.; BELOZERSKY, M. A. Protease inhibitors in improvement of plant resistance to pathogens and insects. **Mol. Biol.**, 39: 608–613, 2005.

EGUCHI, M., KURIYAMA, K. Purification and characterization of membrane-bound alkaline proteases from the midgut tissue of the silk-worm *Bombyx mori*. **J. Biochem.**, 97: 1437–1445, 1985.

EMBRAPA, CENTRO NACIONAL DE PESQUISA DE SOJA, Sistemas de Produção/Embrapa Soja, n.13. Tecnologias de produção de soja – região central do Brasil – 2009 e 2010. Londrina. 262 p., 2008.

ERLANGER, B. F.; KOKOWSKY, N.; COHEN, W. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. **Arch. Biochem. Biophys.**, 95: 271–278, 1961.

FARMER, E. E. & RYAN, C. A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. **Plant Cell**, 4: 129-134, 1992.

FASTREZ, J.; FERSHT, A. R. Demonstration of the acyl-enzyme mechanism for the hydrolysis of peptides and anilides by chymotrypsin. **Biochem.**, 12: 2025-2034, 1973.

FERRY, N.; EDWARDS, M. G.; GATEHOUSE, J. A.; CAPELL, T.; CHRISTOU, P. & GATEHOUSE, A. M. R. Transgenic plants for insect pest control: a forward looking scientific perspective. **Transgenic Res.**, 15:13-19, 2006.

FRANCO, O. L.; RIGDEN, D. J.; MELO, F. R.; GROSSI-DE-SA, M. F. Plant α -amylase inhibitors and their interaction with insect α -amylases: structure, function and potential for crop protection. **Eur. J. Biochem.**, 269, 397-412, 2002.

GALLO, D.; NAKANO, O.; SILVEIRA NETO, S.; CARVALHO, R. P. L.; BATISTA, G. C.; BERTI FILHO, E.; PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A.; ALVES, S. B.; VENDRAMIN, J. D.; MARCHINI, L. C.; LOPES, J. R. S.; OMOTO, C. **Manual de Entomologia Agrícola**. Piracicaba: FEALQ, 920 p., 2002.

GATEHOUSE, J. A. Plant resistance towards insect herbivores: a dynamic interaction. **New Phytologist**, 156: 145-169, 2002.

GILL, I.; LÓPEZ-FANDIÑO, R.; JORBA, X.; VULFSON, E. N. Biologically active peptides and enzymatic approaches to their production. **Enzyme Microb. Technol.**, 18: 162-183, 1996.

GRÜTTER, M. G.; FENDRICH, G.; HUBER, R.; BODE, W. The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin. **EMBO J.**, 7: 345-351, 1988.

HAQ, S. K.; ATIF, S. M.; KHAN, R. H. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. **Arch. Biochem. Biophys.**, 431: 145-159, 2004.

HEDSTROM, L. Serine protease mechanism and specificity. **Chem. Rev.**, 102: 4501-4523, 2002.

HERRERO, S.; COMBES, E.; VAN OERS, M. M.; VLAK, J. M.; MAAGD, R. A.; BEEKWILDER, J. Identificación and recombinant expression of a novel chymotrypsin from *Spodoptera exigua*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 35: 1073-1082, 2005.

HILDER, V. A. & BOULTER, D. Genetic engineering of crop plants for insect resistance- a critical review. **Crop Protection**,18: 177-191, 1999.

HOFFMAN-CAMPO, C. B.; OLIVEIRA, E. B.; MOSCARDI, F. Criação massal de lagarta da soja (*Anitcarsia gemmatalis*). Londrina, **EMBRAPA-CNPS**, 10, Documentos, 23p, 1985.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (online). http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_200912comentarios.pdf. Acessado em 03 de novembro de 2010.

INAGAMI, T. Trypsin. In: FUNATSU, M.; HIROMI, K.; IMAHORI, K.; MURACHI, T.; NARITA, K. **Proteins structure and function**. Tokyo, Kodansha, p.1-83, 1972.

JONGSMA, M. A.; BOLTER, C. The adaptations of insects to plant proteinase inhibitors. **J. Insect Physiol.**, 43: 885-895, 1997.

JUNQUEIRA, R. G.; SILVA, E.; MARES-GUIA, M. Partial competitive parabolic inhibition of bovine trypsin by bis-benzamidines: a general model for the trypsin-like family of proteases. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 25: 873-887, 1992.

KNEEN, E.; SANDSTEDT, R. M. An amylase inhibitor from certain cereals. **J. American Chem. Soc.**, 65: 1247, 1943.

KRAUCHENCO, S.; PANDO, S. C.; MARANGONI, S.; POLIKARPOV, I. Crystal structure of the Kunitz (STI)-type inhibitor from *Delonix regia* seeds. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 312: 1303-1308, 2003.

KREM, M. M.; ROSE, T.; DI CERA, E. The C-terminal sequence encodes function in serine proteases. **J. Biol. Chem.**, 274: 28063-28066, 1999.

KUNITZ, M. Crystalline soybean trypsin inhibitor. **J. Gen. Physiol.**, 29: 149-154, 1945.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680–685, 1970.

LAM, W.; COAST, G. M.; RAYNE, R. C. Characterization of multiple trypsins from the midgut of *Locusta migratoria*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 30: 85-94, 2000.

LAWRENCE, P. K.; KOUNDAL, K. R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. **Electron. J. Biotechnol.**, 5: 93-109, 2002.

LIN, G.; BODE, W.; HUBER, R.; CHI, C.; ENGH, R. A. The 0.25nm X-ray structure of the Bowman-Birk-type inhibitor from mung bean in ternary complex with porcine trypsin. **Eur. J. Biochem.**, 212: 549-555, 1993.

LIU, Y. L.; SALZMAN, R. A.; PANKIW, T.; ZHU-SALZMAN, K. Transcriptional regulation in southern corn rootworm larvae challenged by soyacystatin N. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 34: 1069-1077, 2004.

LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; TERRA, W. R. Coevolution of insect trypsins and inhibitors. **Arch. Insect Biochem. Physiol.**, 55: 140-152, 2004.

LOPES, A. R.; JULIANO, M. A.; MARANA, S. R.; JULIANO, L.; TERRA, W. R. Substrate specificity of insect trypsins and the role of their subsites in catalysis. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 36: 130-140, 2006.

MAFFEI, M. E.; MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Insects feeding on plants: Rapid signals and responses preceding the induction of phytochemical release. **Phytochem.**, 68: 2946-2959, 2007.

MAGRINI, E. A.; BOTELHO, P. S. M.; SILVEIRA NETO, S. Biology of *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae) in the soybean crop. **Sci. Agric.**, 56: 547-555, 1999.

MARES-GUIA, M.; SHAW, E. Studies on the active center of trypsin. The binding of amidines and guanidines as models of the substrate said chain. **J. Biol. Chem.**, 240: 1579-1585, 1965.

MARES-GUIA, M.; ROGANA, E.; AMORIN, A. F.; MAGALHÃES-ROCHA, N. M. Kinetic evidence for a two-state, hybrid model for the trypsin activation by modifiers. **J. Biol. Chem.**, 256: 1661-1668, 1981.

MAZUNDAR-LEIGHTON, S.; BROADWAY, R. M. Transcriptional induction of diverse midgut trypsins in larval *Agrotis ipsilon* and *Helicoverpa zea* feeding on the soybean trypsin inhibitor. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 31: 645-657, 2001.

MELLO, M. O.; SILVA-FILHO, M. C. Plant insect interactions: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. **Braz. J. Plant Physiol.**, 14: 71-81, 2002.

NAKATA, H.; ISHII, S. I. Substrate activation of trypsin and acetyl-trypsin caused by N- α -benzoyl-L-arginine-p-nitroanilide. **J. Biochem.**, 72: 281-290, 1972.

NOVILLO, C.; CASTAÑERA, P., ORTEGO, F. Isolation and characterization of two digestive trypsin-like proteinases from larvae of the stalk corn borer, *Sesamia nonagroides*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 29: 177-184, 1999.

ODANI, S.; IKENAKA, T. Studies on Soybean Trypsin Inhibitors. (VII)-Dissulfide bridges in Soybean Bowman-Birk Proteinase Inhibitor. **J. Biochem.**, 74: 697-715, 1973.

OLIVEIRA, M. G. A.; ROGANA, E.; ROSA, J. C.; REINHOLD, B. B.; ANDRADE, M. H.; GREENE, L. J.; MARES-GUIA, M. Tyrosine 151 is part of the substrate activation binding site of bovine trypsin. **J. Biol. Chem.**, 268: 26893-26903, 1993.

OLIVEIRA, M. G. A.; De SIMONE, S. G.; XAVIER, L. P.; GUEDES, R. N. C. Partial purification and characterization of digestive trypsin-like proteases from the velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*. **Comp. Biochem. Physiol. Part B**, 140: 369-380, 2005.

PAGE, M. J.; Di CERA, E. Serine peptidases: classification, structure and function. **Cell. Mol. Life Sci.**, 65: 1220-1236, 2008.

PAULILLO, L. C. M. S.; LOPES, A. R.; CRISTOFOLETTI, P. T.; PARRA, J. R. P.; TERRA, W. R.; SILVA-FILHO, M. C. Changes in midgut endopeptidase activity of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) are responsible for adaptation to soybean proteinase inhibitors. **J. Econ. Entomol.**, 93: 892-896, 2000.

PEREIRA, M. T. Avaliação termodinâmica completa da interação entre a β -tripsina e os inibidores benzamidina e berenil. **Tese de Doutorado em Bioquímica e Imunologia** – Universidade Federal de Minas Gerais, 2005.

PERONA, J. J.; CRAIK, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. **Prot. Sci.**, 4: 337-360, 1995.

PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C. Protein digestibility, protease activity and post-embryonic development of the velvetbean caterpillar (*Anticarsia gemmatalis*) exposed to the trypsin-inhibitor benzamidine. **Pest. Biochem. Physiol.**, 86: 23-29, 2006.

PILON, F. M. Propriedades bioquímicas e cinético-enzimáticas de serino e cisteíno proteases produzidas por bactérias isoladas do trato intestinal de *Anticarsia gemmatalis*. **Dissertação (Mestrado em Bioquímica Agrícola)** – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 115 p, 2008.

PILON, A. M.; OLIVEIRA, M. G. A.; PILON, F. M.; GUEDES, R. N. C.; OLIVEIRA, J. A.; FAZOLLO, A. Adaptação da lagarta da soja *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepdoptera: Noctuidae) ao inibidor de protease benzamidina. **Revista Ceres**, 56: 744-748, 2009.

PÓLGAR, L.; HALÁSZ, P. Currents problems in mechanistic studies of serine and cisteyne proteases. **Biochem. J.**, 207: 1-10, 1982.

PRAÇA, L. B.; SILVA NETO, S. P.; MONNERAT, R. G. *Anticarsia gemmatalis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae: Biologia, amostragem e métodos de controle. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, (Série Documento, 196), 2006.

RAETHER, W.; LOEWE, H.; SEIDENATH, H. Trypanozider effect der in saurer lösung entstehenden spaltprodukte Von berenil und ihre mögliche in vivo-rückkupplung in NMRI-mäusen. **Tropenmed. Parasit.**, 25: 273-282, 1974.

RAO, M. B.; APARNA, M. T.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, 62: 597-635, 1998.

REIS, D. T. C. Purificação e caracterização de proteases digestivas *tripsina-like* do intestino da lagarta da soja envolvidas no mecanismo de interação planta-inseto. **Tese de doutorado em Bioquímica Agrícola**- Universidade Federal de Viçosa, 2009.

RICHARDSON, M. Seed storage proteins: The enzyme inhibitor. In: Methods in plants Biochemistry. **New York Academic Press**, 5: 259-305, 1991.

RITONJA, A.; KRIZAL, I.; MESKO, P.; KOPITAR, M.; LUCOVNIK, P.; STRUKEL, J. B.; PUNGERCAR, J.; BUTTLE, D. J.; BARRET, A. J.; TURK, V. The amino acid sequence of a novel inhibitor of cathepsin D from potato. **FEBS Lett.**, 504: 41-44, 1990.

SÁVIO, G. M., PINOTTI, E. B. Controle biológico da lagarta-da-soja (*Anticarsia gemmatalis*) por *Baculovirus anticarsia*. **Revista científica eletrônica de Agronomia (FAEF)**. Ano VII – Nº 13 – Jun/Periódicos Semestral, 2008.

SCOTT, I. M.; THALER, J. S.; SCOTT, J. G. Response of a Generalist Herbivore Trichoplusiani to Jasmonate-Mediated Induced Defense in Tomato. **J. Chem. Ecol.**, 36: 490–499, 2010.

SHIVAJI, R.; CAMAS, A.; ANKALA, A.; ENGELBERTH, J.; TUMLINSON, J. H.; WILLIAMS, W. P.; WILKINSON, J. R.; LUTHE, D. S. Plants on Constant Alert: Elevated Levels of Jasmonic Acid and Jasmonate-Induced Transcripts in Caterpillar-Resistant Maize. **J. Chem. Ecol.**, 36: 179–191, 2010.

SILVA, C. P.; TERRA, W. R.; DE SÁ, M. F. G.; SAMUELS, R. I.; ISEJIMA, E. M.; BIFANO, T. D.; ALMEIDA J. S. Induction of digestive α - amylases in larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) in response to ingestion of common bean α - amylases inhibitor 1. **J. Insect Physiol.**, 47: 1283- 1290, 2001.

SILVA, F. B.; OLIVEIRA, M. G. A.; BATISTA, R. B.; PIRES, C. V.; XAVIER, L. P. PIOVESAN, N. D.; OLIVEIRA, J. A.; JOSÉ, I. C.; MOREIRA, M. A. Função fisiológica de lipoxigenases de folhas de soja submetidas ao ataque de lagarta (*Anticarsia gemmatalis* Hübner). **Arq. Inst. Biol.**, 69: 67-74, 2002.

SILVA-FILHO, M. C.; FALCO, M. C. Interação planta inseto- Adaptação dos insetos aos inibidores de proteinases produzidas pelas plantas. **Biotec. Ciên. Desenvol.**, 12: 38-42, 2000.

SIPOS, T.; MERKEL, J. R. Temperature-dependent activation of trypsin by calcium. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 31: 522-527, 1968.

SIPOS, T.; MERKEL, J. R. An effect of calcium ions on the activity, heat stability, and structure of trypsin. **Biochem.**, 9: 2766-2775, 1970.

SONG, H. K.; SUH, S. W. Kunitz type soybean trypsin inhibitor revisited: refined structure of its complex with porcine trypsin reveals an insight into the interection between a homologous inhibitor from *Erythrina caffra* and tissue type plasminogen activator. **J. Mol. Biol.**, 275: 347-363, 1998.

SRINIVASAN, A.; GIRI, A. P.; GUPTA, V. S. Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. **Cell. Mol. Biol. Letters**, 11: 132-154, 2006.

TELANG, M. A.; SRINIVASAN, A.; PATANKAR, A.; HARSULKAR, A.; JOSHI, V.; DAMLE, A.; DESHPANDE, V.; SAINANI, M.; RANJEKAR, P.; GUPTA, G.; BIRAH, A.; RANI, S.; KACHOLE, M.; GIRI, A.; GUPTA, V. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Phytochem.**, 63: 643-652, 2003.

TELANG, M. A.; GIRI, A. P.; SAINANI, M. N.; GUPTA, V. S. Characterization of two midgut proteinases of *Helicoverpa armigera* and their interection with proteinase inhibitors. **J. Insect Physiol.**, 51: 513-522, 2005.

TERRA, W. R.; FERREIRA, C. Insect digestive enzymes: compartmentalization and function. **Comp. Biochem. Physiol. Part B**, 109: 1-62, 1994.

TERRA, W.; FERREIRA, C.; BAKER, J. E. Digestive enzymes. In: LEHANE, M. J. & BILLINGSLEY, P. F. (ed). **Biology of the Insect Midgut**. Chapman & Hall. The University Press, Cambridge. First edition, p 206-235, 1996.

VOLPICELLA, M.; CECI, L. R.; CORDEWENER, J.; AMERICA, T.; GALLERANI, R.; BODE, W.; JONGSMA, M. A.; BEEKWILDER, J. Properties of purified gut trypsin from *Helicoverpa zea*, adapted to proteinase inhibitors. **Eur. J. Biochem.**, 270: 10-19, 2003.

WAGNER, W.; MÖHRLÉN, F.; SCHNETTER, W. Characterization of the proteolytic enzymes in the midgut of the European Cockchafer, *Melolontha melolontha* (Coleoptera:Scarabaeidae). **Insect Biochem. Mol. Biol.**, 32: 803-814, 2002.

XAVIER, L. P.; OLIVEIRA, M. G. A.; GUEDES, R. N. C.; SANTOS, A. V.; DE SIMONE, S. G. Trypsin-like activity of membrane-bound midgut proteases from *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae). **Eur. J. Biochem.**, 102: 147-153, 2005.

ZOLLNER, H. Handbook of enzyme inhibitor. 3 ed., 1487 p., New York, 1999.

ZHU-SALZMAN, K.; LUTHE, D. S.; FELTON, G. W. Arthropod-inducible proteins, broad spectrum defenses against multiple herbivores. **Plant Physiol.**, 146: 852–858, 2008.